

РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева

Особенности GLP-исследований действия лекарственных веществ в условиях моделирования опухолевого микроокружения

Роговский Владимир Станиславович

2019

qwer555@mail.ru

Терапия опухолей

- Традиционная терапия (химиотерапия + ИИ + хирургия)
- Таргетная терапия (антитела к специфическим опухолевым маркерам)
- Иммуноterapia (чекпойнт-ингибиторы, 2011; технология CAR-T, 2017)

Опухолевое микроокружение

значимость иммунных факторов

- Для опухолевого окружения характерна локальная иммуносупрессия
- Механизмы опухолевой иммуносупрессии аналогичны механизмам иммуносупрессии в норме – в иммунопривилегированных органах
- При этом не наблюдается системной иммуносупрессии
- Актуальной является задача снятия локального «иммуносупрессивного блока» с целью стимуляции иммунологического отторжения опухоли – необходимость моделей *in vitro*

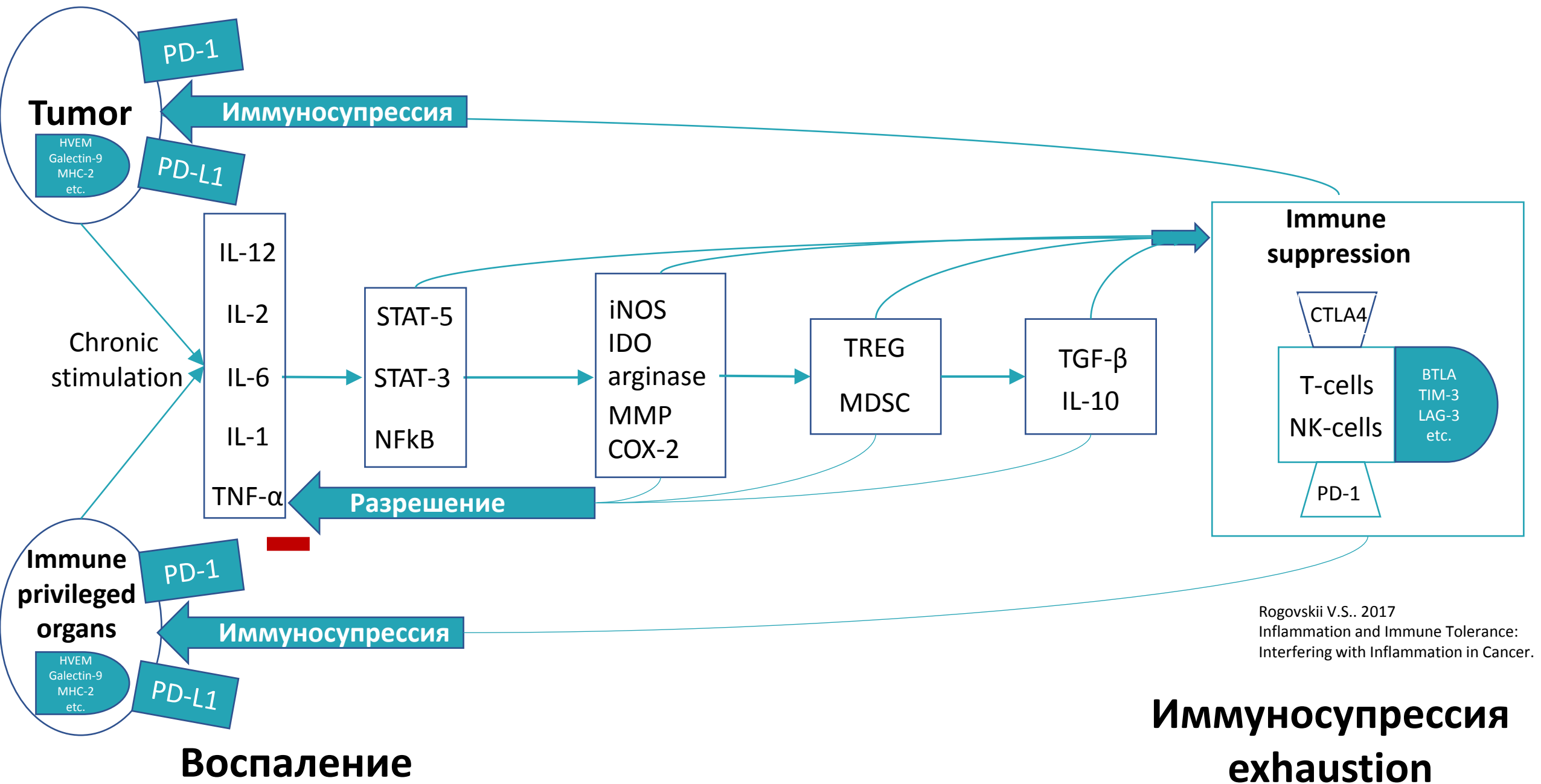
Механизмы развития опухоль-индуцированной иммуносупрессии

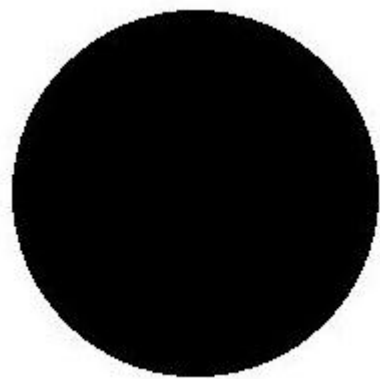
- Хроническое вялотекущее воспаление может являться основным механизмом иммунологической толерантности при опухолях

Рудольф Вирхов – связь хронического воспаления и опухолей (19 век)

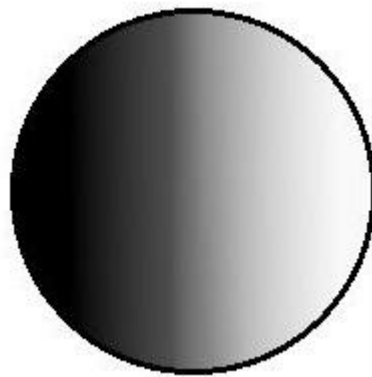
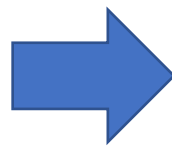
- Среди причин хронического вялотекущего воспаления – особенности образа жизни, в частности, диета с повышенным соотношением омега 6 / омега 3

Механизмы, связывающие хроническое воспаление и иммунологическую толерантность

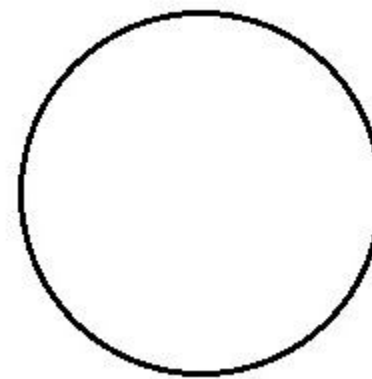
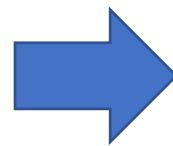




Воспаление



Переход к разрешению
через иммуносупрессию.
Это постоянное состояние
в иммунопривелегированных
органах и опухолях



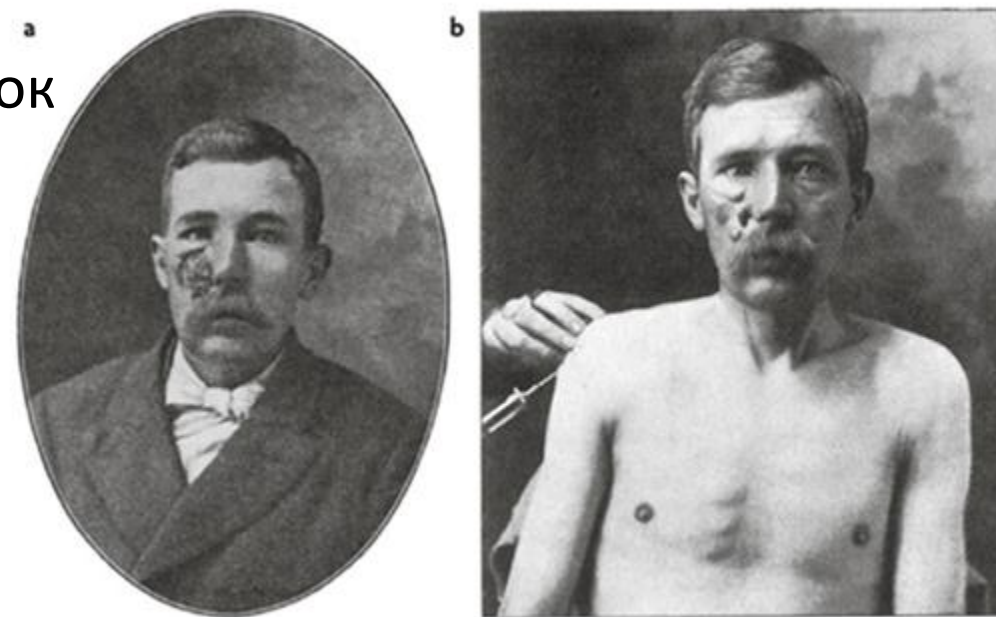
Разрешение

Иммуноterapia опухолей. История и современность.

- 1891 - William B. Coley - введение препаратов на бактериальной основе (*Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*)
- 1931 Роскин Г. и Экземплярская Е. – введение препаратов на основе *Trypanosoma cruzi* - круцин
- Цитокины (ИЛ-2 и другие)
- Вакцины, в т.ч. на основе дендритных клеток
- Онколитические вирусы
- ИКТИ (ингибиторы контрольных точек иммунного ответа)
- Клеточная терапия

Эффективно, но не у всех.

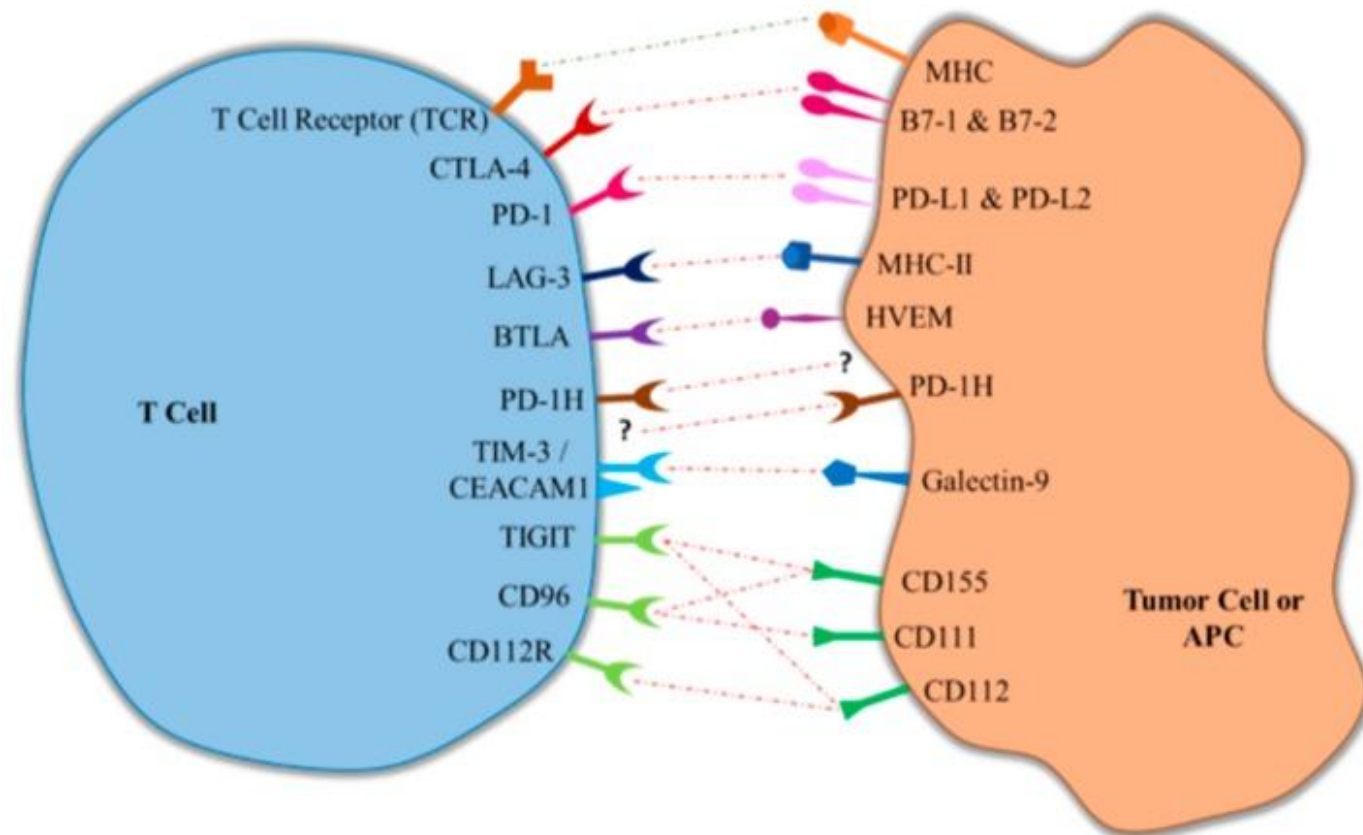
Уровень ответа, в частности, около 30% для КТИ



Пациент с саркомой челюсти и обширными метастазами, 1899.
63 введения вакцины Коли до уменьшения опухоли.

Спустя 10 лет

Множеств о различных чекпоинто в



Torphy, R. J., Schulick, R. D., & Zhu, Y. (2017). Newly Emerging Immune Checkpoints: Promises for Future Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2642. doi:10.3390/ijms18122642

Marin-Acevedo, J. A., Dholaria, B., Soyano, A. E., Knutson, K. L., Chumsri, S., & Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 39. doi:10.1186/s13045-018-0582-8

Yu, X., Zheng, Y., Mao, R., Su, Z., & Zhang, J. (2019). BTLA/HVEM Signaling: Milestones in Research and Role in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Frontiers in immunology*, 10, 617. doi:10.3389/fimmu.2019.00617

Моделирование опухолевого микроокружения (ОМ)

Роль иммуноокружения

Сложности воспроизводства

- Множество моделей сокультивирования опухолевых и иммунных клеток
- Результат - тестирование лекарственных веществ на сложной системе in vitro



- Воспроизводимы ли данные тест-системы в принципе?

GLP приходит на помощь?

- Стремление к точности и воспроизводимости – фундаментальные ограничения
- Максимальное протоколирование эксперимента – то, что можно сделать для повышения воспроизводимости
- GLP и non-GLP
- Исследование может быть формально non-GLP (т.к. не связано с безопасностью вещества), но принципы должны остаться –
«in spirit of GLP»

non-GLP-исследования, но с GLP принципами

[Toxicol Sci.](#) 2016 Jun; 151(2): 206–213.

PMCID: PMC4880141

Published online 2016 May 3. doi: [10.1093/toxsci/kfw056](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw056)

PMID: [27208076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27208076/)

Does GLP enhance the quality of toxicological evidence for regulatory decisions?

[Christopher J. Borgert](#),^{*,1} [Richard A. Becker](#),[†] [Betsy D. Carlton](#),[‡] [Mark Hanson](#),[§]
[Patricia L. Kwiatkowski](#),[¶] [Mary Sue Marty](#),^{||} [Lynn S. McCarty](#),^{|||} [Terry F. Quill](#),^{|||}
[Keith Solomon](#),[#] [Glen Van Der Kraak](#),^{**} [Raphael J. Witorsch](#),^{††} and [Kun Don Yi](#)^{‡‡}

► [Author information](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Electronic Code of Federal Regulations

e-CFR data is current as of October 25, 2019

[Title 21](#) → [Chapter I](#) → [Subchapter A](#) → [Part 58](#) → [Subpart A](#)

[Browse Next](#)

Title 21: Food and Drugs

[PART 58—GOOD LABORATORY PRACTICE FOR NONCLINICAL LABORATORY STUDIES](#)

«Nonclinical laboratory study... - the term does not include basic exploratory studies carried out to determine whether a test article has any potential utility or to determine physical or chemical characteristics of a test article»



[Shopping Cart](#)



[Company](#) / [Services](#) / [Products](#) / [Scientific Resources](#)

[Management](#)

[Scientific Advisory Board](#)

[Facility](#)

[News & Events](#)

[Press Releases](#)

[Sekisui](#)

GLP vs. non-GLP

[Home](#) > [company](#) > [Quality Corner](#) > [GLP vs. non-GLP](#)

Summary

Regulatory agencies in the United States, Europe and Japan do not require compliance with good laboratory practice (GLP) regulations for in vitro drug metabolism and drug interaction studies. Published industry guidance on the design of drug interaction studies emphasizes these studies be conducted with high standards of quality ensuring

- Один из подходов к моделированию ОМ – выявление факторов, «специфично» измененных у пациентов с опухолями

CCL3, IL1 β , IL8 – пример факторов, повышенных у пациентов с раком легкого

Клетки рака легкого (но не нормальные клетки) индуцируют такие же изменения секреции у МНПК (мононуклеарных клеток периферической крови) здоровых доноров Chang, DH et al.

ИЛ-10 – уровень повышен при различных опухолях, в частности, при цервикальной карциноме Berti, FCB et al.
Добавление в культуру МНПК среды, полученной от опухолевых клеток (HeLa), увеличивало синтез ИЛ-10 МНПК (неопубликованные данные)

- Возможно использование как плазмы крови, так и биопсийного материала
- Воздействие in vitro на факторы, отражающие течение заболевания in vivo

Моделирование опухолевого микроокружения – отличия свойств (в частности, пролиферации) при двумерном и трехмерном культивировании клеток

- 2D монокультивирование и сокультивирование
- 3D культивирование

Суспензионные культуры

Неадгезивные методы

«Подвешанные» капли

3D-матрикс

Микрочипы и микрожидкостные технологии

– возможность изучения единичных клеток

Shang, Menglin, et al. "Microfluidic modelling of the tumor microenvironment for anti-cancer drug development." Lab on a Chip 19.3 (2019): 369-386.

Моделирование опухолевого микроокружения

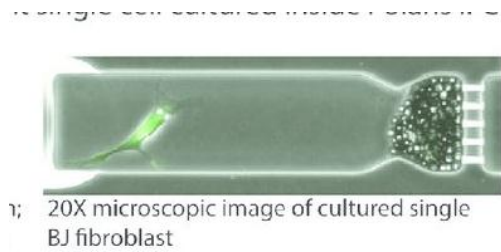
Микрочипы

+

Микрожидкостные технологии

=

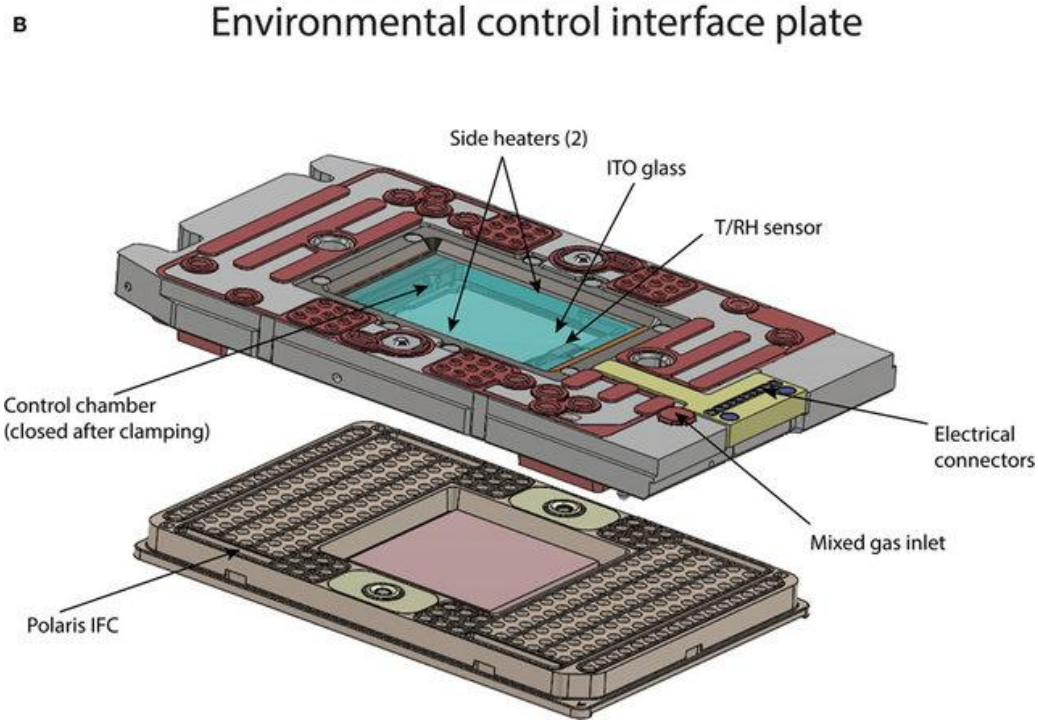
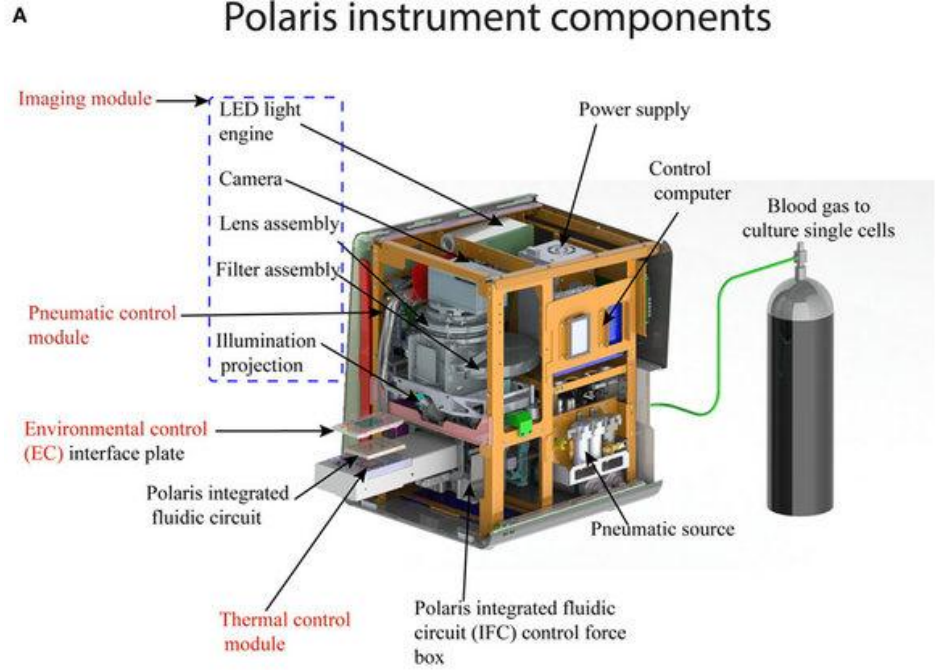
Одноклеточные технологии



Ramalingam, Naveen, et al. "Fluidic logic used in a systems approach to enable integrated single-cell functional analysis." Frontiers in bioengineering and biotechnology 4 (2017): 70.



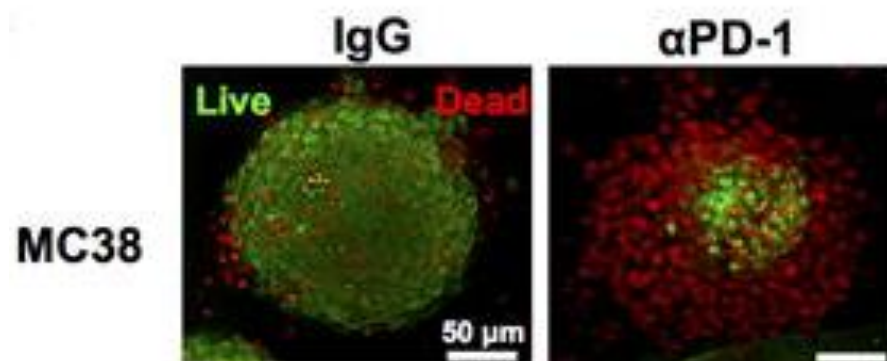
<https://www.fluidigm.com/products/polaris>



Органотипические опухолевые сфероиды для исследования эффектов чекпоинт-ингибиторов (ИКТИ) и CAR-T клеток in vitro

- Сохраняют аутологичную лимфоидную и миелоидную популяцию
- Оценка цитокинового профиля опухолевого сфероида под влиянием ИКТИ

Выявлена связь между продукцией CCL19/CXCL13 и иммунной инфильтрацией, коррелирующей с клиническим эффектом



Jenkins, Russell W et al. "Ex Vivo Profiling of PD-1 Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids." *Cancer discovery* vol. 8,2 (2018): 196-215.
doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0833

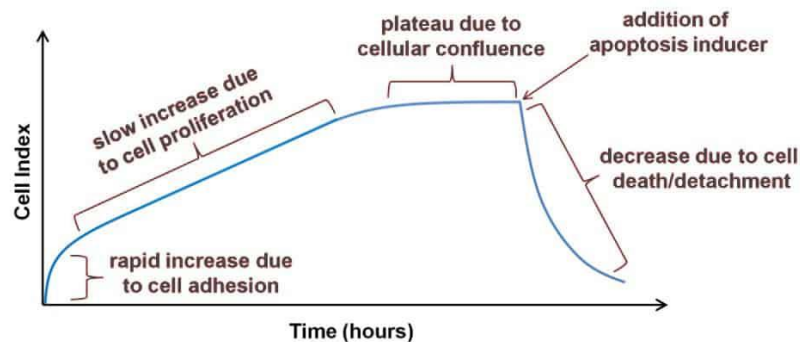
Системы для клеточного анализа в режиме реального времени и моделирование опухолевого микроокружения

На основе измерения клеточного импеданса

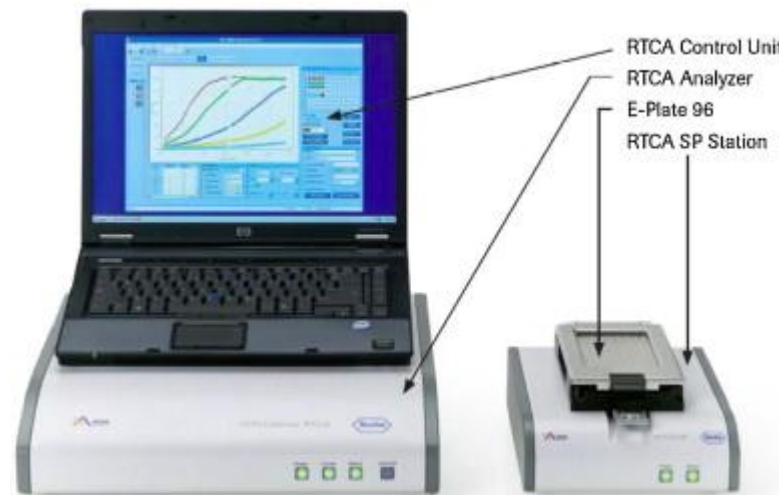
- Анализ цитотоксичности CAR-T в отношении опухолевых клеток-мишеней

Повышенная цитотоксичность мезотелин (рег. 3) CAR-T клеток по сравнению с мезотелин (рег. 1) CAR-T

Zhang, Zhiwei, et al. "Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor." *Cell death & disease* 10.7 (2019): 476.



<https://www.aceabio.com/products/rtca-mp/>



Количественное определение цитотоксической активности NK-клеток при сокультивировании с опухолевыми клетками линии K562

- Криосохраненные окрашенные клетки миелоидной лейкемии человека K562
- Сниженная экспрессия МНС I и МНС II – мишень для NK-опосредованной цитотоксичности
- Стандартизованные наборы для оценки цитотоксической функции NK-клеток в отношении опухолевых клеток

Instructions NKTEST™ Version 06/14
page 1 von 8

GLYCOTOPE
| Biotechnology

NKTEST™

Reagent kit for the quantitative determination of the cytotoxic activity of Natural Killer (NK) cells

Reagent kit containing cryopreserved prestained K562 target cells and reagents for 100 tests. Cryo-preserved K562 target cells in 5 aliquots, each for 20 assays/single day.



Заключение

- Фундаментальные сложности воспроизводимости в моделях опухолевого микроокружения
- Максимальное протоколирование – in spirit of GLP
- Роль технологий – возможность анализа опухолей *ex vivo*, возможности стандартизации (готовые опухолевые тест-системы)

Спасибо за внимание!

- Роскин Г. И., Экземпларская Е. В. Протозойная инфекция и экспериментальный рак // Журн. микробиологии, эпидемиологии и экспер. иммунобиологии. Т. 9. № 3. (1932): 339–341.
- Chang, David H et al. "The effect of lung cancer on cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells." PloS one vol. 8,6 e64456. 6 Jun. (2013) doi:10.1371/journal.pone.0064456
- Rogovskii V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer //Current cancer drug targets. 17(4)6 (2017): 325-332.
- Ramalingam, Naveen, et al. "Fluidic logic used in a systems approach to enable integrated single-cell functional analysis." Frontiers in bioengineering and biotechnology 4 (2017): 70.
- Torphy, Robert J., Richard D. Schulick, and Yuwen Zhu. "Newly emerging immune checkpoints: promises for future cancer therapy." International journal of molecular sciences 18.12 (2017): 2642.
- Berti, Fernanda Costa Brandão, et al. "The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma." Cytokine & growth factor reviews 34 (2017): 1-13.
- Jenkins, Russell W et al. "Ex Vivo Profiling of PD-1 Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids." *Cancer discovery* vol. 8,2 (2018): 196-215. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0833
- Marin-Acevedo, Julian A., et al. "Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges." Journal of hematology & oncology 11.1 (2018): 39.
- Zhang, Zhiwei, et al. "Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor." *Cell death & disease* 10.7 (2019): 476.
- Shang, Menglin, et al. "Microfluidic modelling of the tumor microenvironment for anti-cancer drug development." Lab on a Chip 19.3 (2019): 369-386.
- Yu, Xueping, et al. "BTLA/HVEM signaling: Milestones in research and role in chronic hepatitis B virus infection." Frontiers in immunology 10 (2019): 617.

Распоряжение Правительства РФ от 28 декабря 2012 г. № 2603-р О Национальной программе реализации принципов надлежащей лабораторной практики

V. Программа мониторинга соответствия принципам надлежащей лабораторной практики

- Программа мониторинга соответствия принципам надлежащей лабораторной практики распространяется на проведение неклинических лабораторных исследований объектов, содержащихся в пестицидах, косметической продукции, **лекарственных средствах для медицинского применения**, лекарственных средствах для ветеринарного применения, пищевых добавках, кормовых добавках, а также в химических веществах промышленного назначения.
- Целью проведения исследований этих объектов является получение данных о свойствах испытуемых объектов и (или) об их безопасности для здоровья человека и (или) окружающей среды.

Утверждены
приказом Министерства здравоохранения
Российской Федерации
от 1 апреля 2016 г. № 199н

Правила надлежащей лабораторной практики

I. Общие положения

1. Настоящие Правила надлежащей лабораторной практики (далее – Правила) устанавливают требования, направленные на обеспечение качества доклинических исследований лекарственных средств для медицинского применения (далее соответственно – доклинические исследования, лекарственные средства), в том числе требования к процессам организации, планирования, порядку проведения и контроля качества доклинических исследований лекарственных средств, оформлению их результатов и архивированию.

2. Организация и проведение доклинического исследования осуществляется разработчиком лекарственного средства в научно-исследовательских организациях независимо от организационно-правовой формы, образовательных организациях высшего профессионального образования, имеющих необходимую материально-техническую базу и квалифицированных специалистов в соответствующей области исследования¹ (далее – испытательная лаборатория).

3. Доклиническое исследование осуществляется посредством химических, физических, биологических, микробиологических, фармакологических, токсикологических и других экспериментальных исследований или серий исследований по изучению исследуемого вещества, лекарственного средства или физического воздействия, средств, методов и технологий профилактики, диагностики и лечения заболеваний путем применения научных методов оценок в целях изучения специфического действия и (или) доказательств безопасности для здоровья человека.

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
SUBCHAPTER A--GENERAL

PART 58 -- GOOD LABORATORY PRACTICE FOR NONCLINICAL LABORATORY STUDIES

Subpart A--General Provisions

Sec. 58.3 Definitions.

As used in this part, the following terms shall have the meanings specified:

(a) *Act* means the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, as amended (secs. 201-902, 52 Stat. 1040 *et seq.*, as amended (21 U.S.C. 321-392)).

(b) *Test article* means any food additive, color additive, drug, biological product, electronic product, medical device for human use, or any other article subject to regulation under the act or under sections 351 and 354-360F of the Public Health Service Act.

(c) *Control article* means any food additive, color additive, drug, biological product, electronic product, medical device for human use, or any article other than a test article, feed, or water that is administered to the test system in the course of a nonclinical laboratory study for the purpose of establishing a basis for comparison with the test article.

(d) *Nonclinical laboratory study* means in vivo or in vitro experiments in which test articles are studied prospectively in test systems under laboratory conditions to determine their safety. The term does not include studies utilizing human subjects or clinical studies or field trials in animals. The term does not include basic exploratory studies carried out to determine whether a test article has any potential utility or to determine physical or chemical characteristics of a test article.

(e) *Application for research or marketing permit* includes:

(1) A color additive petition, described in part 71.

(2) A food additive petition, described in parts 171 and 571.

(3) Data and information regarding a substance submitted as part of the procedures for establishing that a substance is generally recognized as safe for use, which use results or may reasonably be expected to result, directly or indirectly, in its becoming a component or otherwise affecting the characteristics of any food, described in 170.35 and 570.35.

(4) Data and information regarding a food additive submitted as part of the procedures regarding food additives permitted to be used on an interim basis pending additional study,