

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 615.07

Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы

Т. Ю. Остроухова, В. А. Иванов, Е. Л. Морозова, Р. А. Иванов

ЗАО «БИОКАД», п. Любучаны, Чеховский район, Московская область

Поступила 30.09.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности, TCR, Tissue cross-reactivity) представляет собой скрининговое иммуногистохимическое исследование, которое обычно проводят на замороженных тканях человека и животных. Данное исследование обязательно для получения разрешения на клинические исследования в Российской Федерации любого инновационного терапевтического препарата на основе моноклональных антител или антителоподобных молекул, содержащих участок, определяющий комплементарность (complementarity-determining region, CDR). В данной статье представлены подходы для изучения и методические приемы для успешного проведения исследования тканевой перекрестной реактивности с примерами из собственного опыта авторов.

Ключевые слова: исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности) препарата (TCR); моноклональное антитело; иммуногистохимический (ИГХ) анализ.

Библиографическое описание: Остроухова ТЮ, Иванов ВА, Морозова ЕЛ, Иванов РА. Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 237–244.

Исследование тканевой перекрестной реактивности (кросс-реактивности, TCR) терапевтических препаратов на основе моноклональных антител или антителоподобных молекул обычно представляет собой скрининговое иммуногистохимическое исследование. Исследования данного типа необходимы для идентификации как ожидаемого, таргетного связывания в тканях человека, так и непредусмотренного, нетаргетного и нежелательного связывания биопрепаратов в тканях, но при этом специфического, т.е. опосредованного CDR-участком антитела, так называемой перекрестной реактивности, или кросс-реактивности. Таким образом, в ходе такого исследования могут быть выявлены новые мишени и сайты связывания в тканях, ранее неизвестные как содержащие искомым антиген. Кроме того, исследование кросс-реактивности может быть использовано для подтверждения и (или) подбора релевантного вида для проведения доклинических исследований, при использовании тканей животных соответственно. В связи с этим целью настоящей статьи было раскрыть основные подходы и методические приемы для успешного проведения данного типа исследований.

Данный тип исследования является обязательным для получения разрешения на клинические исследования I фазы для оригинальных препаратов в Российской Федерации (РФ) и за рубежом (в Европе, США и Японии). Ключевыми параметрами, необходимыми для успешного проведения TCR-исследования, являются следующие: материал — замороженные ткани человека и животных (например, нечеловекообразных обезьян), собранные и хранящиеся соответствующим образом; наличие правильно подобранных контролей: положительного контроля — клеток или тканей, экспрессирующих мишень (антиген), отрицательного контроля, и соответственно подобранный метод окрашивания. Далее мы остановимся на каждом из них.

Сбор, подготовка и фиксация тканей для исследования. В соответствии с требованиями РФ исследова-

ние перекрестной реактивности должно быть проведено на 26 типах нормальных тканей одного донора: миндалина, тимус, лимфатические узлы, костный мозг, клетки крови, легкие, печень, почки, желчный пузырь, селезенка, желудок, кишечник, поджелудочная железа, околоушная железа, щитовидная железа, паращитовидная железа, надпочечник, гипофиз, головной мозг, периферические нервы, сердце, поперечно-полосатые мышцы, яичник, яичко, кожа, кровеносные сосуды [1, 2]. Требования американского Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U. S. Food and Drug Administration, FDA) и Европейского медицинского агентства (European Medicines Agency, EMA) несколько иные: исследование должно быть проведено на 26 (EMA) или 32 (FDA) типах нормальных тканей от трех разных доноров, с использованием не менее двух концентраций биопрепарата и, обычно, в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики GLP [3, 4]. Причем хирургический материал, при условии, что ткань нормальная, является более предпочтительным (но обычно недоступным в реальных условиях), чем аутопсийный. Последний может быть использован в течение не более 24 ч с момента смерти, поскольку большинство эпителиев¹ не подвергаются аутолизу² в течение данного периода. В случае использования тканей животных, по требованиям FDA и EMA, но не РФ, рекомендуется использование не менее двух доноров для каждого типа ткани [6].

Для TCR-исследования чаще всего используют замороженные ткани. С точки зрения морфологии, качество срезов замороженных тканей часто хуже по сравнению с

¹ Эпитоп — часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром антител или T-клеточного рецептора [5].

² Аутолиз — распад белков тканей организма, происходящий под влиянием специфических клеточных ферментов этих тканей (каптепсинов и др.) [7].

заклученными в парафин, поэтому процесс замораживания тканей является критическим моментом в подготовке к исследованию. Сразу после извлечения кусочка ткани от донора необходимо погрузить его в специальную смесь «ОСТ» (смесь для оптимальной вырезки, optimal cutting temperature compound) и максимально быстро заморозить кусочек ткани в этой смеси в азоте. После такой шоковой заморозки кусочек ткани может быть помещен в сухой лед для последующей транспортировки к месту хранения.

Замораживание в сухом льду или морозильной камере от минус 80 °С до минус 20 °С может повлечь за собой образование больших кристаллов льда, которые ухудшают морфологию ткани и усложняют дальнейшую интерпретацию результатов. Замороженные ткани необходимо хранить при минус 80 °С в герметичных контейнерах в защищенном от света месте.

Толщина срезов, изготавливаемых на криостате, обычно составляет от 4 до 6 мкм, в нашей лаборатории традиционно — 5 мкм. Далее срезы, монтированные на стекле, помещают или в изотонический буфер или сразу подвергают фиксации. Поскольку последнее может повлечь за собой значительное изменение сохранности эпителиев и изменить характер иммуноокрашивания в ткани, то подбор правильного фиксатора очень важен. Хотя не существует единого фиксирующего агента, идеально подходящего для всех вариантов антигенов и одновременно позволяющего сохранить морфологию ткани, или, например, иммобилизовать растворимые антигены, короткий период фиксации обычно все же используется для замороженных срезов сразу после их получения. Таким образом, подбор фиксатора может быть проведен «индивидуально» в качестве этапа отработки метода, так как разные фиксаторы имеют различный механизм действия. В некоторых случаях в исследовании могут быть использованы нефиксированные ткани или фиксированные в формалине/параформальдегиде, заключенные в парафин, но такие случаи исключения из общего правила [6]. В нашей лаборатории традиционно используется ацетон: фиксация холодным ацетоном (минус 20 °С) в течение 10 мин, сушка на воздухе при комнатной температуре в течение 2–24 ч. Фиксированные срезы хранятся в защищенном от света месте от минус 70 °С до минус 80 °С.

Контроль сохранности морфологии и антигенов ткани. Нами принято проверять сохранность ткани и ее антигенов после получения, хранения и фиксации. Для этого можно использовать антиген повсеместно присутствующий во всех тканях в высокой концентрации, например, бета-2-микроглобулин, молекулу адгезии эндотелия и тромбоцитов 1 (или CD31, PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1), рецептор трансферрина (CD71). Отсутствие окрашивания ткани на один из таких антигенов является поводом выбраковки данной ткани (среза, кусочка) из исследования [6]. Нами традиционно используются антитела против бета-2-микроглобулина — низкомолекулярного белка, представляющего собой легкую бета-цепь антигенов HLA класса I, которые имеются на поверхности практически всех клеток тканей. Наличие специфического окрашивания на бета-2-микроглобулин позволяет предполагать (но не гарантировать) сохранность и других антигенов, в том числе искомого, в изучаемых в эксперименте тканях. Обычно специфическое окрашивание на бета-2-микроглобулин очень яркое (рис. 1).

Блокировка неспецифического связывания. Для снижения уровня фона используют различные белки (сыворотка крови, альбумин, казеин, иммуноглобулины) или

их смеси. Их наносят на срезы и инкубируют до нанесения первичных антител. Они могут связываться с Fc-рецепторами³ в тканях (если содержат иммуноглобулины), блокируя, таким образом, неспецифические (не CDR-опосредованные) взаимодействия терапевтического антитела, или могут насыщать сайты связывания белков в тканях, снижая вероятность адгезии различных реагентов тест-системы в тканях. Нами обычно используется готовая смесь — так называемый протеиновый блок, содержащий казеин.

Кроме того, важным пунктом блокировки неспецифического связывания является блокировка эндогенных ферментов (миелопероксидазы и тиропероксидазы, например), а в некоторых случаях и эндогенного биотина. Эндогенные ферменты реагируют с хромогеном и аналогичны пероксидазе хрена или щелочной фосфатазе. Последние используются в тест-системе в качестве детектирующих ферментов [6].

Положительный и отрицательный контроли исследования. Минимальным критерием приемлемости ИГХ-анализа и возможности его интерпретации является, во-первых, наличие окрашивания положительного контрольного материала (ткани, клеток) искомыми терапевтическими антителами. Во-вторых, отсутствие окрашивания отрицательного контрольного материала. В-третьих, отсутствие окрашивания как положительного, так и отрицательного контролей антителами отрицательного контроля (изотипическими, например), в той же концентрации и тем же выбранным методом. Таким образом, выбор соответствующей контрольной ткани, клеток или очищенного белка — это критический параметр успешного проведения исследования. Теоретически, идеальным положительным контролем исследования является нормальная ткань с высокой экспрессией искомого антигена. Но такая ситуация практически не встречается в условиях исследования. Например, экспрессия антигена в нормальной здоровой ткани может быть невелика, а возрастает только в патологических условиях, и чувствительность метода не позволяет выявить антиген. В этом случае можно использовать варианты тканей при этих заболеваниях [6].

Другие варианты положительного контрольного материала — это использование клеточных линий, экспрессирующих искомый антиген, или очищенного антигена. Здесь нужно помнить о некоторых ограничениях: экспрессия антигена в клеточной линии может быть выше, или ниже его экспрессии в нормальных тканях, или фон (или) неспецифическое окрашивание может быть иным, чем в нормальных тканях. Все это может привести к тому, что рабочая концентрация антител в разработанном методе будет не оптимизирована для окрашивания нормальных тканей, и, в конечном итоге, повлиять на интерпретацию результатов анализа [6].

В последнее время в нашей лаборатории используют клетки, экспрессирующие заданный антиген. Это могут быть клетки как нативно экспрессирующие антиген, так и трансфицированные им. Особенно это удобно в случае растворимых антигенов, которые после трансфекции локализованы в гранулах цитоплазмы, а также содержатся в более высокой концентрации, чем в нормальных тканях, что позволяет разработать пусть не идеальный, но соот-

³ Fc-рецепторы — поверхностные молекулы на разных типах клеток, которые связываются с Fc-фрагментом иммуноглобулинов [5].

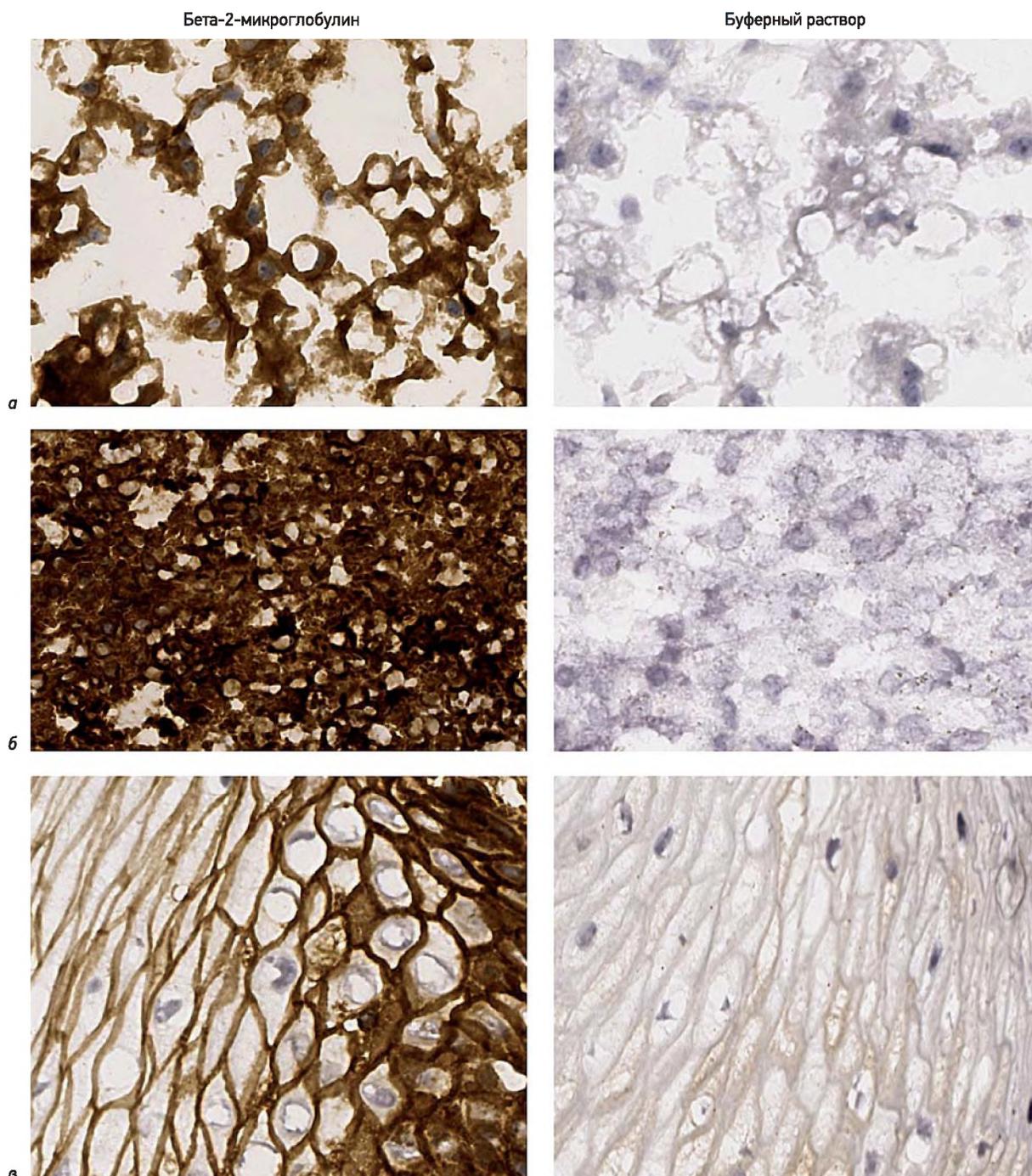


Рис. 1. Иммунопероксидазная идентификация бета-2-микроглобулина в нормальной ткани лимфоузла (а), селезенки (б) и мочевого пузыря (в) человека. Слева — использовали антитела к бета-2-микроглобулину в качестве первичных антител (опытный срез), справа — использовали буфер для разведения первичных антител (контрольный срез).

ветствующий критериям приемлемости вариант метода для проведения TCR-исследования.

Использование очищенного антигена, ковалентно связанного с матриксом, например, с агарозой или полистиреновыми шариками, также может служить хорошей альтернативой, если терапевтическое антитело направлено против антигена, не присутствующего в тканях в нормальных условиях, например, инфекционного или токсического агента.

Отрицательный контрольный материал не менее важен в исследовании, чем положительный, и, в идеале,

должен быть аналогичен по формату, что и положительный контрольный материал, но при этом не должен содержать искомым антиген, или антигены, сходные и (или) кросс-реактивные с искомым. Таким образом, отрицательный контрольный материал не должен окрашиваться исследуемыми терапевтическими антителами [6].

В TCR-исследовании необходимо различить (насколько возможно точно) специфическое связывание, опосредованное взаимодействием с CDR-участком терапевтического антитела, и неспецифическое связывание, опосредованное взаимодействием, например, с Fc-рецеп-

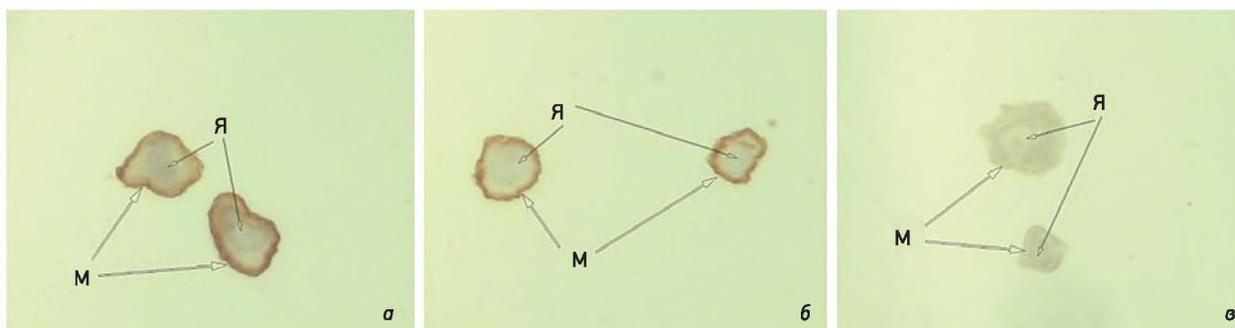


Рис. 2. Иммунопероксидазная идентификация антигена HER2 в клетках рака молочной железы BT-474 (положительные контрольные клетки в исследовании). В качестве первичных антител использовали: а — трастузумаб (производства ЗАО «Биокад»), меченный ФИТЦ; б — Герцептин®, меченный ФИТЦ, в — контрольные антитела — IgG человека, меченные ФИТЦ. Я — ядро клетки, М — мембрана клетки.

торами в тканях. Поскольку терапевтические антитела, используемые в TCR-исследованиях в качестве первичных антител, обычно являются гуманизированными или полностью человеческими, то неправильно ориентироваться на разницу между окрашиванием терапевтическими антителами и фоном, получаемым при окрашивании с заменой первичных антител на буферный раствор, как это принято при использовании нечеловеческих антител. Поэтому для того, чтобы интерпретации результатов и характера связывания была возможной, следует использовать соответствующие отрицательные контрольные антитела, обычно такого же изотипа, что и терапевтические антитела — изотипический контроль исследования [6]. В нашей лаборатории используются коммерческие изотипические контрольные антитела, которые представляют собой рекомбинантные человеческие антитела, выработанные к белку, не присутствующему в организме человека. Данные изотипические антитела имеют тот же изотип и конъюгированы с той же меткой, что и терапевтические. И при разработке типа метода, и подборе рабочей концентрации антител нами принято ориентироваться на разницу окрашивания положительного контрольного материала терапевтическими антителами и изотипическими контрольными антителами (фон). Фон должен быть ниже, чем специфическое окрашивание на ткани (клетках) положительного контроля (рис. 2, 3). В случае если терапевтическое антитело представляет собой мутантное антитело, или антителоподобную молекулу, то оптимальным отрицательным контролем является антитело или молекула, аналогичная по структуре, но не связывающаяся с человеческими эпитопами. Если в исследовании используется меченное терапевтическое антитело, то аналогичная метка должна быть и у антител отрицательного контроля.

Еще один вариант отрицательного контроля, который часто включается в TCR-исследование, это срезы тканей, на которые вместо первичных антител («опытных» или изотипических) нанесен буфер. Такой тип контроля дает информацию о фоновом окрашивании при нанесении всех остальных реактивов методики, кроме первичных антител (например, остаточной эндогенной пероксидазой) или характерном для самой ткани (например, при наличии пигментов) [6].

Выбор метода окрашивания и подбор концентрации антител. Не существует единого оптимального метода для всех типов исследуемых антител. Концентрации исследуемых терапевтических антител (обычно гуманизированных или полностью человеческих), используемые в TCR-исследовании, обычно имеют диапазон 0,5–50 мкг/мл. В то же время, концентрации эндогенных иммуноглобули-

нов IgG, присутствующих в организме и тканях человека, превышают эти концентрации во много раз. Таким образом, выявление специфического связывания исследуемого антитела с тканями человека в присутствии высоких концентраций эндогенных человеческих антител является очень непростой задачей. Именно поэтому метод окрашивания с использованием такого рутинного реактива, как меченный антител против человеческих иммуноглобулинов типа G (IgG), в данном случае не подходит из-за появления высокого фона окрашивания и, соответственно, невозможности правильно интерпретировать результаты исследования. В TCR-исследовании могут быть использованы как прямой, так и непрямой методы окрашивания. Прямой метод окрашивания характеризуется использованием терапевтического антитела, ковалентно связанного с меткой (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, биотин), без использования каких-либо вторичных антител. В этом случае, для выявления антител может быть использован соответствующий субстрат хромогена (диаминобензидин (ДАБ) для пероксидазы хрена, тетразолий нитросиний хлористый для щелочной фосфатазы) или авидин/стрептавидин, меченный ферментом (обычно пероксидаза хрена), если метка биотиновая. Последний вариант характеризуется более высокой чувствительностью метода по сравнению с первым. В случае непрямого метода окрашивания используются вторичные и даже третичные антитела для выявления искомого терапевтического антител. Например, когда терапевтическое антитело предварительно конъюгирует с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) и выявляют с помощью антител против ФИТЦ. В некоторых редких случаях, могут быть использованы вторичные меченные антитела против человеческих иммуноглобулинов типа G4 (IgG4), если первичное терапевтическое антитело представляет собой IgG4, так как концентрация иммуноглобулинов этого типа по сравнению с остальными типами в организме человека невысока, и фон неспецифического окрашивания получается довольно низкий. Иногда для исследователей доступны анти-идиотипические антитела, т.е. связывающиеся с гипервариабельным участком⁴ терапевтического антитела. В таком случае, если сайт их связывания в гипервариабельном регионе не перекрывается с сайтом, связывающим антиген, то они могут быть использованы как вторичные антитела в ИГХ-исследовании. Третичные антитела, меченные фер-

⁴ Гипервариабельная область (участок) — наиболее вариабельные области V-доменов иммуноглобулинов и цепей T-клеточного рецептора. Вариабельные области расположены в дистальной части V-домена и формируют антигенсвязывающий центр [5].

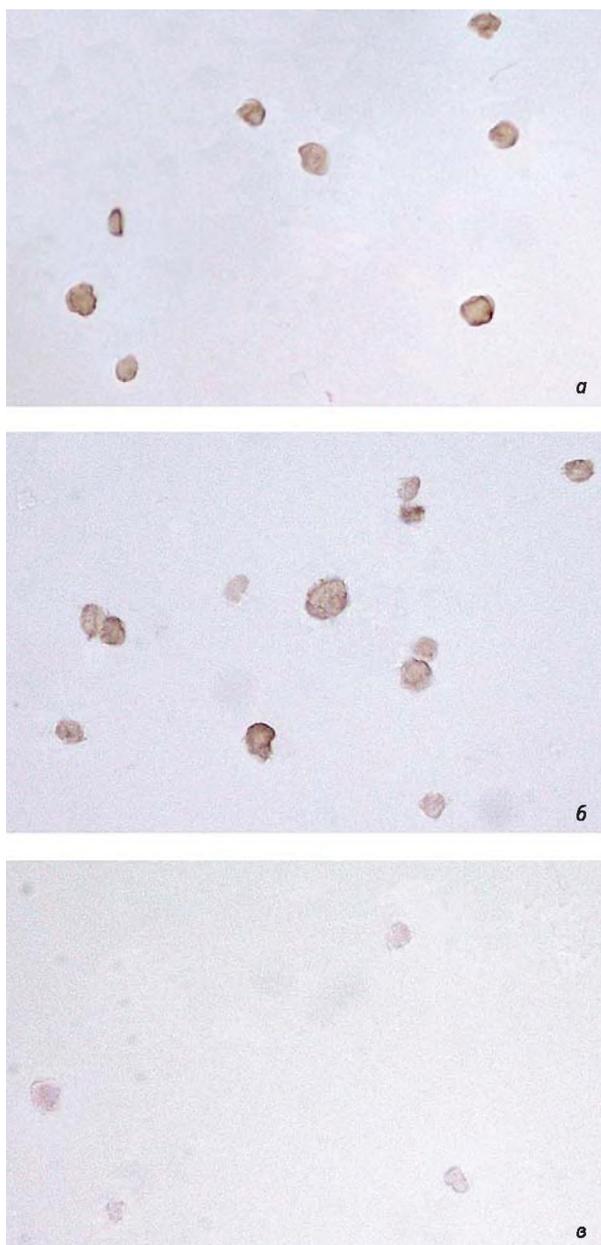


Рис. 3. Иммунопероксидазная идентификация антигена ФНО α в клетках CHO-FIpn cl.41, экспрессирующих ФНО α . В качестве первичных антител использовали: а — препарат Адалимумаб, меченный биотином (ЗАО «Биокад»), б — препарат Хумира® (производства «Эбботт Лэбораториз Лтд», Великобритания), меченный биотином, в — контрольные изотипические антитела, меченные биотином.

ментной меткой или биотином, используются для выявления антиидиотипических антител (обычно мышиных или кроличьих) [6].

Решение по выбору оптимального метода обычно основывается на опыте лаборатории и нацелено, с одной стороны, на сохранении высокого специфического сигнала, при одновременном наличии наименьшего фона и неспецифического окрашивания, с другой. В наших условиях чаще всего используется прямой метод иммуногистохимического окрашивания препаратом терапевтического антитела, предварительно меченного биотином, или непрямой метод с использованием ФИТЦ-метки, и, гораздо

реже, вариант с формированием предкомплексов. В случае метода предкомплексов, до нанесения антител на срезы в пробирке формируются комплексы из искомого терапевтического антитела, и меченных антител против человеческих IgG. В наших условиях обычно формируются такие комплексы при комнатной температуре в течение 30 мин и далее немедленно перемещаются на лед и хранятся при температуре 4 °С. Для блокирования неспецифического связывания на срезах анти-IgG антител, непосредственно перед нанесением данной смеси предкомплексов на срезы, в нее добавляют избыток человеческого иммуноглобулинов IgG. Нами обычно используется избыток в 300 раз человеческого гаммаглобулина. Эту смесь наносят на срезы и инкубируют как обычные первичные антитела. Вторичные антитела используют в зависимости от метки анти-IgG антител. Успех применения данного метода зависит от правильно подобранного соотношения всех трех компонентов смеси предкомплексов. Технически, это более сложный и неудобный метод, поэтому в нашей лаборатории используется крайне редко, лишь в случае, если другие варианты методов окрашивания показали неудовлетворительные результаты. С другой стороны, преимущество этого метода состоит в том, что в исследовании используется терапевтическое антитело, ни с чем не конъюгированное. Очень важно помнить о том, что конъюгируемое с меткой терапевтическое антитело по связывающим характеристикам может значительно отличаться от исходного. Поэтому рекомендуется предварительно проверять наличие и значимость изменений его антигенсвязывающих характеристик с помощью другого доступного метода (поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитофлуометрии, ИФА и т.п.).

Как уже было сказано выше, подбор концентрации терапевтических антител для окрашивания происходит опытным путем. В Европе и США требуется окрашивание тканей с использованием, как минимум, двух концентраций, одна из которых может быть названа «идеальной» — это наиболее низкая концентрация, при которой связывание максимально, т.е. соотношение положительного и отрицательного окрашивания максимально. Обычно это концентрация варьирует от 2 до 10 мкг/мл. По требованиям РФ достаточно использовать одну концентрацию, но принцип ее подбора точно такой же [6].

Оценка окрашивания исследуемым терапевтическим антителом и интерпретация результатов исследования. Для оценки результатов окрашивания и их представления в отчете учитываются такие параметры как: гистологическая характеристика клеточных элементов/типов окрашенных клеток, характер окрашивания (специфическое/неспецифическое окрашивание), субклеточная локализация (мембранная и (или) цитоплазматическая), а также степень (яркость) окрашивания.

Во время оценки результатов исследования и оценки окрашивания клеточных элементов (тканей) одним из самых важных пунктов является дифференцировка специфического, неспецифического или фонового связывания. Фоновое окрашивание характерно для данной конкретной ткани или используемого ИГХ-метода. Например, некоторым тканям (клеткам) свойственно иметь высокий фон, вследствие наличия эндогенных пигментов (гепатоциты и т.п.) или эндогенной пероксидазы (эозинофилы, тучные клетки и т.п.). Неспецифическое окрашивание, напротив, относится к избыточному окрашиванию первичными антителами (исследуемыми или отрицательными контрольными антителами), опосредованному неспеци-

фическими (не зависящими от CDR-участков) взаимодействиями антител с различными клеточными или внеклеточными элементами. Как уже отмечалось выше, это может происходить вследствие связывания с Fc-рецепторами тканей, или неспецифических гидрофобных или электростатических взаимодействий с тканями. Избыток первичных или вторичных антител обычно увеличивает неспецифическое связывание. В некоторых случаях требуется дополнительное подтверждение специфичности связывания. Для этого могут быть проведены отдельные так называемые «блокирующие TCR-исследования», суть которых заключается в добавлении или растворимого антигена в первичные антитела, или немеченого антитела, для снижения сигнала (окрашивания), если сигнал специфичен. Отсутствие снижения связывания говорит о неспецифичности сигнала (окрашивания) [6].

Для конечной интерпретации и оценки результатов исследования важно учитывать и пространственную локализацию антигена в клетке. Если это мембранный антиген, против которого направлено терапевтическое антитело, то специфическое окрашивание цитоплазмы клеток не должно вызывать больших опасений со стороны исследователей, так как «доступ» препарата при данной субклеточной локализации, скорее всего, будет очень низок или невозможен. Кроме того, существуют такие естественные барьеры, как, например, гематоэнцефалический, гематотестикулярный барьер и другие, которые характеризуются наличием специализированного эндотелия, снижающего переход антител и других крупных молекул сквозь него в орган [6].

Степень окрашивания характеризуется не только яркостью окрашивания, но и количеством окрашенных клеточных элементов (плотностью). В нашей лаборатории чаще всего используется 5-балльная шкала интенсивности: 0 (негативное) — нет окрашенных клеток; 1 — минимальное (слабое) окрашивание или <25 % окрашенных клеток; 2 — слабое (легкое) окрашивание или 25–50 % окрашенных клеток; 3 — среднее окрашивание или 50–75 % окрашенных клеток; 4 — интенсивное (яркое) окрашивание или 75–100 % окрашенных клеток. Кроме того, может быть использована бесплатная программа ImageJ⁵ для более объективной оценки, в случае, если гистолог или патолог, оценивающий окрашивание, пока не слишком опытный. Оценка может быть проведена также в программном обеспечении на таких типах специализированных приборов, как сканирующий микроскоп Aperio⁶ («Leica Biosystems», Германия). Но в этом случае необходимы довольно сложные предварительные настройки, чтобы оценка была проведена действительно объективно.

Алгоритм проведения исследования тканевой перекрестной реактивности. В нашей лаборатории разработан следующий план, по которому проводится данный тип исследования:

1. На доступном материале положительного и отрицательного контролей в качестве самопроверки отработывается окрашивание на искомый антиген коммерческими

антителами, для выявления характера окрашивания (мембранного и (или) цитоплазматического).

2. Изучаемый препарат терапевтических антител конъюгируется с ФИТЦ или биотином.

3. Обработка окрашивания изучаемым препаратом терапевтических антител (подбор условий, метода и концентрации антител) образцов положительных и отрицательных контрольных тканей (клеток). Общий характер окрашивания должен соответствовать получаемому с помощью коммерческих антител. В случае если метод с использованием меченных ФИТЦ или биотином терапевтических антител не дает удовлетворительных результатов, испытывается метод предкомплексов.

4. Сначала пробное (несколько тканей, например), затем полное (всех тканей, которые должны быть задействованы в эксперименте) окрашивание тканей антителами против бета-2-микрोगлобулина (анализ антигенной сохранности ткани).

5. Окрашивание интересующих тканей человека и приматов выбранным методом (собственно TCR-исследование).

6. Анализ окрашивания и представление результатов в балльной шкале.

Особенности использования результатов исследования. Заключение. Изначально TCR-исследование, имеющее цель изучить непредусмотренное связывание в тканях, было призвано предупредить исследователей в отношении потенциальных органов-мишеней для токсичности в доклинических и клинических исследованиях, на основе сравнения характера окрашивания тканей у животных и человека. Предполагалось, что интенсивность, распределение в тканях и частота окрашивания увеличивают вероятность токсичности в них *in vivo*. Но, по мере накопления данных и сопоставления результатов TCR-исследований и токсичности обнаружилось, что корреляция не всегда существует и не столь однозначна. Как оказалось, присутствие яркого окрашивания не всегда связано с какими-либо эффектами *in vivo* в этом органе или ткани. Причин для этого может быть несколько. Во-первых, не всегда вообще можно добиться окрашивания исследуемыми терапевтическими антителами даже тех тканей, в которых доказано (другими методами) наличие искомого антигена, так как терапевтические антитела не предназначены для ИГХ-анализа. Во-вторых, несмотря на наличие множества контролей в анализе, исключительно из результатов данного исследования не всегда очевидно, относится ли связывание к непредусмотренной, но специфической реактивности, неспецифическому связыванию, или является даже артефактом методики. В-третьих, такие процессы подготовки ткани к окрашиванию, как подсушивание и фиксация, а также блокировка эндогенной пероксидазы, могут изменить тканевые эпитопы или даже образовать новые химические структуры (эпитопы), не существующие *in vivo*. Одновременно, детектирование существующих *in vivo* эпитопов может быть затруднено по причине не очень высокой чувствительности метода или вследствие снижения доступа к ним или нарушения их пространственной структуры, например, из-за фиксации ткани. Поэтому связывание антител с антигенами в тканях *ex vivo* может отличаться от истинного, существующего *in vivo*, что и приводит к различиям в результатах исследований. В-четвертых, некоторые эффекты препарата *in vivo* могут напрямую не относиться к связыванию препарата в тканях.

Таким образом, поскольку окрашивание тканей *ex vivo* необязательно коррелирует с токсичностью в этих

⁵ ImageJ — свободно распространяемая программа, предназначенная для анализа и обработки изображений. Она написана на языке Java и создана командой разработчиков из National Institutes of Health. <https://imagej.nih.gov/ij/>.

⁶ Aperio — <http://www.leicabiosystems.com/digital-pathology/aperio-digital-pathology-slide-scanners/>.

тканях *in vivo*, TCR-исследование называется скрининговым и требует, порой, дополнительных анализов и исследований для выявления природы связывания (окрашивания). В некоторых случаях, когда TCR-исследование не может быть проведено по причинам невозможности разработать адекватный метод окрашивания, удовлетворяющий всем критериям приемлемости, и при наличии обоснования, то отсутствие результатов этого исследования в досье не должно препятствовать продвижению препарата далее, т.е. проведению клинических исследований [6].

Несмотря на все вышеперечисленные ограничения, сравнительное исследование перекрестной реактивности в тканях человека и животных все же может быть использовано для выбора релевантного вида животных для доклинических исследований. В этом случае исследование проводится сначала на тканях человека, и те же ткани, которые продемонстрировали связывание, могут быть взяты у животных для оценки характера связывания, и ими можно ограничиться. В случае если общий характер окрашивания тканей, типов клеток и субклеточной локализации антигена сопоставим или близок у изучаемого вида животных к человеческому, то именно он может быть предпочтителен для выбора как релевантного в доклинических исследованиях.

Поскольку результаты тканевой перекрестной реактивности по-разному коррелируют с результатами токсичности или эффективности препарата, то данный тип исследования необходимо рассматривать как скрининговый и вспомогательный, и результаты его должны быть оценены

и интерпретированы в дальнейшем только в общем контексте всех результатов о безопасности и фармакологической оценке препарата. Кроме того, данный тип исследования не проводится при необходимости сравнения изменений в производственном процессе препарата или смены клеточных линий-производителей, а также для биологических препаратов, не содержащих CDR-участок.

Литература

1. *Медицинские иммунобиологические препараты. Организация производства и контроль качества моноклональных антител. Методические рекомендации. Приложение № 2; МР 3.3.2.2359–08.*
2. *Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2015.*
3. *Guideline on Development, Production, Characterization and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products. Annex 1. EMEA; 2009.*
4. *Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. Appendix I. FDA; 1997.*
5. *Мейл Д, Бростофф Дж, Пот ДБ, Роутт А. Иммунология. М.: Логосфера; 2007.*
6. *Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, Rojko JL, MacLachlan TK, Chan CM, Galbreath EJ, Ndjfor AM, Blanset DL, Polack E, Cavagnaro JA. Use of Tissue Cross-reactivity Studies in the Development of Antibody-based Biopharmaceuticals: History, Experience, Methodology, and Future Directions. Journal of Toxicologic Pathology 2010; 38: 1138–66.*
7. *Петровский БВ, ред. Большая Медицинская Энциклопедия. 3-е изд. Т. 2. М.: Советская энциклопедия; 1975.*

Об авторах

Закрытое акционерное общество «БИОКАД» (ЗАО «БИОКАД»). Российская Федерация, 142380, Московская обл., Чеховский район, п. Любучаны, ул. Научная, 1.

Остроухова Татьяна Юрьевна. Заведующая лабораторией иммунологических методов отдела доклинических испытаний лекарственных средств, канд. биол. наук.

Иванов В. А. Научный сотрудник отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Морозова Елена Леонидовна. Руководитель отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Иванов Роман Алексеевич. Вице-президент по разработкам и исследованиям, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Остроухова Татьяна Юрьевна; ostrouhova@biocad.ru

The study of cross-reactivity of therapeutic drugs based on monoclonal antibodies on human tissues: basic approaches and methodological techniques

T. Y. Ostroukhova, V. A. Ivanov, E. L. Morozova, R. A. Ivanov

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, Russia

Tissue cross-reactivity (TCR) studies are screening immunohistochemical (IHC) assays, usually conducted on frozen human and animal tissues. This study is obligatory for getting the permission for clinical trials in Russia for all innovative therapeutic products based on monoclonal antibodies or antibody-like molecules that contain complementarity-determining region (CDR). In this article are represented approaches and methodical features for successful conduction of tissue cross-reactivity studies with examples from own authors' experience.

Key words: *tissue cross-reactivity (TCR) study; monoclonal antibody; immunohistochemical (IHC) assay.*

For citation: *Ostroukhova TY, Ivanov VA, Morozova EL, Ivanov RA. The study of cross-reactivity of therapeutic drugs based on monoclonal antibodies on human tissues: basic approaches and methodological techniques. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2016; 16 (4): 237–244.*

References

1. *Medical immunobiological preparations. The organization of production and quality control of monoclonal antibodies. Guidelines. Appendix № 2; MR 3.3.2.2359-08 (in Russian).*
2. *Rules for studies of biological drugs of the Eurasian Economic Union. 2015 (in Russian).*
3. *Guideline on Development, Production, Characterization and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products. Annex I. EMEA; 2009.*
4. *Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. Appendix I. FDA; 1997.*
5. *Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. Moscow: Logosfera; 2007 (in Russian).*
6. *Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, Rojko JL, MacLachlan TK, Chan CM, Galbreath EJ, Ndifor AM, Blanset DL, Polack E, Cavagnaro JA. Use of Tissue Cross-reactivity Studies in the Development of Antibody-based Biopharmaceuticals: History, Experience, Methodology, and Future Directions. Journal of Toxicologic Pathology 2010; 38: 1138-66.*
7. *Petrovsky BV, ed. Big Medical Encyclopedia. 3rd ed. V. 2. Moscow: Sovetskaya entsiklopedia; 1975 (in Russian).*

Authors

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Nauchnaya street 1, Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region 143280, Russian Federation.

Ostroukhova TYu. Head of the laboratory of immunological methods of the Preclinical Studies Department. Candidate of Biological Sciences.

Ivanov VA. Research associate of the Preclinical Studies Department.

Morozova EL. Head of the Department of preclinical trials of drug products.

Ivanov RA. Vice President, Research & Development. Candidate of Medical Sciences.