НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України

“Моноклональні та рекомбінантні антитіла для експериментальної біології, медицини і ветеринарії ”

(1985-2014)

Луговськой Едуард Віталійович	– член.-кор. НАНУ, д.б.н., проф., зав. відділом структури та функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
Колибо Денис Володимирович	– д.б.н., зав. лабораторією імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
Колеснікова Ірина Миколаївна	– к.б.н., с.н.с. відділу структури та функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
Олійник Олена Сергіївна	– к.б.н., с.н.с. лабораторії імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
Костюченко Олена Петрівна	– м.н.с. відділу структури та функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ
Глузман Данило Фішелевич	– д.м.н., професор, зав. відділом імуноцитохімії та онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ
Сидоренко Світлана Павлівна	– член-кореспондент, д.б.н., в.о. зав. відділом регуляторних механізмів клітини Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ
Скляренко Лілія Михайлівна	– д.м.н., пров. н.с. Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ
Шлапацька Лариса Миколаївна	- к.б.н., с.н.с. Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ

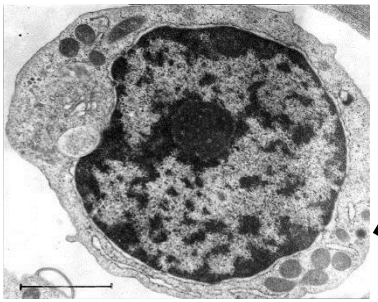
Мета роботи:

одержання та впровадження в наукові дослідження, а також

в медицину та ветеринарію

моноклональних і рекомбінантних антитіл

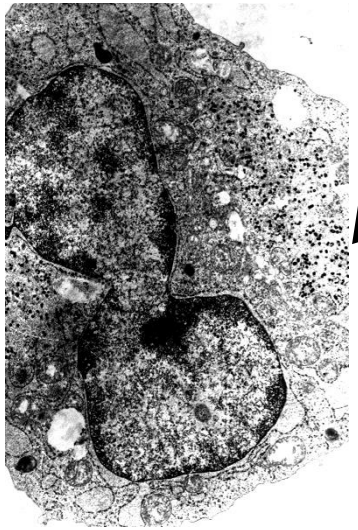
Утворення гібридом



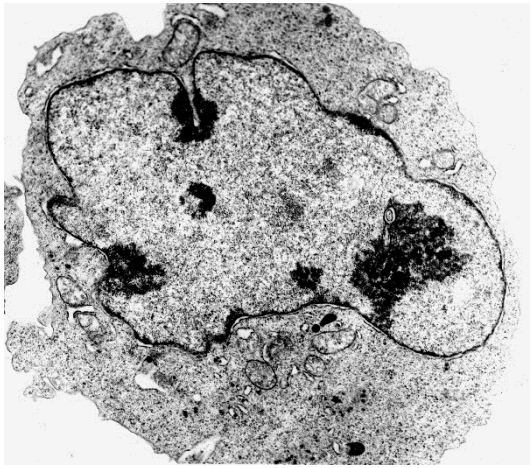
В-лімфоцит

Мієломна клітина
P3-X63-Ag8.653

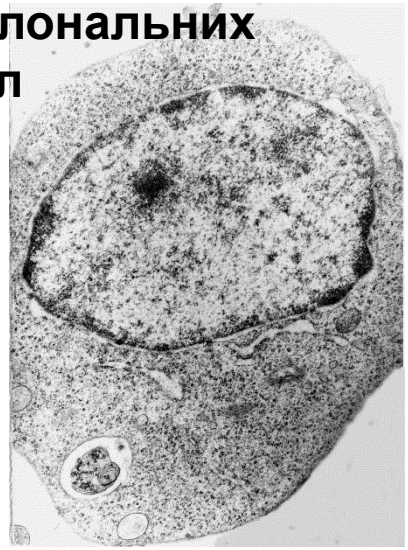
Гетерокаріон



Синкаріон



Гібридома – продуцент моноклональних антитіл

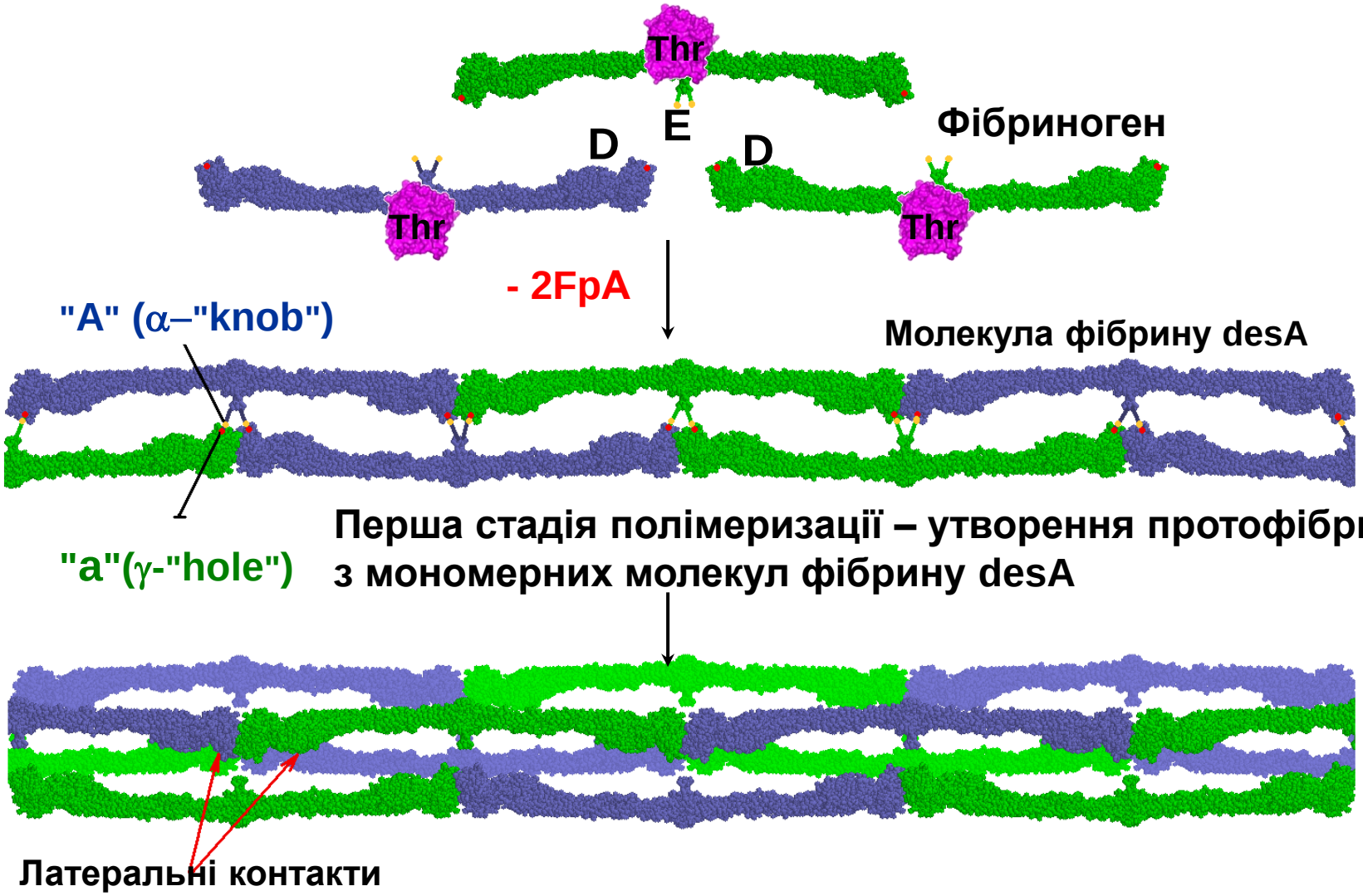


Від початку 1980-х років - впровадження в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України та в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України гібридомної технології отримання моноклональних антитіл

Використання моноклональних антитіл для вивчення будови молекули фібриногену, механізмів його перетворення у фібрин та розробки тест-систем для діагностики загрози тромбоутворення

Система зсідання крові є однією з основних складових частин гемостазу. Головним її призначенням є зупинка кровотечі при пошкодженнях судин крові.

За патологічної активації системи зсідання крові може виникати процес тромбоутворення. Весь каскад реакцій системи зсідання крові спрямований на перетворення фібриногену на фібрин внаслідок відщеплення двох фібринопептидів А (FpA) під дією тромбіну та на утворення полімерного фібринового каркасу тромбу.



Перша стадія полімеризації – утворення протофібрил з мономерних молекул фібрину desA

Друга стадія полімеризації – латеральна асоціація протофібрил з утворенням фібрил

Отримано моноклональні антитіла (монАТ) до різних епітопів молекули фібриногену та фібрину.

За використання монАТ отримано нову інформацію про механізми формування фібринового каркасу тромбу.

На основі монАТ розроблено тест-системи для діагностики загрози тромбоутворення.

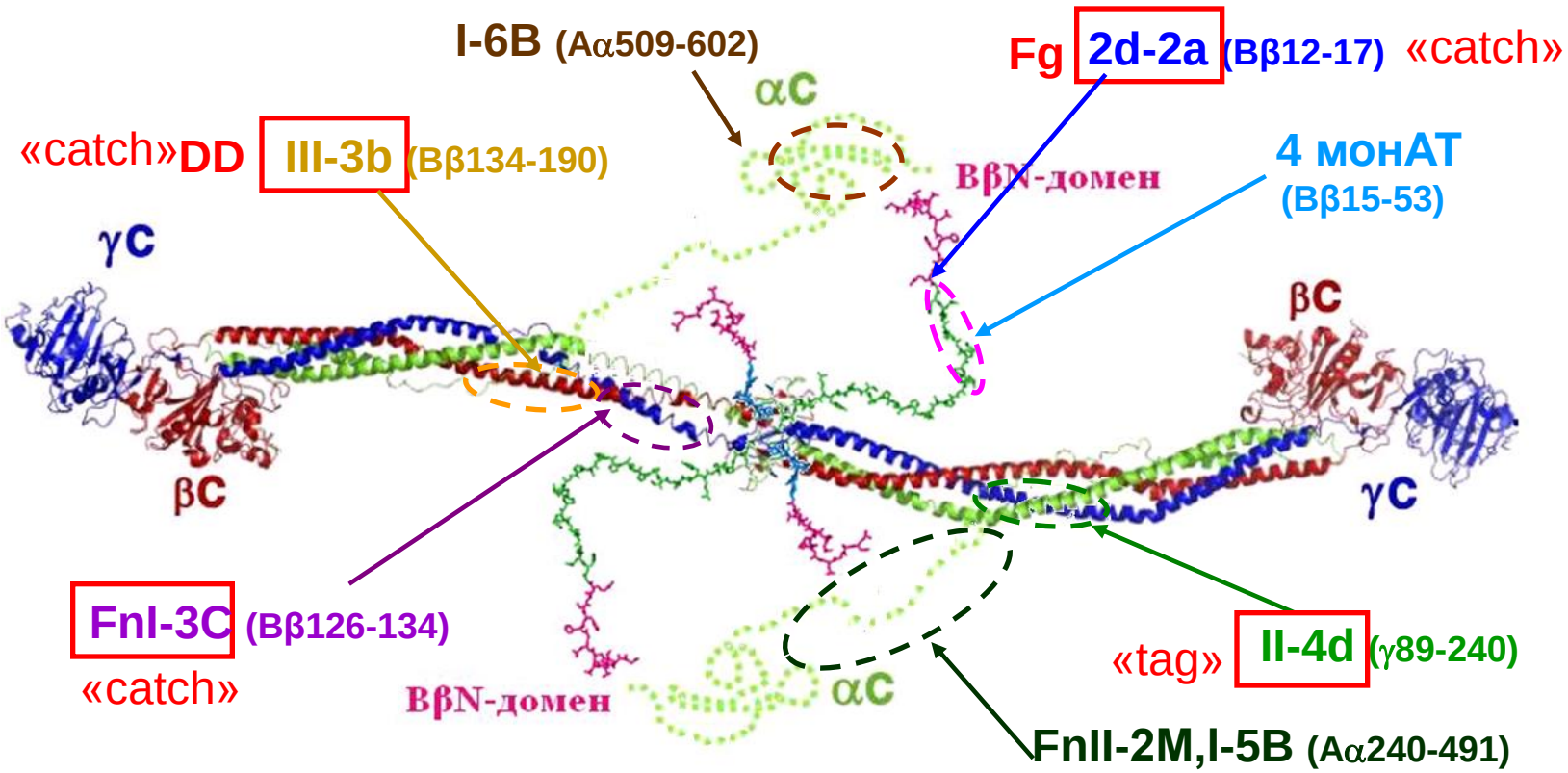
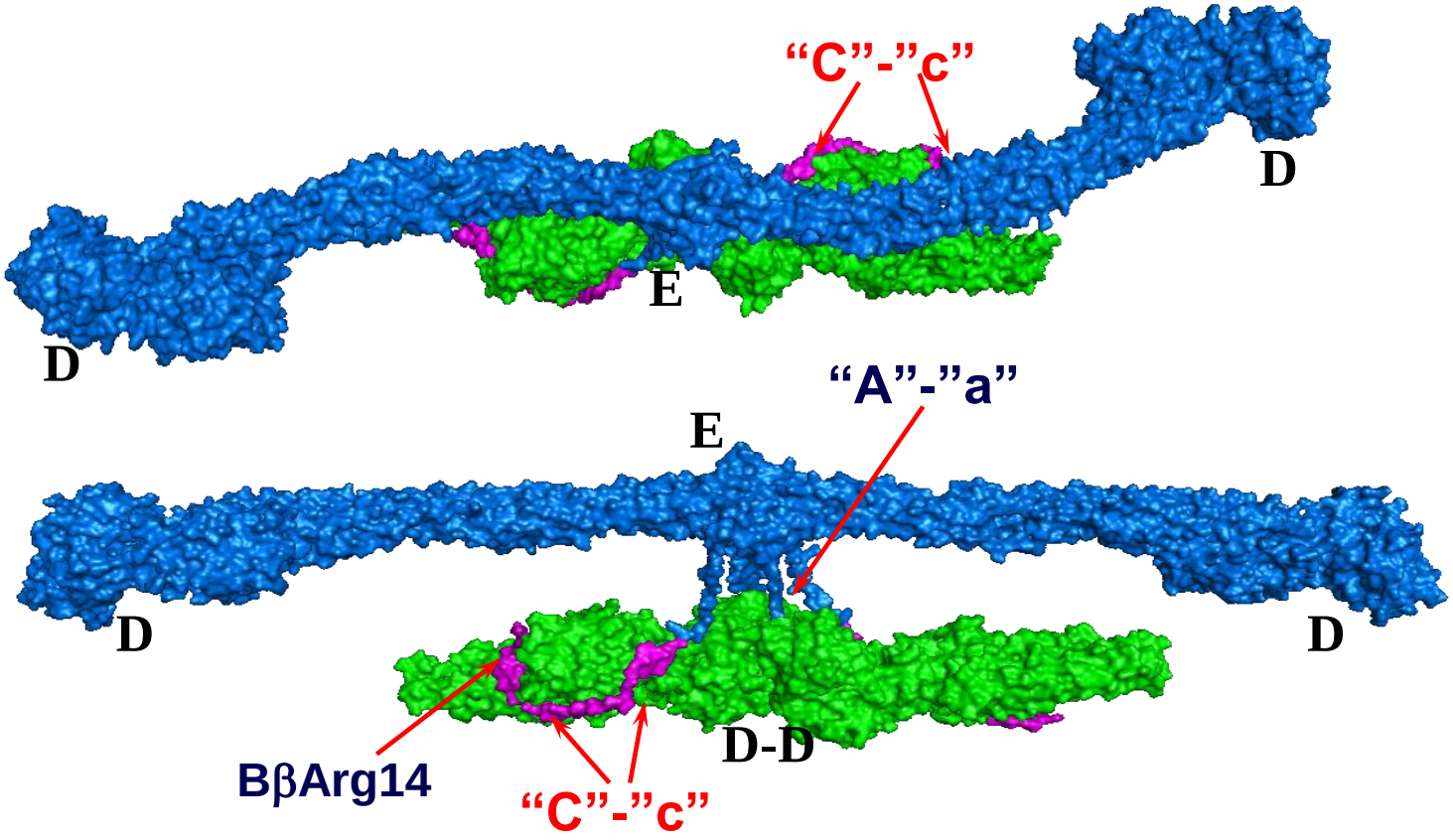


Схема молекули фібриногену із позначенням локалізації епітопів, що розпізнаються отриманими моноклональними антитілами.

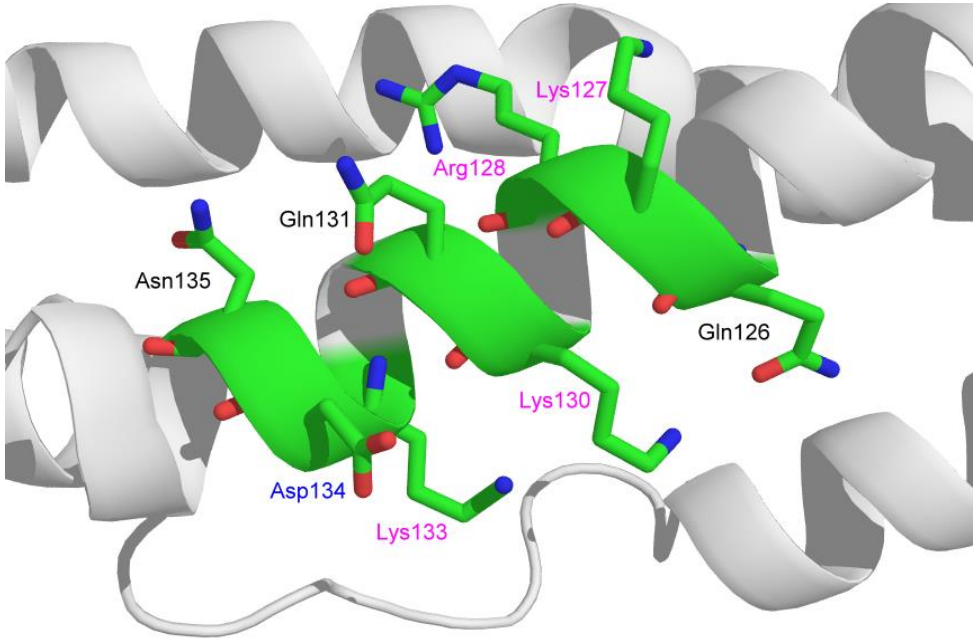
У прямокутниках вказані антитіла, що застосовуються у тест-системах.



За допомогою монАТ, епітопи для яких знаходяться в центральному E- і периферичному D-регіонах молекули фібрину, виявлена нова пара комплементарних сайтів “C-c”, що беруть участь в першій стадії полімеризації – побудові протофібрил

(Lugovskoy EV,… Komisarenko SV, FEBS Journal, 2007)

Завдяки фібрин-специфічному монАТ FnI-3C, вперше було встановлено, що в процесі перетворення фібриногену на фібрин у фрагменті суперспірального конектору молекули фібрину експонується неоантигенна детермінанта Bβ126-135, а у відповідному сегменті суперспіралі, який включає α спіральні поліпептидні ланцюги Aα91-103; Bβ126-135; γ77-69, формується специфічна просторова структура, необхідна для наступної латеральної асоціації протофібрил.



Для клінічної діагностики серцево-судинних захворювань (інфаркту міокарду, інсульту, тромбозу глибоких вен, тромбоемболії легеневої артерії, ДВС синдрому), а також діабету та онкозахворювань необхідне кількісне визначення маркерів активації системи зсідання крові та загрози тромбоутворення – фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру (продукту плазмінового гідролізу полімерного фібрину, стабілізованого фактором XIII) у плазмі крові людини.

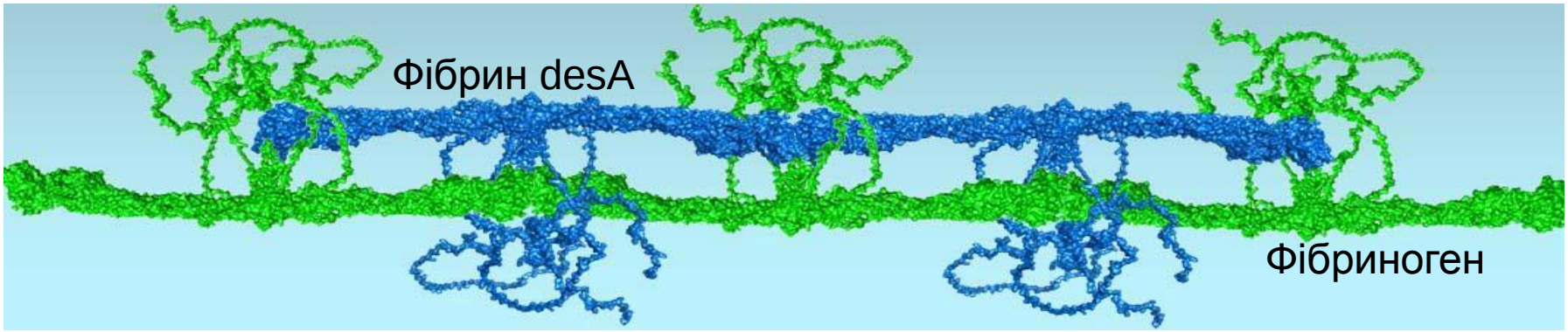


Схема розчинного фібрину

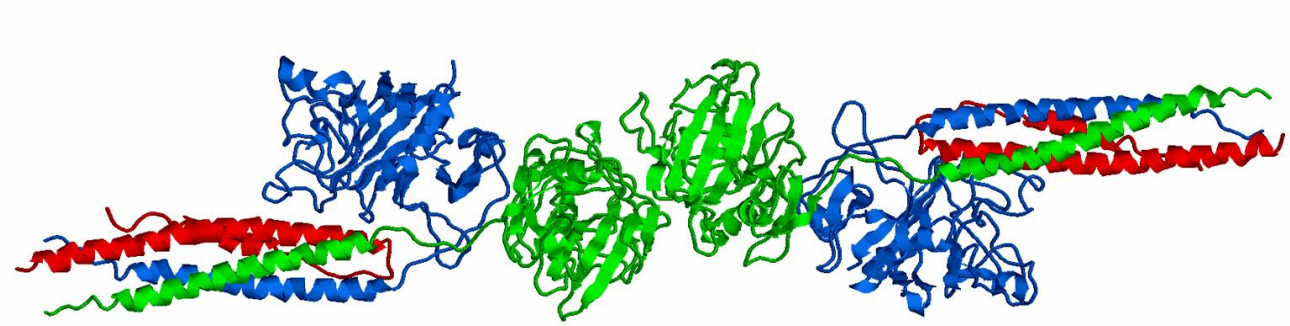
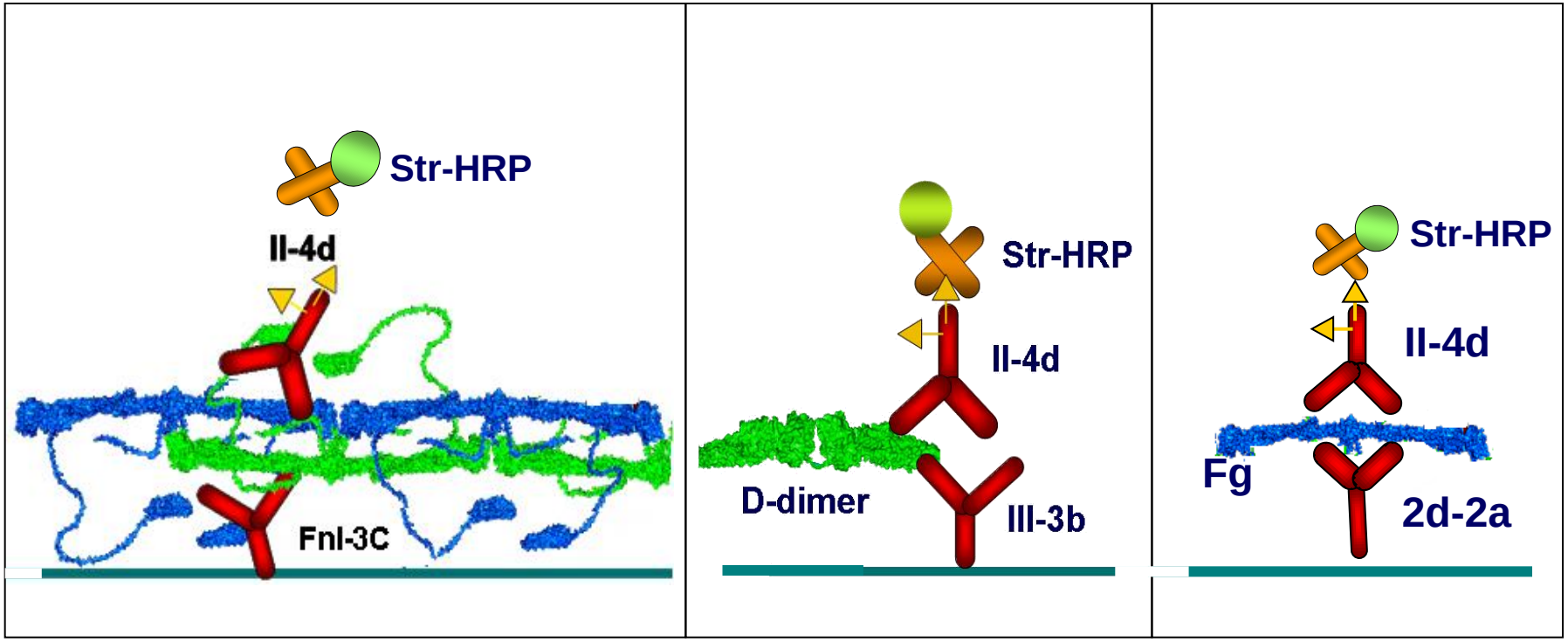


Схема D-димеру

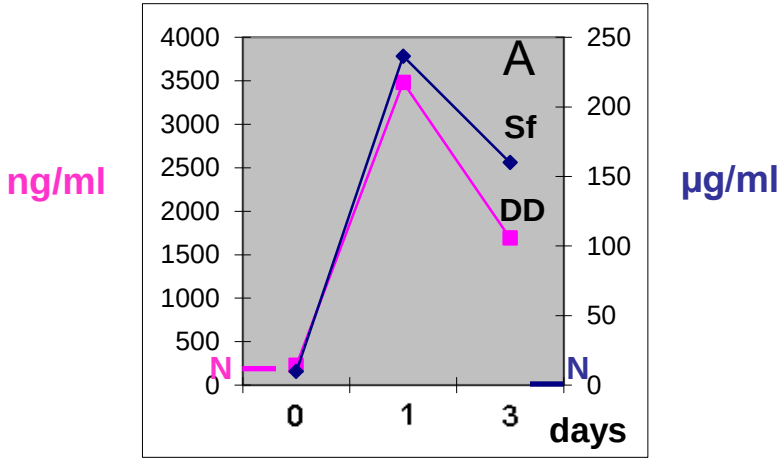


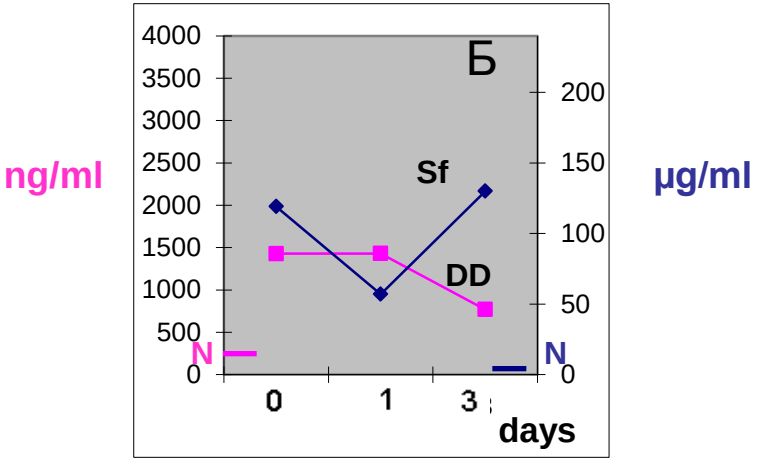
Схеми імуноферментних методів кількісного визначення розчинного фібрину, D-димеру и фібриногену в плазмі крові людини. Методи розроблено на основі «catch» монАТ FnI-3C, III-3b, 2d-2a та «tag» монАТ II-4d, отриманих в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України ***(Lugovskoy EV,… Komisarenko SV. Thrombosis Research, 2004).***

D-димер **фібриноген** **розчинний фібрин** **їх одночасне визначення**

Імунодіагностичні тест-системи, розроблені в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна та ТОВ “Діапроф-Мед”

Співвідношення концентрацій розчинного фібрину (Sf) та D-димеру(DD) у хворих (А, Б) при абдомінальній аневризмі аорти до операції, після операції та на 3-й день після операції



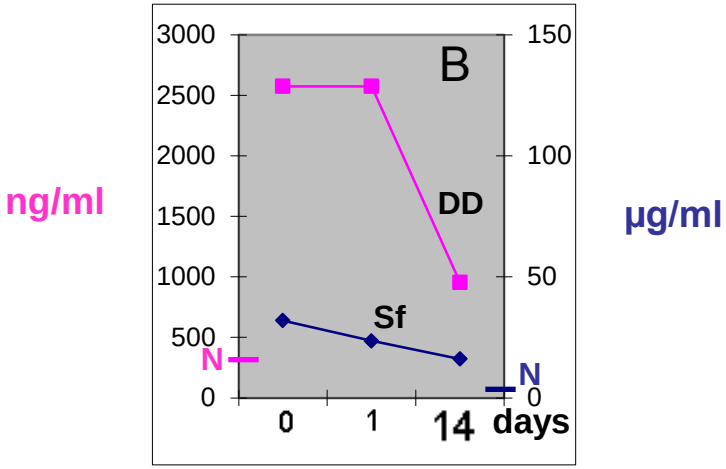


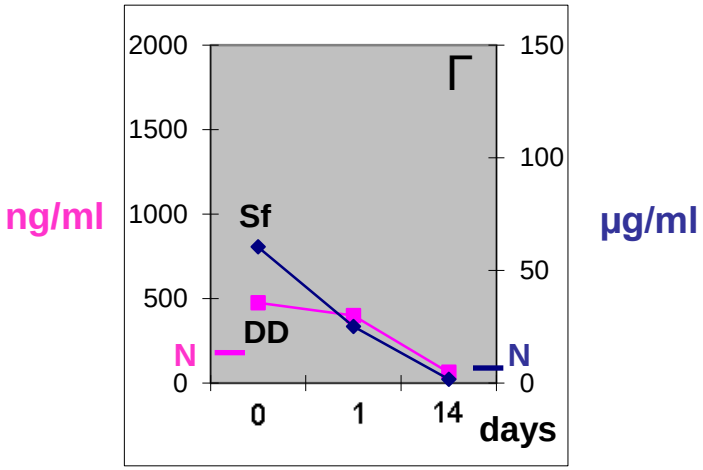
Sf, μg/ml (норма 3 μg/ml) D-dimer, ng/ml (норма 70 ng/ml)

*Значне підвищення концентрації розчинного фібрину в плазмі крові **хворого А** після операції супроводжується одночасним підвищенням концентрації D-димеру, що свідчить про баланс функціонування системи зсідання крові та фібринолізу. Однак, **хворий А** належить до групи ризику, оскільки на всіх етапах лікування концентрація розчинного фібрину залишається високою. Рекомендовано продовження антитромботичної терапії.*

*У **хворого Б** на перший день після операції спостерігалася нормалізація вмісту розчинного фібрину та D-димеру. Однак, на третю добу виявлено значне підвищення концентрації розчинного фібрину при одночасному зниженні вмісту D-димеру, що свідчить про загрозу тромбоутворення.*

Співвідношення концентрацій розчинного фібрину (Sf) та D-димеру (DD) у хворих (В, Г) при тромбозі глибоких вен до операції, після операції і на 14-й день після операції.





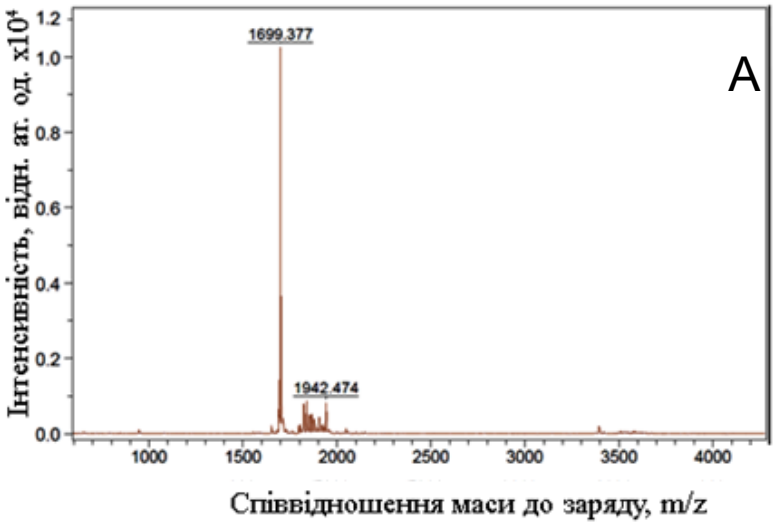
Sf, µg/ml (норма 3 µg/ml) D-dimer, ng/ml (норма 70 ng/ml)

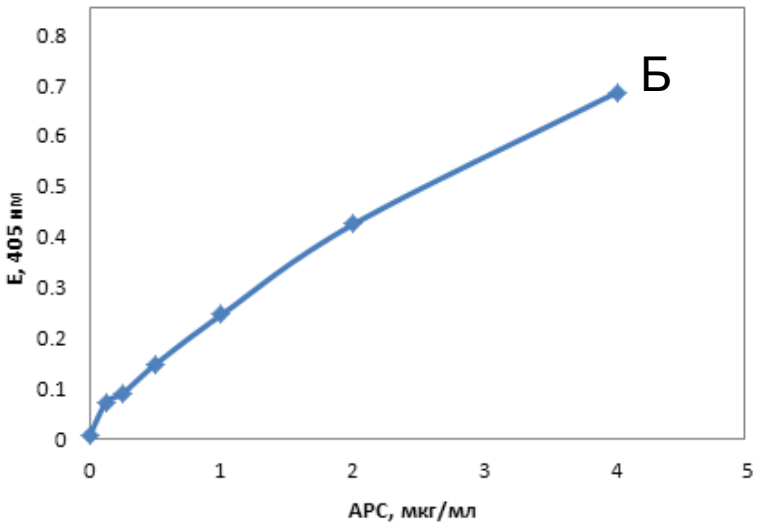
*Значно підвищений вміст D-димеру у **хворого В** до та після операції свідчить про існування в судинах твердофазного фібрину. Однак, значне зниження D-димеру на 14-ту добу свідчить про нормальне функціонування фібринолітичної системи. Враховуючи підвищений вміст розчинного фібрину на 14-ту добу, хворий потребує подальшого контролю.*

*У **хворого Г** спостерігали паралельне зниження вмісту розчинного фібрину та D-димеру, що свідчить про відсутність загрози тромбоутворення.*

Таким чином, для діагностики загрози тромбоутворення необхідно одночасне визначення вмісту розчинного фібрину та D-димеру на всіх етапах лікування.

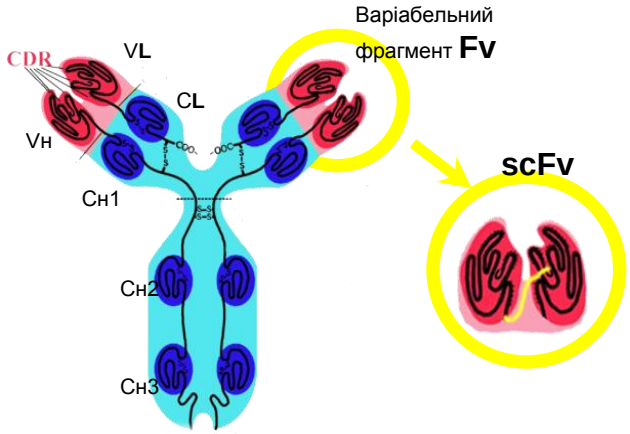
Мас-спектр синтетичного пептиду, що імітує послідовність Pro144-Leu155 протеїну С (А). Зв'язування активованого протеїну С (АРС) з монАТ IV-6А, адсорбованими на планшеті (Б).



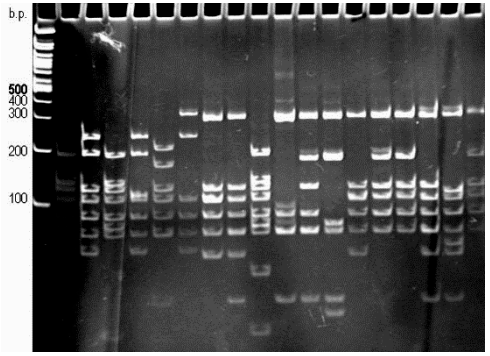


В 2014 р. було визначено унікальні фрагменти амінокислотної послідовності в молекулі протеїну С, які не мають гомології в молекулах інших факторів та протеїнів системи зсідання крові. Синтезовано пептид, що імітує одну з цих послідовностей.
Даний пептид було кон'юговано з різними білками-носіями. Кон'югати було використано для імунізації мишей. Отримано гібридоми, які синтезують високоафінні та специфічні до протеїну С моноклональні антитіла, а також отримано бібліотеку рекомбінантних антитіл. Синтезовано інший пептид, що імітує іншу унікальну послідовність протеїну С, отримано його кон'югати з різними протеїнами-носіями, які будуть використані в якості антигенів для отримання других моноклональних антитіл до протеїну С. ***Моноклональні та рекомбінантні антитіла будуть використані для розробки імуноферментного методу визначення концентрації протеїну С в плазмі крові людини.***

Одержано бібліотеку рекомбінантних одноланцюгових антитіл (scFv) людини представленістю понад мільярд різних специфічностей

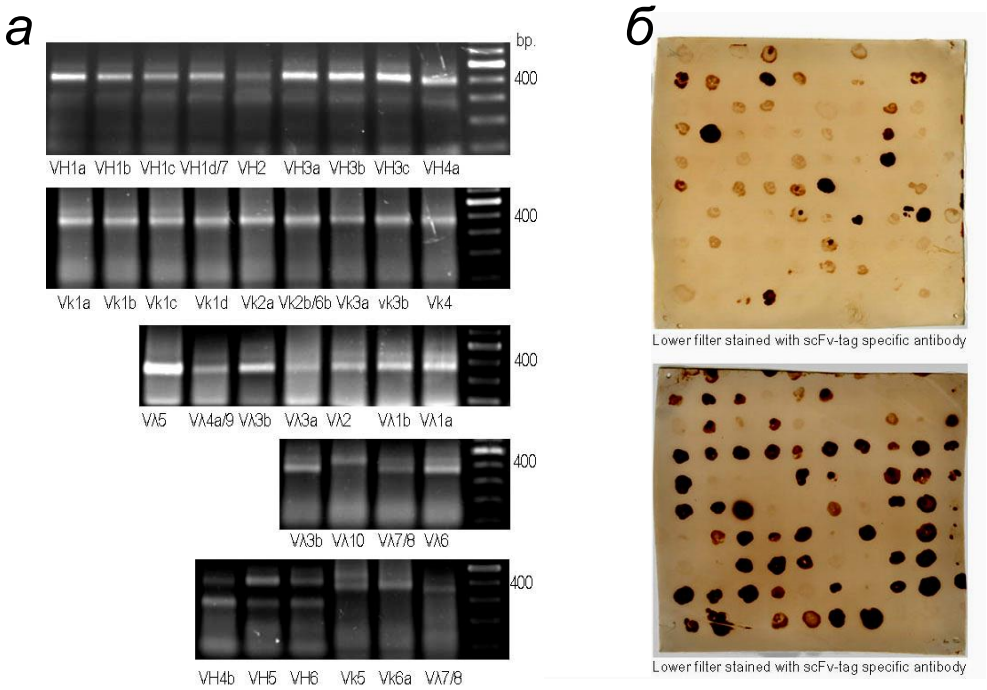


Рекомбінантний фрагмент антитіл scFv (single-chain variable fragment)



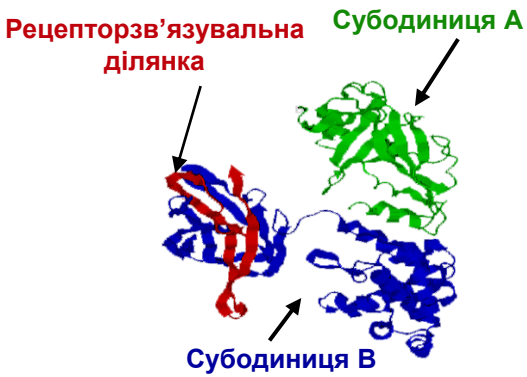
Рестриктний аналіз ДНК довільно обраних клонів підтвердив їх унікальність

Одержано 10 суббібліотек scFv-антитіл із варіабельними доменами легких ланцюгів к-типу і 10 – із VL-доменами λ-типу. Загальна кількість клонів склала 1,3 x10^9.

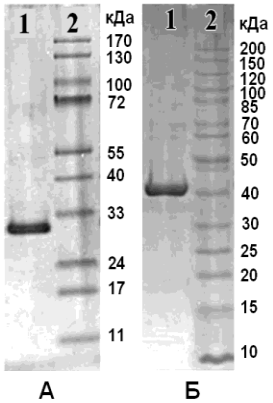


У бібліотеці представлені 12 родин VH-генів, 11 родин Vк-генів та 19 родин Vλ-генів (*а*). Функціональний розмір бібліотеки, тобто відсоток клонів, що експресують scFv-антитіла, становить близько 74,5% (*б*)

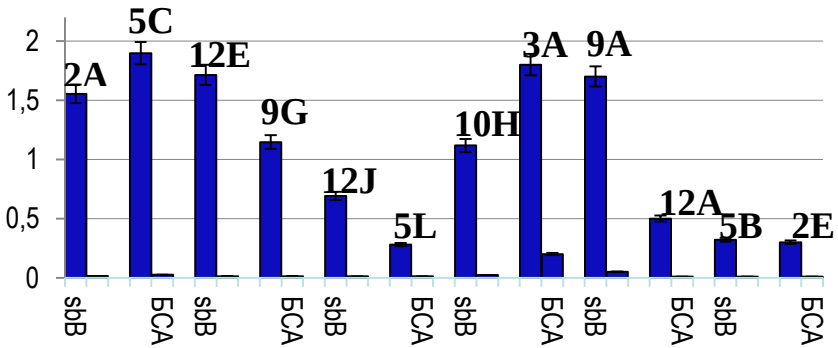
Одержання scFv-антитіл проти В-субодиниці дифтерійного токсину



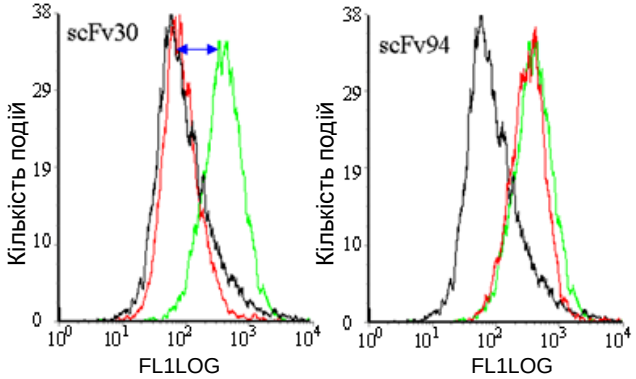
Окремі ділянки дифтерійного токсину відповідають за різні функції: субодиниця А реалізує токсичні ефекти в цитоплазмі, а субодиниця В відповідає за зв'язування токсину з рецептором та потрапляння субодиниці А до цитоплазми клітин-мішеней



Було одержано рекомбінантні фрагменти дифтерійного токсину: субодиницю А (А) та субодиницю В (Б), які були використані для селекції рекомбінантних scFv-антитіл до токсину



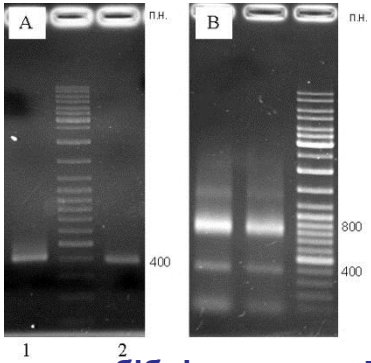
Імуноферментний аналіз одержаних scFv-антитіл людини, специфічних до субодиниці В дифтерійного токсину



scFv30 блокують взаємодію рецепторзв'язувальної ділянки дифтерійного токсину із клітинами-мішенями. Для порівняння наведено результати для scFv94, що не володіють нейтралізуючими властивостями. Усього було отримано чотири нейтралізуючі scFv-антитіла

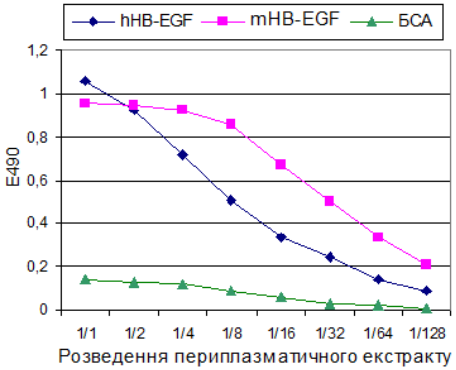
Рекомбінантні scFv-антитіла, специфічні до ростового фактору HB-EGF

Рецептор дифтерійного токсину – гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту (HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor) відіграє важливу роль у низці фізіологічних та патологічних процесів, зокрема - у формуванні пам'яті та пластичності нервових синапсів, утворенні серцевих клапанів, процесі імплантації бластоцисти. Також HB-EGF часто залучений до набуття клітинами злоякісного фенотипу: здатності до онкогенності, інвазивності, метастазування, стійкості до хіміотерапії.

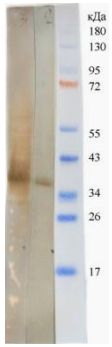


Отримання бібліотеки scFv-антитіл миші, імунізованої HB-EGF: А – ампліфіковані VH-(1) та VL-(2) послідовності, В – VH- та VL-послідовності, об'єднані у scFv

а

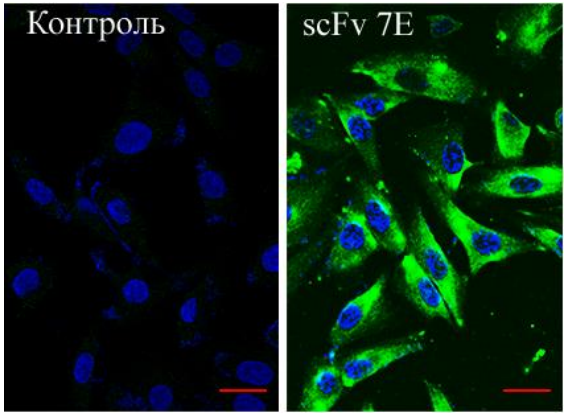


б

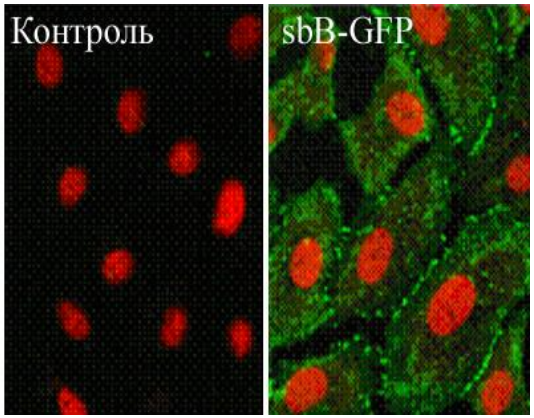


Зв'язування scFv-антитіл клону 7E з HB-EGF людини (hHB-EGF), миші (mHB-EGF) та контрольним антигеном (БСА) в імуноензимному аналізі (а). Імуноблотинг клітинного лізату клону-продуцента HB-EGF з використанням : 1 – антитіл до His-tag, 2 – scFv7E (б)

а



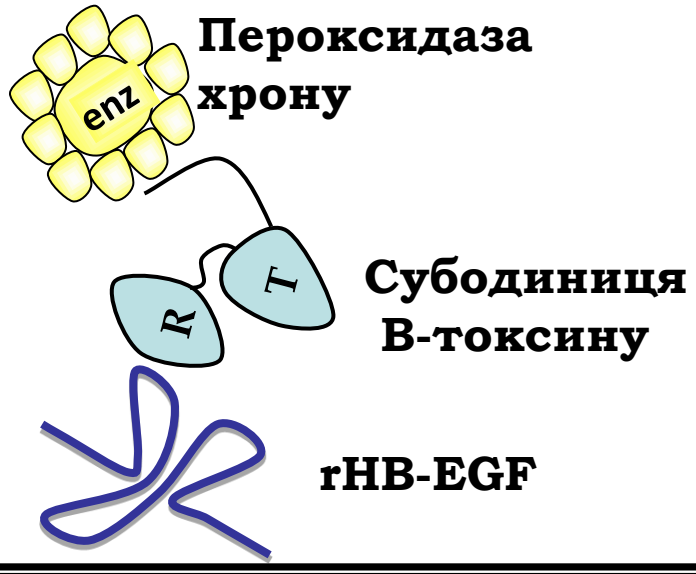
б



Забарвлення клітин лінії Vero, на поверхні яких експресований HB-EGF, scFv-антитілами 7E (а) та субодиницею B дифтерійного токсину, злитою з зеленим флуоресцентним протеїном GFP – sbB-GFP (б)

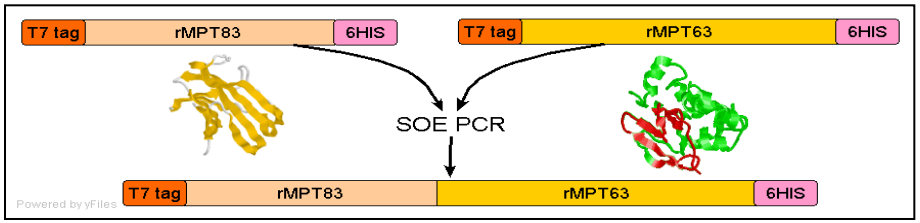
Одержано рекомбінантні scFv-антитіла, специфічні до ростового фактора HB-EGF, які можуть використовуватись у імуноензимному аналізі, імуноблотингу та в імуноцитохімії. Формат scFv розкриває можливості для їх подальшого використання у різноманітних дослідженнях in vivo та in vitro, а також, для створення терапевтичних та діагностичних препаратів.

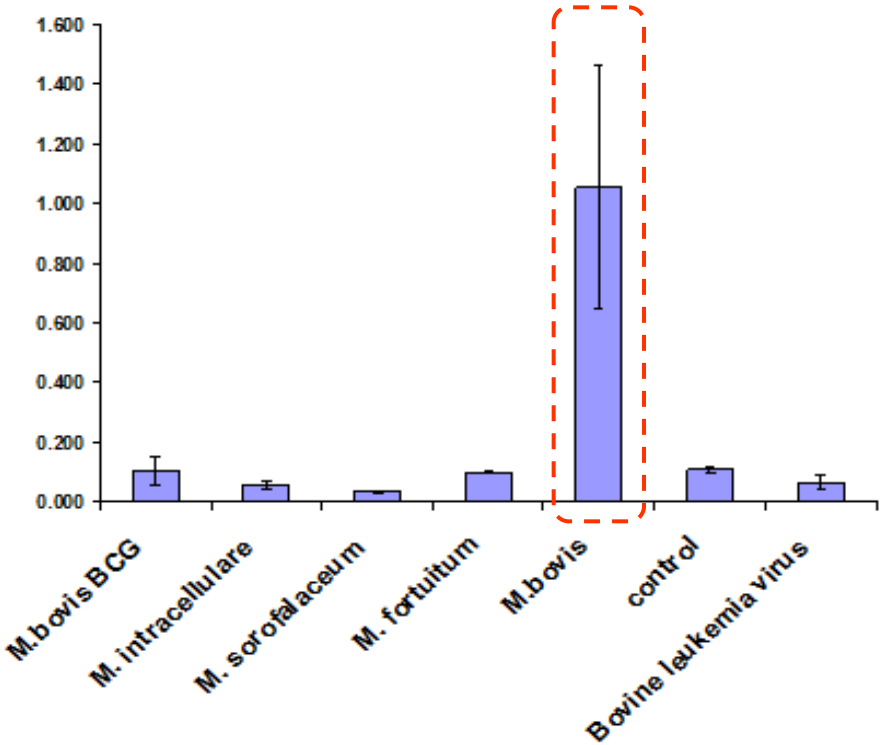
Тест-система “IBChem-DiTox” для визначення антитіл проти дифтерійного токсину



Використання рекомбінантного рецептору дифтерійного токсину (rHB-EGF) в якості нижнього шару (bait) та міченої субодиниці В-токсину - в якості верхнього шару (prey) дозволило методом конкурентного ІФА ідентифікувати антитоксичні антитіла з протективними властивостями

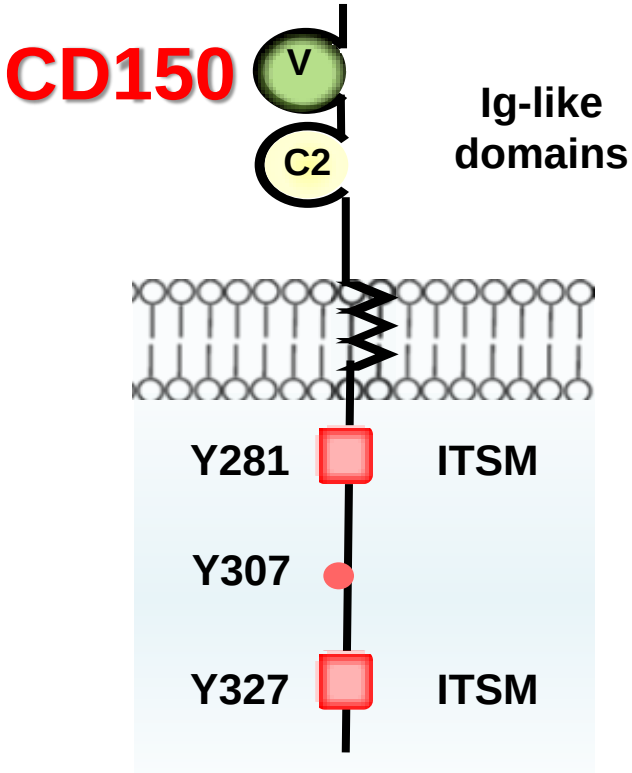
Тест-система “IBChem-M. bovis” для визначення антитіл проти антигенів *Mycobacterium bovis*





Химерний протеїн, що містить послідовності білків MPT63 та MPT83 мікобактерій, було використано для створення тест-системи для діагностики туберкульозу великої рогатої худоби

В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, завдяки отриманню монАТ до унікальних антигенів лімфоцитів людини, було започатковано наукові дослідження по ідентифікації цих антигенів, вивченню їх експресії та функцій, а також сигнальних каскадів клітин, що регулюють різні програми життєдіяльності клітин.



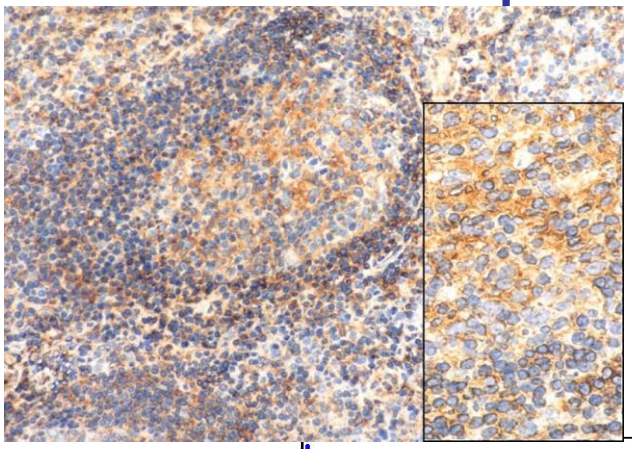
ITSM – immunoreceptor tyrosine-based switch motif TV/IYxxV/I

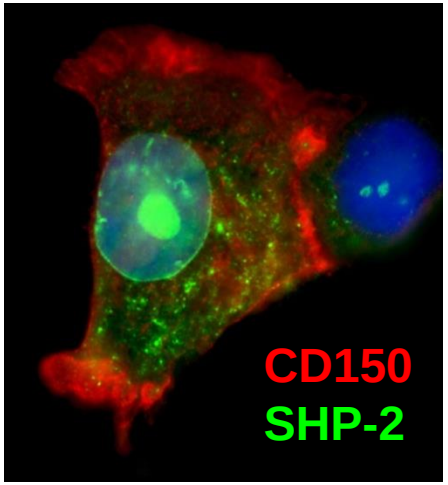
Колективу авторів цього Інституту належить пріоритет у

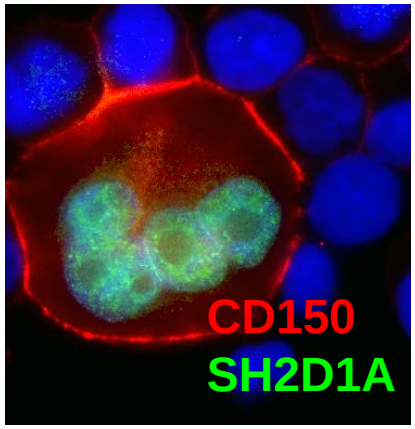
відкритті нового клітинного рецептора IPO-3, що в 1996 р. на VI Міжнародній Робочій Нараді по антигенам диференціювання лейкоцитів в Кобе (Японія) отримав міжнародну номенклатуру CD150 та ідентифікацію нового сигнального мотиву ITSM TV/IYxxV/I

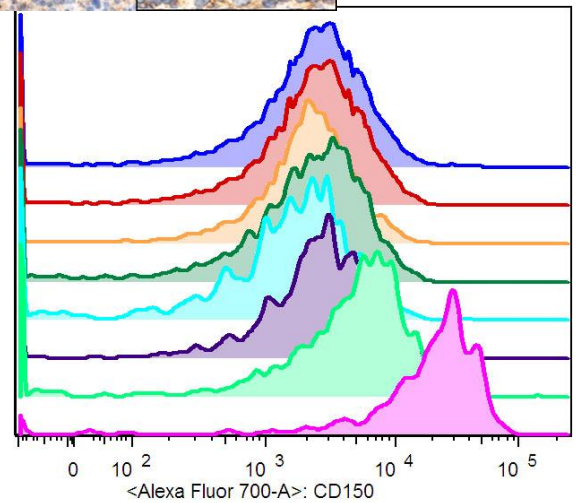
В результаті багатовекторних та комплексних досліджень було отримано цілісну картину структури, експресії та функцій CD150

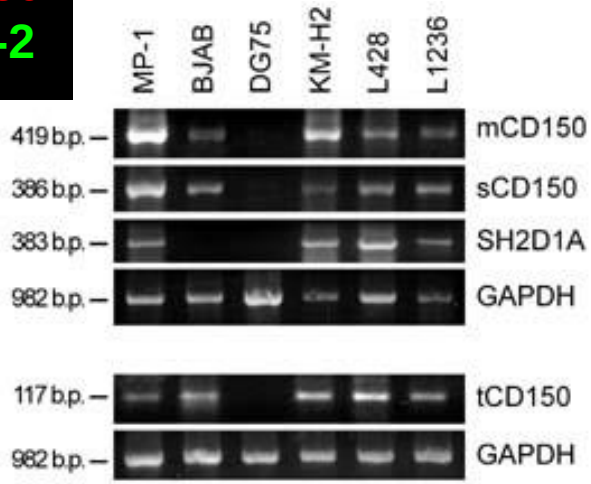
CD150 – маркер активованих Т- і В-клітин, моноцитів, дендритних клітин. CD150 експресується на злоякісних клітинах при волосатоклітинному лейкозі, 30% випадків хронічного лімфолейкозу, лімфомі Ходжкіна, неходжкінських злоякісних лімфомах з фенотипом активованих В-лімфоцитів.





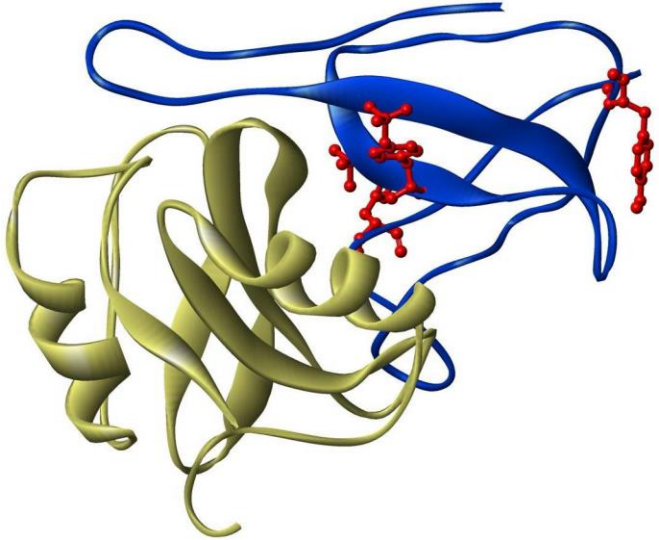


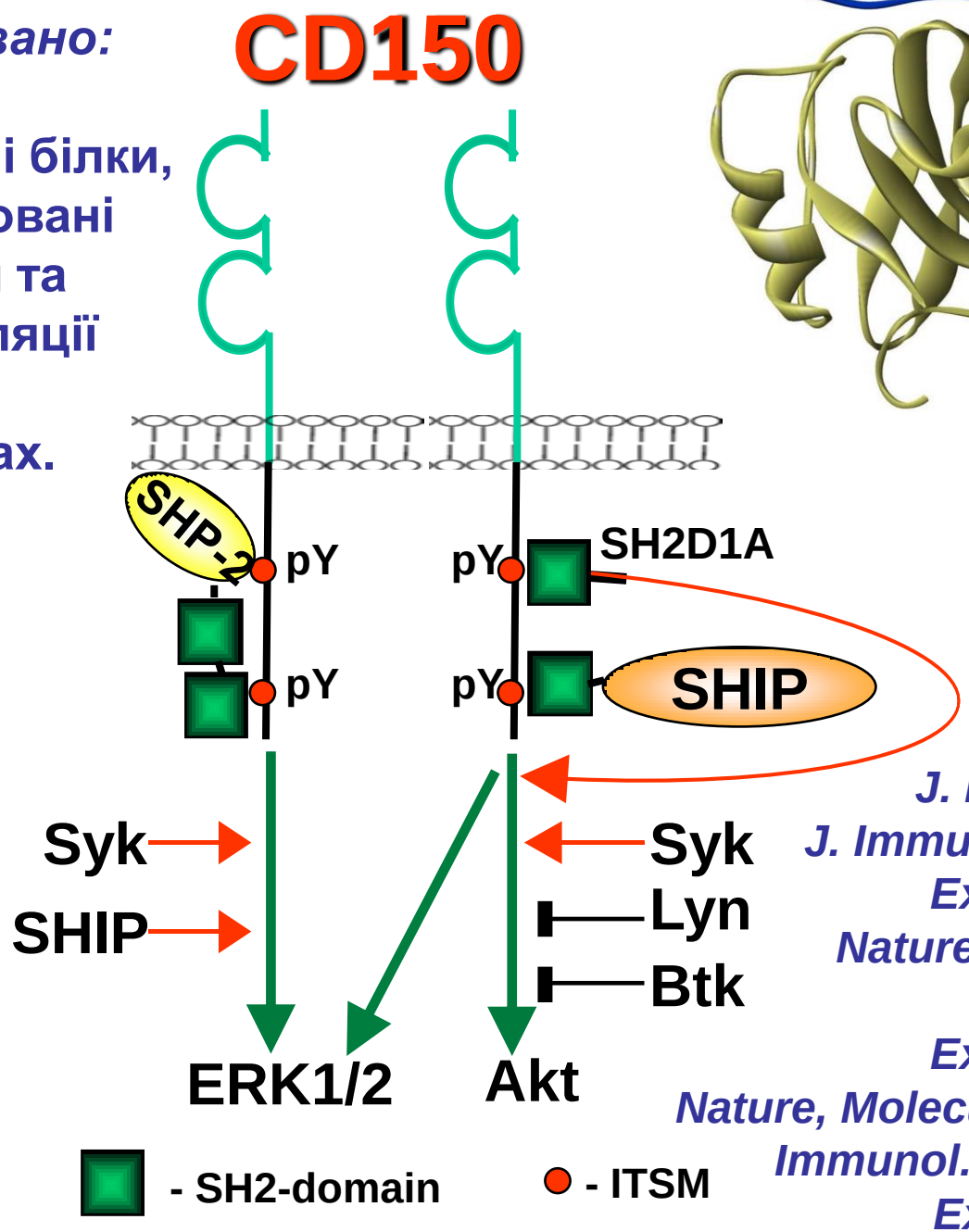




Було ідентифіковано:

CD150-асоційовані білки, CD150-опосередковані сигнальні каскади та механізми їх регуляції в нормальних та пухлинних клітинах.

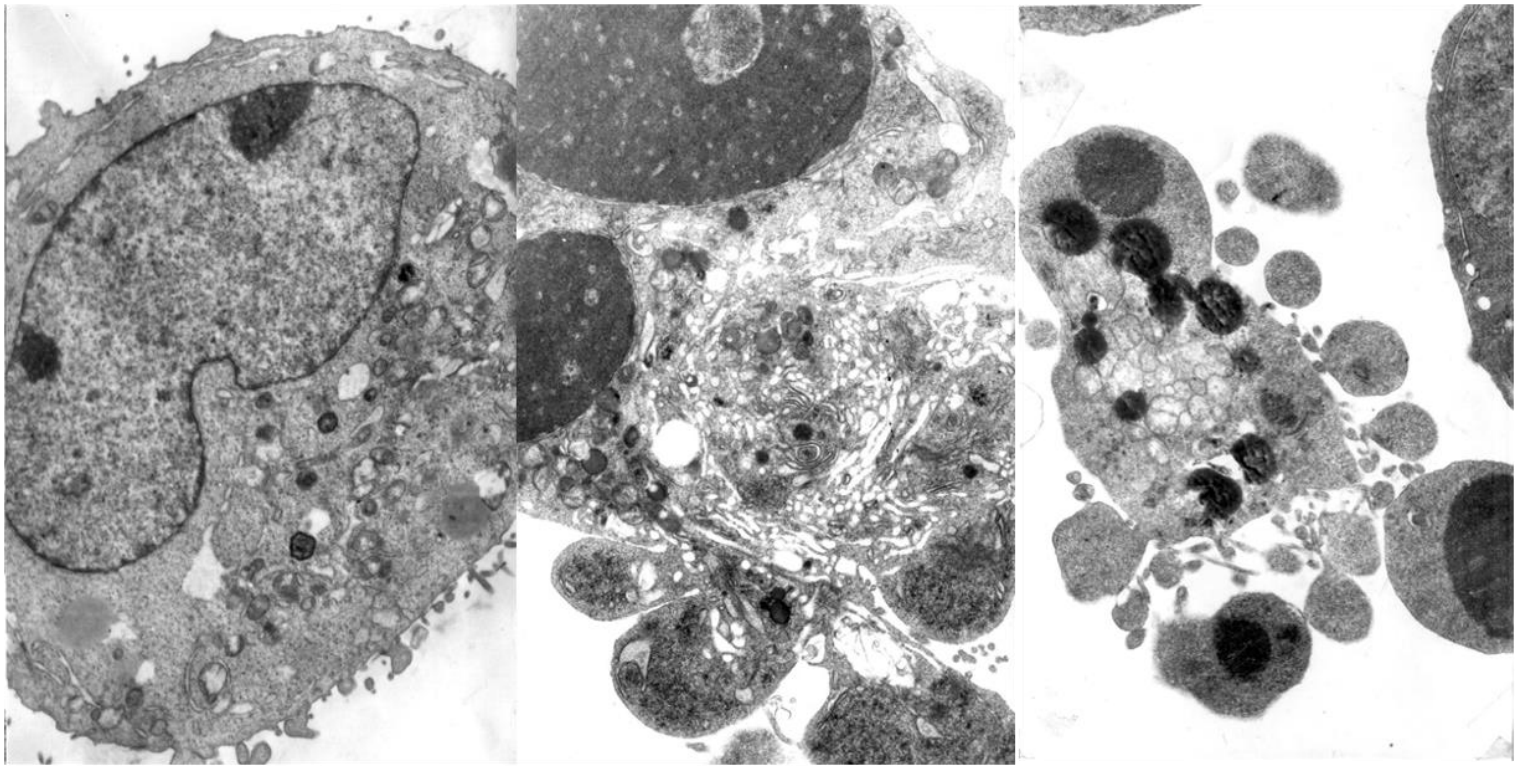




J. Immunol., 1993
J. Immunol., 1999,2001
Exp. Oncol., 2002
Nature Immunol. 2003
Blood, 2004
Exp. Oncol., 2005
Nature, Molecule Pages, 2009
Immunol. Cell.Biol., 2010
Exp. Oncol., 2011

Отримано монАТ IPO-4, що розпізнає антиген, через який в нормальних та пухлинних клітинах можна ініціювати запрограмовану смерть клітин, або апоптоз.

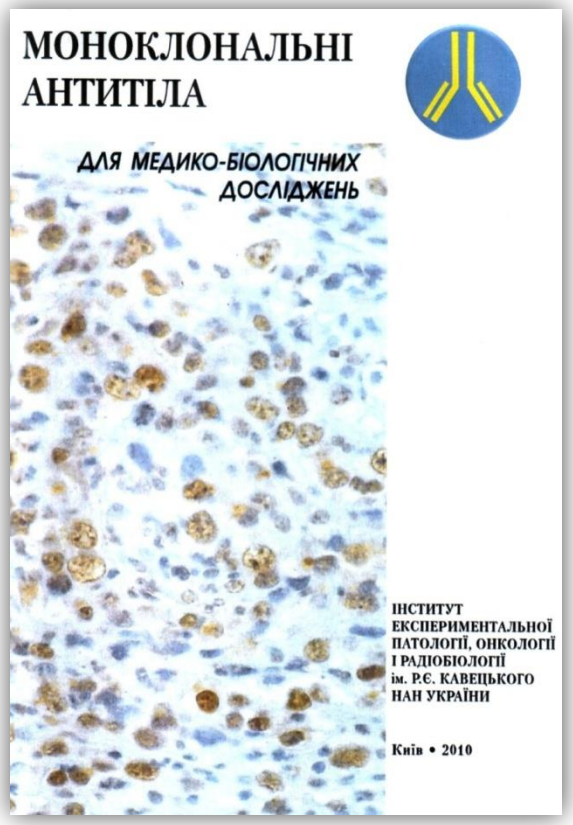
IPO-4 – CD95



В 1993 році в Бостоні (США) на V Міжнародній Робочій Нараді по антигенам диференціювання лейкоцитів цей антиген отримав міжнародну номенклатуру CD95.

CD95-опосередкований апоптоз

Anticancer Res., 1989
Neoplasma, 1992
J.Immunol, 1996,1999
Cancer Research, 1997а,1997в
Exp.Oncol., 1998,2000,2012



В ІЕПОР створено панель моноклональних антитіл із 123 найменувань, яку після завершення технічних, пре-клінічних та клінічних випробувань було внесено до Державного реєстру медичної техніки та виробів медичного призначення України і дозволено для застосування в медичній практиці

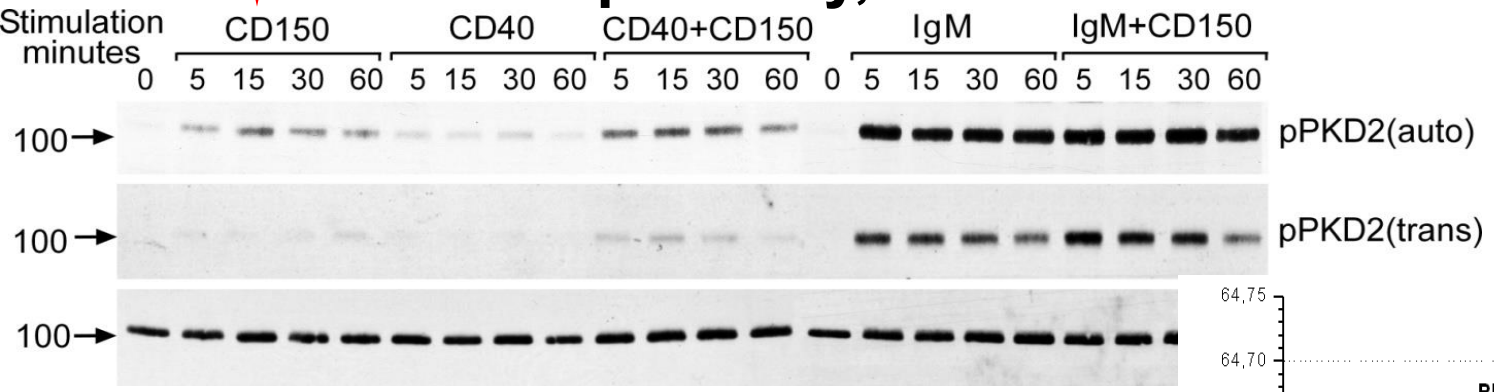
Державною службою України з лікарських засобів 9.12.2011 було видано Свідоцтво про державну реєстрацію №11072/2011 на “Антитіла моноклональні ТУ У 24.4-05416946-002:2011”

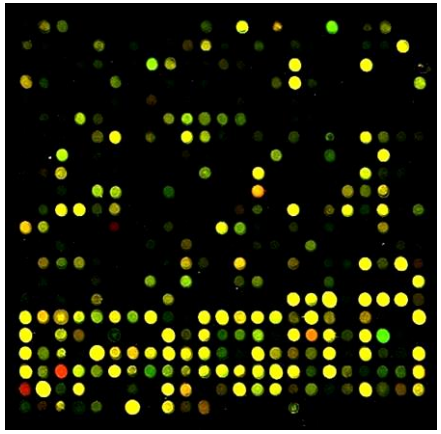
УКРАЇНА
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
СВІДОЦТВО ПРО ДЕРЖАВНУ РЕЄСТРАЦІЮ
№ 11072/2011
Медичний виріб
Антитіла моноклональні ТУ У 24.4-05416946-002:2011
в Додатку до даного Свідоцтва
Виробник
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної Академії Наук України
03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45 , Україна
по відповідає реєстраційним матеріалам, згідно з наказом Державної служби України з лікарських засобів від 14.12.2012 № 1050 внесений до Державного реєстру медичної техніки та виробів медичного призначення і дозволений для застосування на території України.
Строк дії свідоцтва необмежений
Перший заступник Голови
І.Б. Демченко
МП
MD
№033900

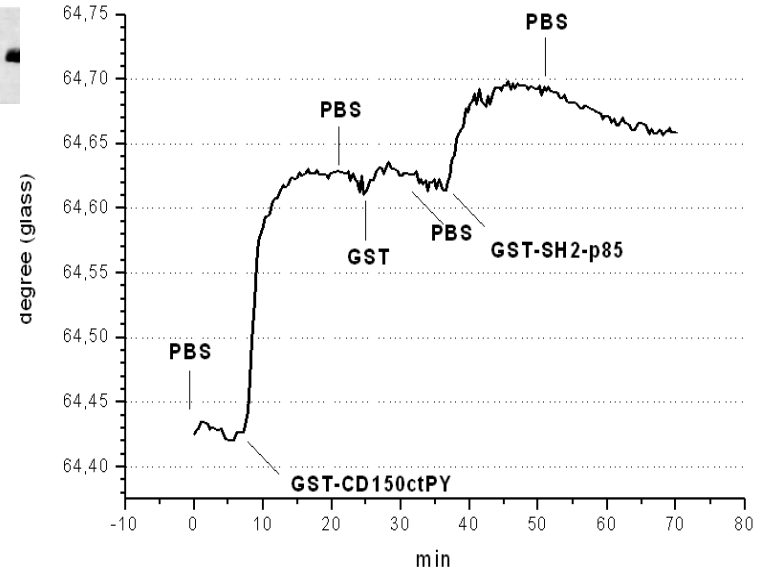
НАКАЗОМ ДЕРЖАВНОЇ СЛУЖБИ УКРАЇНИ З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ВІД 14.12.2012 р. № 1050 РОЗРОБКУ ВНЕСЕНО ДО ДЕРЖАВНОГО РЕЄСТРУ МЕДИЧНОЇ ТЕХНІКИ ТА ВИРОБІВ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ І ДОЗВОЛЕНО ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ (ЛІЦЕНЗІЯ MD № 033900)

ЗАСТОСУВАННЯ ВІТЧИЗНЯНИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

- Функціональні дослідження
- Аналіз сигнальних каскадів клітин
- Специфічне виділення клітин та білків
- Використання в біосенсорах
- Аналіз протеому, білкові чіпи

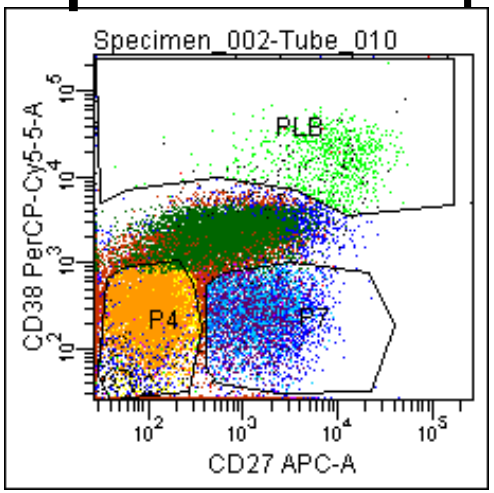


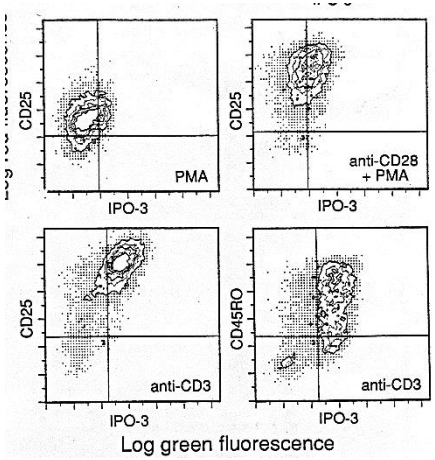


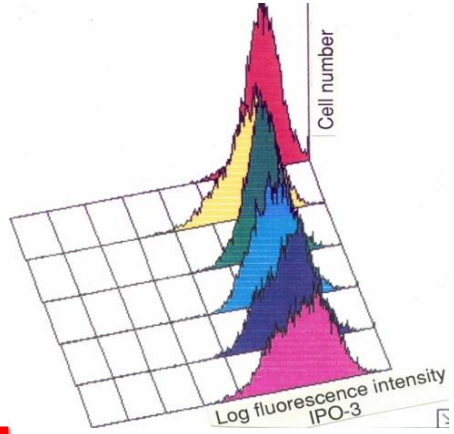


ЗАСТОСУВАННЯ ВІТЧИЗНЯНИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДЛЯ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- Імунофенотипування тканин та клітин крові
- Діагностика пухлин різного гістогенезу
- Діагностика лейкозів та лімфом
- Виявлення мікрометастазів
- Визначення імунологічного статусу та популяційного складу клітин імунної системи здорових людей та при захворюваннях різної природи
- Моніторинг імунологічного статусу хворих після трансплантації органів та лікування, в тому числі СНІД





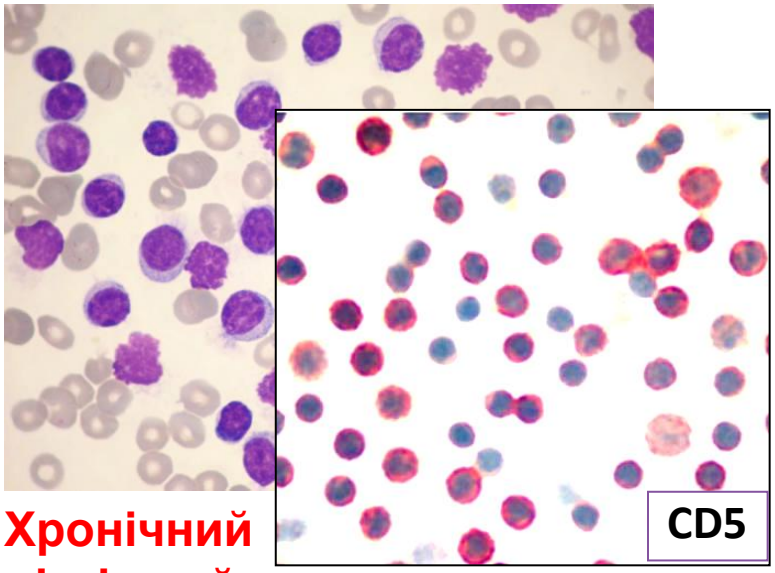


Проточна цитометрія

Кількість хворих на онкогематологічні захворювання за даними канцер-реєстру України та обстежених у відділі імуноцитохімії та онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у 2011-2012 рр.

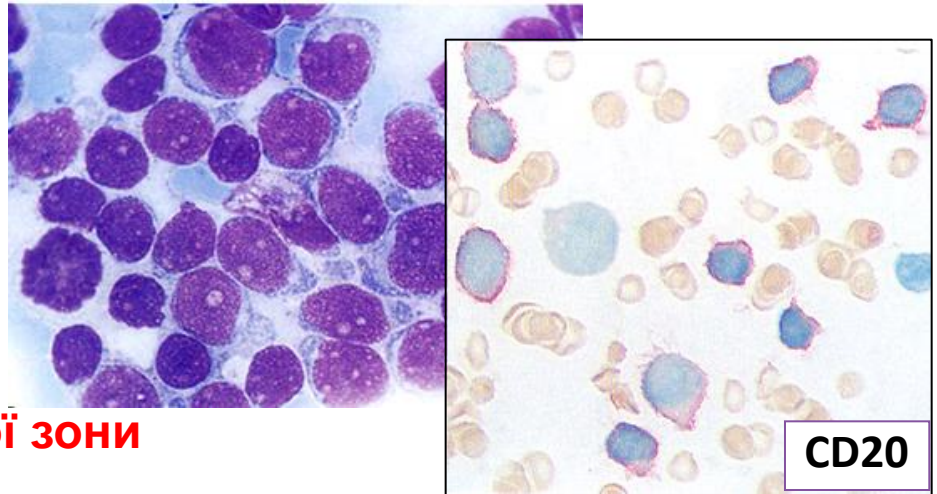
Форми гемобластозів	Роки дослідження	Дані канцер-реєстру України	Дані ІЕПОР	
			Кількість хворих	% по Україні
Всі онкогематологічні захворювання	2011 2012	8172 хворих 7925 хворих	1644 хворих 1939 хворих	21,06 % 24,50 %
Лейкемії	2011 2012	3728 хворих 3616 хворих	1196 хворих 1262 хворих	32,00 % 34,90 %
Неходжкінські злоякісні лімфоми	2011 2012	2465 хворих 2414 хворих	260 хворих 370 хворих	10,50 % 15,33 %
Множинна мієлома	2011 2012	791 хворих 769 хворих	91 хворих 141 хворий	11,50 % 18,34 %
Всього обстежено хворих за рік	2011 2012	-	2367 хворих 2632 хворих	-
Всього проведено аналізів за рік	2011 2012	-	5618 6283	-

В ІЕПОР НАНУ розроблено і впроваджено в клінічну практику алгоритми імуноцитохімічної діагностики гострих лейкозів мієлоїдного і лімфоїдного походження, мієлоїдних новоутворень і мієлодиспластичних синдромів (передлейкозів), а також різних форм лімфопроліферативних захворювань



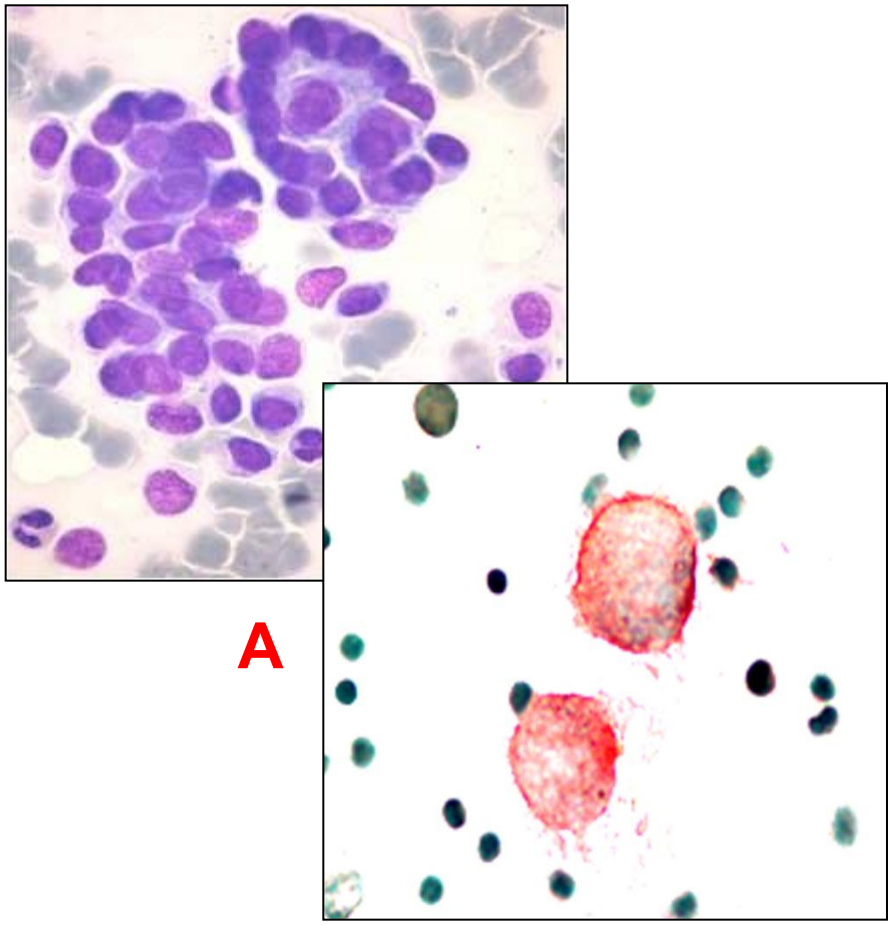
Хронічний лімфолейкоз

Бластне загострення хронічного мієлолейкозу



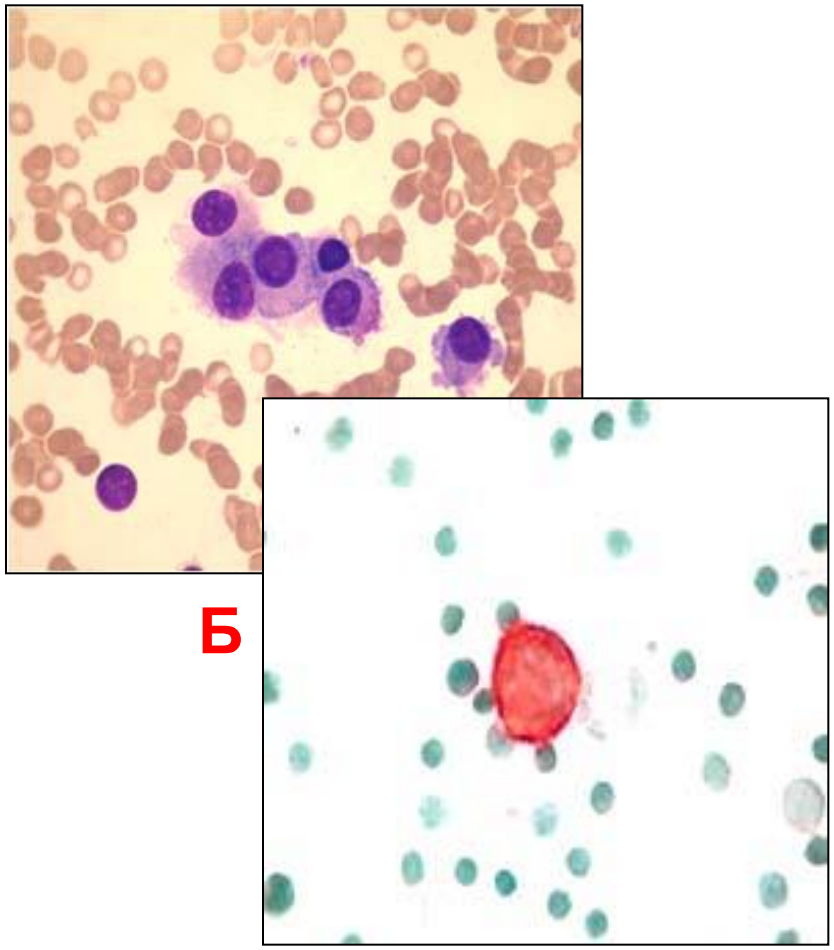
Лейкемізація НЗЛ із клітин мантійної зони

Цитоморфологічна діагностика метастатичних уражень кісткового мозку у хворих на рак підшлункової (А) і молочної залози (Б) та імуноцитохімічна ідентифікація поодиноких ракових клітин



А

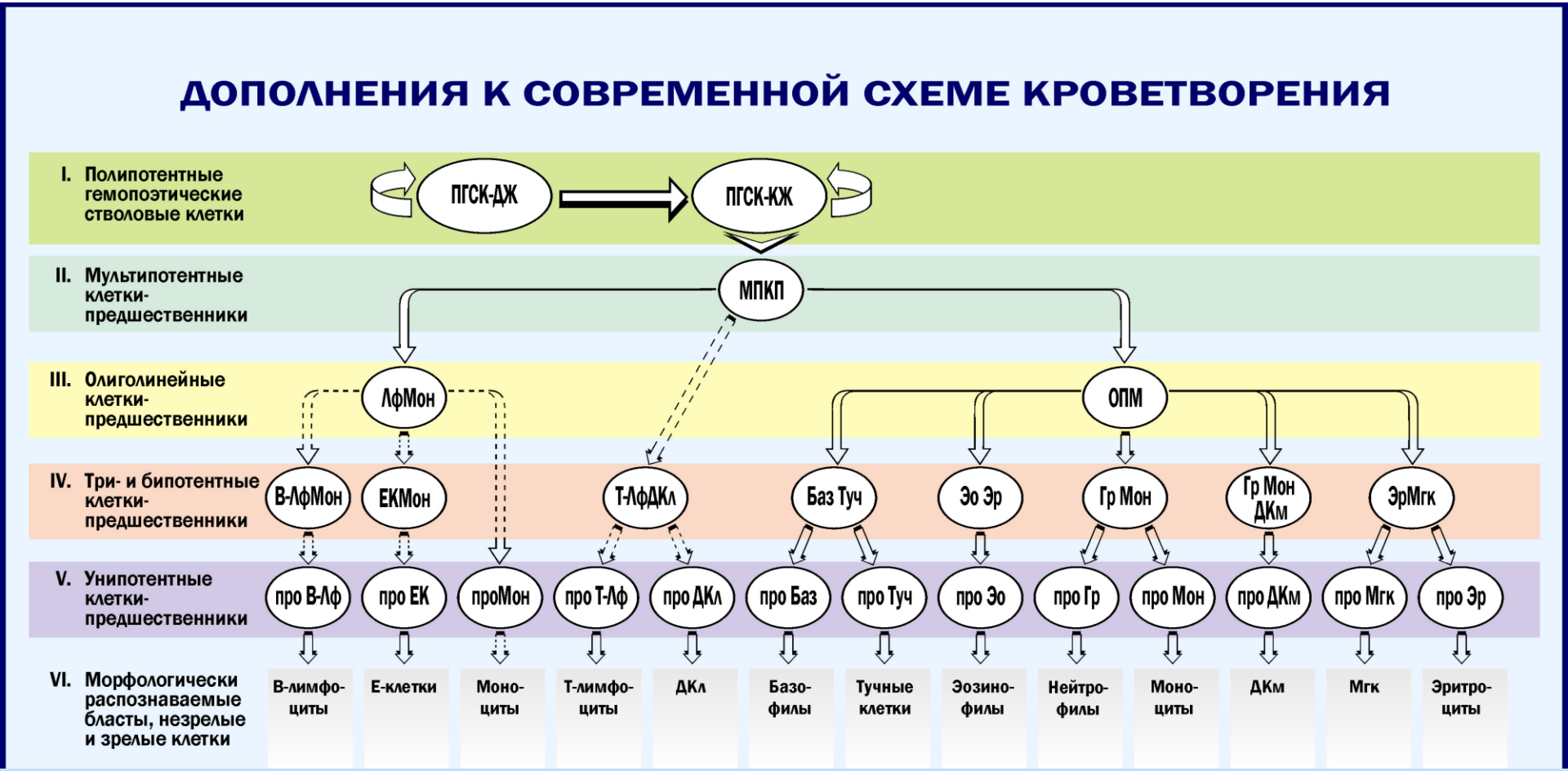
пан-цитокератин



Б

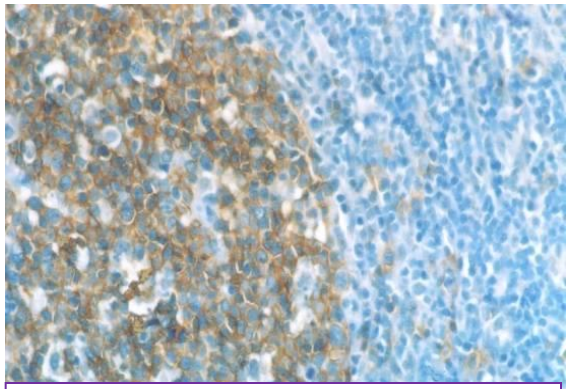
CD326/EpCAM

При вивченні лейкемічних стовбурових клітин запропоновано доповнення до сучасної схеми кровотворення і уточнення класифікації ВООЗ (2008р.)

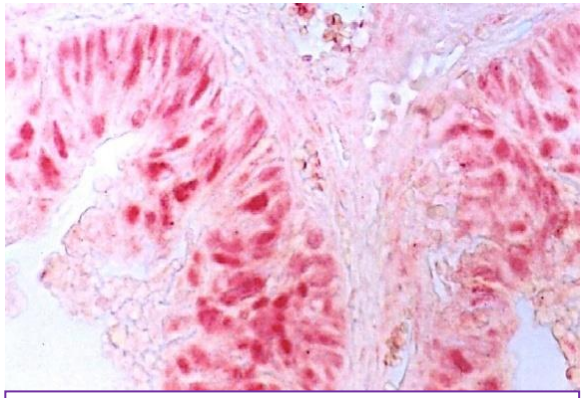


В оновленому вигляді схема кровотворення, крім класу поліпотентних гемопоетичних стовбурових клітин, повинна включати клас мультипотентних клітин-попередників, які, проходячи функціонально незворотні стадії дозрівання, дають початок оліголінійним клітинам-попередникам

Застосування вітчизняних моноклональних антитіл для диференційної діагностики злоякісних новоутворень різного гістогенезу

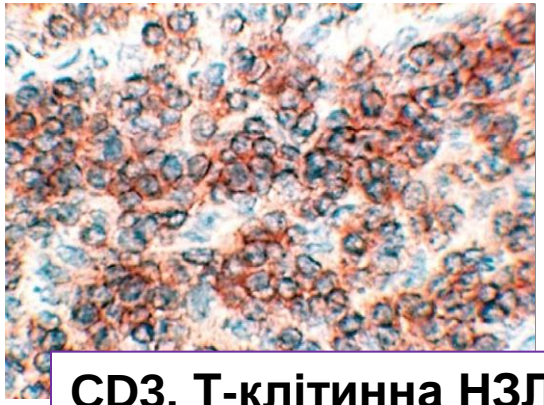


CD10, В-клітинна НЗЛ

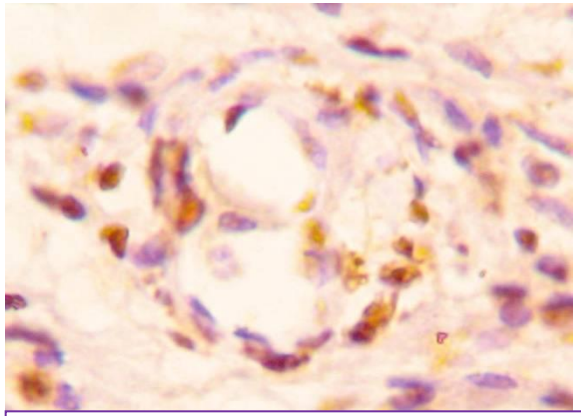


p53, рак прямої кишки

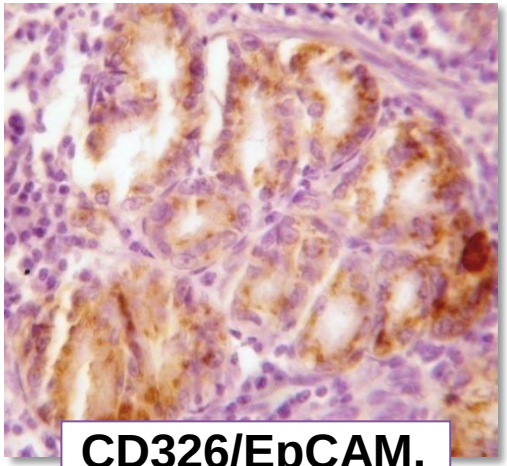
пан-цитокератин, аденокарцинома молочної залози



CD3, Т-клітинна НЗЛ



IPO-38, неоангіогенез при анапластичній астроцитомі



CD326/EpCAM, рак шлунка

Імуногістохімія

Впровадження вітчизняних МКАТ в Україні дозволило суттєво удосконалити арсенал діагностичних методів і знизити собівартість багатьох діагностичних тестів. В подальшому можлива повна заміна аналогічних закордонних монАТ, що використовуються для діагностики злоякісних новоутворень різного гістогенезу, лейкозів і лімфом, для визначення імунологічного статусу, діагностики клінічних проявів ВІЛ-інфекції та моніторингу ефективності терапії.

За результатами роботи отримано 17 патентів України, Свідоцтво про державну реєстрацію №11072/2011 на “Антитіла моноклональні ТУ У 24.4-05416946-002:2011”, захищено 6 докторських і 17 кандидатських дисертацій, опубліковано 10 монографій, 267 статей. Результати роботи представлено більш ніж на 150 закордонних та вітчизняних наукових конференціях. Згідно бази даних SCOPUS, результати роботи представлено в 197 реферованих роботах із загальною кількістю цитувань 2208, загальний h-індекс публікацій авторів становить 21.