

Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител

И.В. Лягоскин, М.А. Берестовой, Д.А. Потеряев,
Э.С. Зейналова, А.Ю. Вишнеvский, А.А. Казаров

000 Международный биотехнологический центр «Генериум»,
Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия

Validation of the XTT-test to assess the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies

I.V. Lyagoskin, M.A. Berestovoy, D.A. Poteryaev,
E.S. Zeinalova, A.Yu. Vishnevskiy, A.A. Kazarov

International Biotechnology Center «Generium»,
Vladimir region, Volginskiy, Russia

Методика оценки антипролиферативной активности препаратов моноклональных антител с применением соли тетразолия ХТТ отработана на примере препарата Герцептин™ («Roche»). Метод основан на спектрометрическом анализе уровня формазана, трансформированного живыми клетками из водорастворимой тетразолиевой соли ХТТ. Уровень формазана пропорционален количеству жизнеспособных клеток. Методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Ключевые слова: ХТТ; BT-474; Трастузумаб; моноклональные антитела; рак; биопрепараты; валидация; специфичность; линейность; правильность; прецизионность.

Библиографическое описание: Лягоскин ИВ, Берестовой МА, Потеряев ДА, Зейналова ЭС, Вишнеvский АЮ, Казаров АА. Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител. Биопрепараты 2015; (1): 45-50.

Using the example of Herceptin (Roche) a method of assessing the antiproliferative activity of monoclonal antibodies using tetrazolium salt was developed. The method is based on spectrometric measurement of the level of formazan transformed by living cells from a water soluble salt XTT. The level of formazan is proportional to the number of viable cells. The technique was in terms of specificity, calibration curve, accuracy and precision.

Key words: XTT; BT-474; Trastuzumab; monoclonal antibodies; cancer; biologics; validation; specificity; calibration curve; accuracy; precision.

Bibliographic description: Lyagoskin IV, Berestovoy MA, Poteryaev DA, Zeinalova ES, Vishnevskiy AYU, Kazarov AA. Validation of the XTT-test to assess the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (1): 45-50.

Многие достижения фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине связаны с экспериментами на животных, однако во второй половине XX века все большее распространение начали получать альтернативные подходы с использованием в модельных экспериментах клеточных линий млекопитающих [1–3].

Такой подход обладает рядом преимуществ: культуры клеток человека и животных в качестве биологических тест-систем позволяют помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых препаратов на стадии их доклинических исследований. Еще одно преимущество моделей *in vitro* заключается в возможности работы непосредственно на культурах клеток человека, что делает полученные данные более адекватными при их проекции на организм человека. Кроме того, использование куль-

тур клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых препаратов непосредственно на клеточном уровне и учесть сложные синергические и (или) разнонаправленные эффекты биологических препаратов.

Из недостатков можно упомянуть высокие требования к стандартизации качества культуры клеток и тканей [2].

В 1950-х годах исследователи для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности потенциальных противоопухолевых соединений начали использовать соли тетразолия, в том числе МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид). Метод основан на том, что живые клетки преобразуют соли тетразолия в окрашенные соединения формазана. Восстановление клетками тетразолия по-казывает изменение энергетического потенциала клетки по снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ и служит показателем жизнеспособности клеток в культуре и интенсивности окислительных процессов [4–8].

Этот подход оказался очень эффективным при оценке жизнеспособности клеток и скорости их пролиферации [4, 9–12]. Основными преимуществами МТТ-теста является высокая чувствительность и относительная простота выполнения. Однако для решения конкретных задач разработки биопрепаратов, в частности для определения специфической активности белковых терапевтических препаратов, необходимо проводить оптимизацию метода и валидацию.

В 1988 году Scudiero с соавт. был описан колориметрический метод с использованием соли тетразолия ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид) [9]. Использование ХТТ приводило к образованию растворимого красителя, в то время как при использовании МТТ образуются нерастворимые соединения формазана, которые необходимо растворять для последующего измерения [13]. Только в живых клетках митохондрии способны уменьшать количество растворенного ХТТ с формированием водорастворимого оранжевого красителя, а концентрация красителя прямо пропорциональна количеству метаболически активных клеток [14].

Преимуществами применения ХТТ, по сравнению с МТТ, являются отсутствие повреждения клеток, что позволяет использовать их параллельно в других тестах. Результат теста мало зависит от вариативности партий фетальной сыворотки. Кроме того, точность метода повышается из-за отсутствия необходимости смены среды, что минимизирует значения систематической ошибки. Однако качество результата анализа обеспечивается не только вышеописанными факторами. Особую роль играет способность метода давать достоверный и воспроизводимый результат.

При разработке аналогов оригинальных биотехнологических препаратов (биоаналогов) и для доказательства их биоподобия необходимо иметь точный и воспроизводимый метод, позволяющий определять специфическую активность. Одним из препаратов, биоаналоги которого разрабатываются или разработаны в настоящий момент рядом биофармацевтических компаний, является Герцептин (трастузумаб). Трастузумаб – это рекомбинантное моноклональное антитело к белку HER2. Ген *her2* кодирует рецепторную тирозинкиназу, которая осуществляет запуск внутриклеточных сигнальных каскадов, критически важных как для нормальных, так и для раковых клеток эпителия молочной железы [15]. Мутации, заключающиеся в амплификации или сверхэкспрессии гена *her2*, встречаются примерно в 20–25% случаев человеческого рака молочной железы. Сверхэкспрессия HER2 ассоциируется с агрессивным клиническим фенотипом, проявляющимся высокой степенью злокачественности (градации) и скоростью роста опухоли, ранними системными метастазами и меньшей продолжительностью как периода без признаков рака, так и общей выживаемости (по сравнению с эстроген-рецептор-позитивными опухолями молочной железы). Данная клиническая картина вызывается изменением многих биологических свойств сверхэкспрессирующих HER2 раковых клеток: повышенная пролиферация, подавление апоптоза, увеличенная подвижность, более высокий потенциал инвазивности и метастазирования, ускоренный ангиогенез и независимость от стероидных гормонов. Многие из этих злокачественных эффектов подавляются моноклональными антителами к HER2. Доклинические и клинические исследова-

ния привели к разработке и регистрации рекомбинантного моноклонального антитела к HER2, препарата Герцептин (трастузумаб) по показанию рак молочной железы со сверхэкспрессией HER2. В настоящее время, на основании также пост-маркетинговых исследований, доказана эффективность данного препарата, особенно в случае адъювантной терапии HER2+ карцином молочной железы [16]. Трастузумаб, связываясь с внеклеточным доменом HER2, блокирует активацию сигнальных каскадов PI3K и MAPK, что приводит к блокированию клеточного цикла (в G1-фазе) и подавлению опухолевой пролиферации. Кроме того, трастузумаб подавляет ангиогенез и индукцию как антиангиогенных, так и репрессию проангиогенных факторов [17].

Целью данной работы была оптимизация критических параметров и валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препарата на примере рекомбинантного моноклонального антитела трастузумаб, с использованием модели *in vitro* – линии клеток карциномы молочной железы BT-474, которая характеризуется аномально высоким уровнем экспрессии белка HER2.

Материал и методы

Материалы:

1. Клеточные линии человека: а) BT-474, HER2+ карцинома молочной железы (протока груди) (ATCC HTB-20™); б) MDA-MB-453, метастатическая карцинома молочной железы (ATCC HTB-131™); в) MDA-MB-231, аденокарцинома молочной железы (ATCC HTB-26™).

2. Среда для культивирования клеток: DME/F12 (HyClone, кат. № SH 3004.04, США), содержащая 10% инактивированной прогреваем эмбриональной сыворотки плода крупного рогатого скота (HyClone, кат. № SV30160.03, США), 1 мМ натрия пирувата (Lonza, кат. № BE13-115E, Бельгия), 5 мг/мл инсулина (Lonza, кат. № BE02-033E, Бельгия), 1,2 г/л бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich, S6297 кат. № BCBC4470, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (100-кратный, лиофилизированный, ООО НПП «ПанЭко», кат. № A063, Россия).

3. Герцептин, трастузумаб (*Trastuzumab*) (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 440 мг (во флаконе) № серии 3551 B2055, дата изготовления – 06.2012, годен до 06.2016, Roche, Швейцария) противоопухолевый препарат, представляющий рекомбинантное человеческое моноклональное антитело, селективно взаимодействующее с внеклеточным доменом белка, являющегося рецептором-2 к эпидермальному ростовому фактору человека (HER2) [18].

4. Мабтера (Ритуксимаб) 500 мг/50 мл № 1 Флакон Mabthera (Rituximab) 500 mg/50 ml, раствор для инфузий, № серии H0505, дата изготовления – 07.2011, годен до – 01.2014, Roche, Швейцария – химерное моноклональное антитело мыши/человека, специфически связывающееся с трансмембранным антигеном CD20.

Методы:

1. Изменение уровня метаболической активности живых клеток линии BT-474, под воздействием трастузумаба, исследовали следующим образом. В лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета (Nunc, кат. № 167008, Thermo Scientific, США) вносили по 100 мкл суспензии клеток и 100 мкл лекарственного препарата соответствующей

концентрации. Все концентрации испытывали в трех повторениях. Планшеты оставляли в инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Через 120 ч в каждую лунку планшета с клеточными суспензиями вносили по 50 мкл раствора ХТТ, приготовленного согласно рекомендациям производителя (Roche, кат. № 11 465 015 001, Швейцария), далее инкубировали 2–5 ч при 37°C в темноте во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации измеряли оптическое поглощение (OD) при длине волны 475 нм, при референсной длине волны 660 нм (Спектрофотометр «BioRad» (США)).

2. Для статистической обработки данных и математического моделирования использовали программу GraphPad Prism 6.0. (GraphPad Software Inc. (США)).

Результаты и обсуждение

На первом этапе проводили подбор оптимальной концентрации клеток линии BT-474 для корреляции детектируемой метаболической активности и количества клеток. Были протестированы следующие концентрации 10000, 20000 и 30000 клеток в лунке. Установлена зависимость количества образующегося формазана от числа жизнеспособных клеток, причем, в зависимости от количества клеток, при постоянной концентрации ХТТ реагента, меняется квадрат линейного коэффициента детерминации (R^2), который характеризует степень зависимости между регрессионной моделью и исходными данными. Наивысшее значение R^2 было достигнуто при использовании концентрации 10000 клеток/лунку (0,9674), что говорит о низкой случайной ошибке в этой модели. Данную концентрацию клеток использовали во всех последующих экспериментах. Для концентрации 20000 и 30000 клеток/лунку R^2 колебалось от 0,8816 до 0,9150 (рис. 1).

В функциональных тестах ключевым показателем кривой доза–ответ является концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}), т.е. концентрация вещества, приводящая к 50% ингибированию роста клеток.

Оценку IC_{50} проводили, используя различный диапазон концентраций трастузумаба. Препарат титровали, начиная с концентрации 2,5 мкг/мл, с 2- и 2,5-кратным шагом разведения, что позволило выявить оптимальное соотношение концентрации клеток линии BT-474 и препарата для определения точки перегиба кривой. При использовании двукратного шага разведения оптимальную форму кривой не наблюдали (данные не представлены). Иную картину обнаруживали при титровании с шагом 2,5 (рис. 2). Поэтому в дальнейшем этот диапазон и шаг разведения применяли для исследования препарата на данной клеточной линии.

Дополнительно исследовали влияние времени инкубации клеток с ХТТ-реагентом. Было установлено, что 4 ч является оптимальным временем инкубации. Дальнейшее увеличение периода инкубации приводило лишь к незначительному изменению значений OD. Причем, при инкубации 5 ч наблюдали увеличение значений OD для низких концентраций трастузумаба (рис. 2). Снижение времени инкубации приводило к увеличению значений среднеквадратичного отклонения и получению менее достоверных результатов.

Стандарты производства и оценки лекарственных средств подразумевают использование валидированных методов [19]. Были проанализированы следующие харак-

теристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Специфичность – это способность достоверно определять лекарственное вещество в присутствии примесных соединений, продуктов деградации и вспомогательных веществ. В работе оценивали как воздействие препарата на разные клеточные линии, так и воздействие гетерогенных моноклональных антител на клеточную линию-мишень (BT-474).

По данным D.L. Costantini с соавт. [20] и M. Narayan с соавт. [21], линии клеток MDA-MB-231 и MDA-MB-453 не чувствительны к терапевтической концентрации трастузумаба (т.е. ~ 10 мкг/мл) в сыворотке крови пациентов, что позволяет использовать их в качестве отрицательного контроля при исследовании специфичности.

Эксперименты показали, что при данных концентрациях для клеточных линий MDA-MB-231 и MDA-MB-453 наблюдается образование значительного количества формазана, свидетельствующего об отсутствии антипролиферативной активности (рис. 3).

Сходные результаты получены при использовании ритуксимаба на клеточной линии BT-474. Поскольку данный препарат специфичен к трансмембранному антигену CD20 и не связывается с рецепторами клеточной линии BT-474, анти-

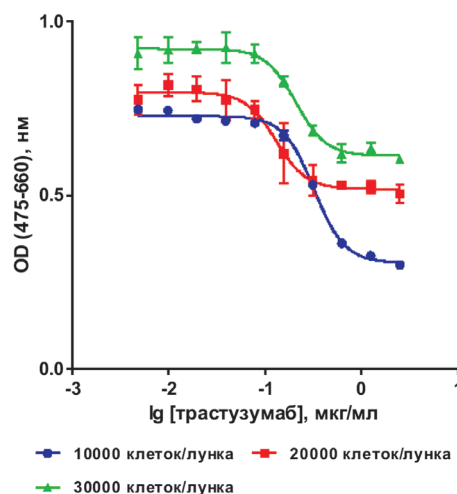


Рис. 1. Зависимость OD от концентрации клеток в лунке планшета.

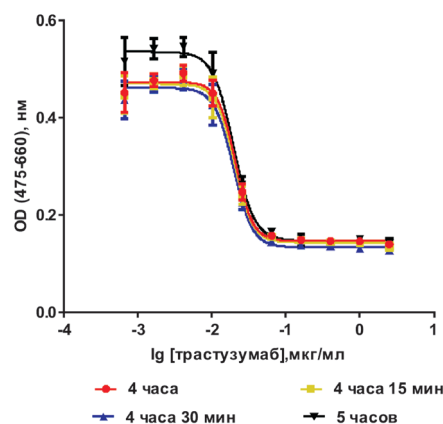


Рис. 2. Зависимость OD от времени инкубации. На графике указаны названия кривых по точке времени инкубации с ХТТ-реагентом.

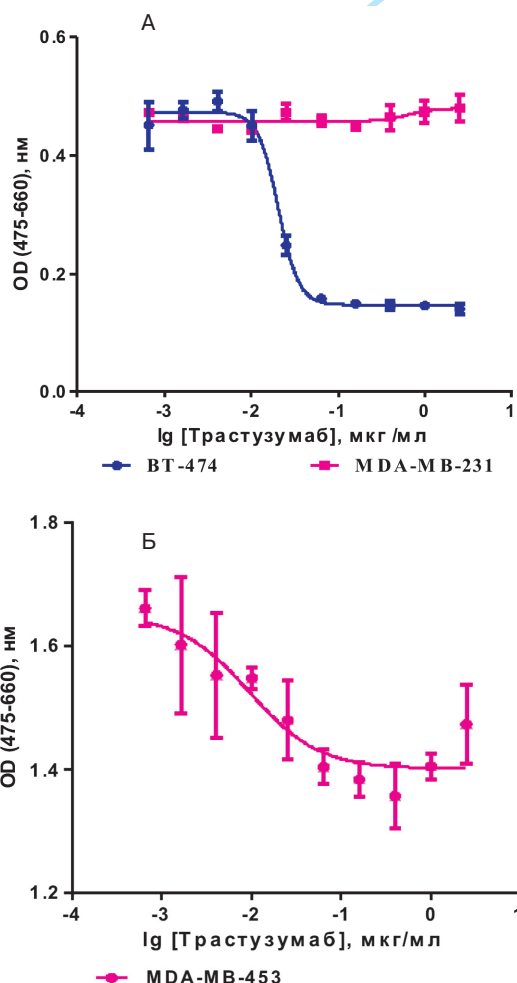


Рис. 3. Зависимость OD от концентрации трастузумаба испытанного на разных линиях клеток: А – BT-474 и MDA-MB-231; Б – MDA-MB-453.

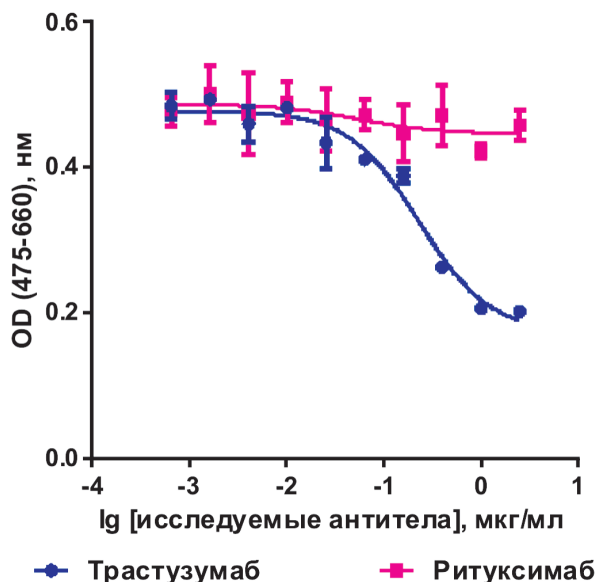


Рис. 4. Зависимость OD от концентрации использованных моноклональных антител.

Таблица 1. Оценка линейности метода

Теоретическая специфическая активность, %	Полученные IC50		
	повтор		
	№ 1	№ 2	№ 3
60	0,20	0,21	0,22
80	0,16	0,16	0,17
100	0,12	0,12	0,13
120	0,10	0,099	0,098
140	0,067	0,068	0,067

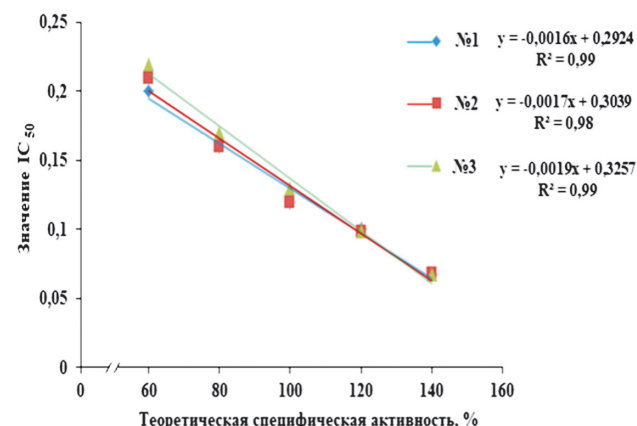


Рис. 5. Калибровочные кривые зависимости IC50 от теоретической специфической активности.

пролиферативная активность ритуксимаба в данном случае отсутствовала (рис. 4).

Таким образом, отработанный метод обладает высокой специфичностью в данном диапазоне концентраций.

Определение линейности диапазона проводили на растворах трастузумаба с исходными концентрациями 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 мкг/мл. Измерения проводили в трех повторностях.

Анализ погрешности проводили сравнением кривой, построенной для диапазона концентраций – 2,5–0,0006536 мкг/мл, с шагом разведения 2,5, принятой за стандартную (100%), и проверяемых (кривые с начальными точками разведения – 1,5; 2,0; 3,0; 3,5 мкг/мл (60, 80, 120 и 140% соответственно).

В таблице 1 представлены значения IC_{50} для каждой кривой.

Как видно из рисунка 5, коэффициенты детерминации колеблются от 0,98 до 0,99, что свидетельствует о линейной зависимости между специфической активностью препарата и концентрацией полумаксимального ингибирования (табл. 1 и рис. 5).

На следующем этапе определяли правильность и прецизионность метода. Для правильности рассчитывали специфическую активность (А) и относительную погрешность (ϵ , %). Для прецизионности – стандартное отклонение (SD) и величину относительного стандартного отклонения (RSD, %).

Специфическая активность:

$$A = \frac{IC_{50}(C)}{IC_{50}(T)} \times 100, \quad (1)$$

где А – специфическая активность (%); $IC_{50}(C)$ – значение концентрации полумаксимального ингибирования для стандартного раствора, полученное в ходе эксперимента; $IC_{50}(T)$ – значение концентрации полумаксимального инги-

Таблица 2. Оценка правильности и прецизионности метода (inter-day)

Теоретическая специфическая активность, %	Полученное IC50	Полученное IC50, среднее значение	Правильность		Прецизионность	
			A, %	(ε, %)	SD	RSD, %
80	0,16	0,16	75	6,3	0,006	3,75
	0,16		75	6,3		
	0,17		76	5		
100	0,12	0,12	100	0	0,005	0,042
	0,12					
	0,13					
	0,12					
	0,12					
120	0,10	0,099	120	0	0,0006	0,61
	0,099		121	0,8		
	0,098		122	1,7		

Таблица 3. Оценка правильности и прецизионности метода (intra-day)

Теоретическая специфическая активность, %	Полученное IC50	Полученное IC50, среднее значение	Правильность		Прецизионность	
			A, %	(ε, %)	SD	RSD, %
80	0,15	0,15	87	8,8	0,006	4,0
	0,15		80	0		
	0,16		69	13,8		
100	0,13	0,12	100	0	0,008	0,07
	0,12					
	0,11					
	0,13					
	0,12					
120	0,1	0,097	130	8,3	0,0047	4,8
	0,1		120	0		
	0,09		122	1,7		

бирования для испытуемого раствора, полученное в ходе эксперимента.

Относительная погрешность (ε, %):

$$\epsilon = \frac{(A_{\text{получ}} - A_{\text{теор}})}{A_{\text{теор}}} \times 100, \quad (2)$$

где ε – относительная погрешность; $A_{\text{получ}}$ – специфическая активность, полученная в ходе испытаний; $A_{\text{теор}}$ – специфическая активность, теоретическая.

Относительное стандартное отклонение (RSD, %):

$$RSD = \frac{SD}{IC_{50}(\text{сред})} \times 100, \quad (3)$$

где RSD – относительное стандартное отклонение; SD – стандартное отклонение; $IC_{50}(\text{сред})$ – среднее значение концентрации полумаксимального ингибирования для испытуемых растворов, полученных в экспериментах.

Результаты представлены в таблицах 2, 3 при исследовании IC_{50} для одного (inter-day) и разных дней (intra-day).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20% для минимальной концентрации, не более 15% для максимальной концентрации) [19, 22, 23].

Выводы

Отработанная методика оценки специфической активности препаратов на примере трастузумаба была валидирована по основным параметрам. Показано, что в данном диапазоне концентраций (2,5–0,00065536 мкг/мл, с шагом разведения 2,5) метод специфичен, обладает линейностью с коэффициентом детерминации 98–99%. Кроме того, у данного метода высокая точность и прецизионность, соответствующие нормам FDA и EMA.

Простота исполнения метода позволяет использовать его повсеместно в лабораториях, где есть необходимость проводить оценку антипролиферативной активности различных препаратов, действующих по сходному принципу.

Литература:

1. Даныбаева ГА, Жылкыбаев АА, Рыков ВА, Тритек ВС, Силаев ДВ, Гуляев АЕ. Цитотоксичность карборанилсодержащих соединений. Биотехнология. Теория и практика 2012; (3): 49–54.
2. Hartung T, Gstraunthaler G, Coecke S, Lewis D, Blanck O, Balls M. Good cell culture practice (GCCP) – an initiative for standardization and quality control of in vitro studies. The establishment of an ECVAM Task Force on GCCP. ALTEX 2001; 18(1): 75–8.
3. Шпакова АП, Павлова КС, Булычева ТИ. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток. Клиническая лабораторная диагностика 2000; (2): 20–3.
4. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog RJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. Biochem Int. 1992; 27(3): 501–10.
5. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1–2): 55–63.
6. Niki M, Otto M. Towards an optimized MTT assay. J Immunol Methods 1990; 130(1): 149–51.
7. Nouri AM, Mansouri M, Hussain RF, Dos Santos AVL, Oliver RTD. Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity. J Immunol Methods 1995; 180(1): 63–8.
8. Niu Q, Zhao C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. J Immunol Methods 2001; 251(1–2): 11–9.
9. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988; 48(17): 4827–33.
10. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salt. Biochimica 1996; 4(1): 15–9.
11. Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. J Immunol Methods 1991; 141(1): 15–22.
12. Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. J Immunol Methods 1994; 174(1–2): 311–20.
13. Giuseppe SA, Longo-Sorbello, Saydam G, Banerjee D. Cytotoxicity and cell growth assays. Elsevier Science 2006; chapter 38: 315–24.
14. Huyck L, Ampe C, Van Troys M. The XTT Cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. Assay Drug Dev Technol. 2012; 10(4): 382–92.
15. Yarden Y, Slivkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; 2(2): 127–37.
16. Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). Endocr Relat Cancer 2002; 9(2): 75–85.
17. Le XF, Pruefer F, Bast RC, Jr. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. Cell Cycle 2005; 4(1): 87–95.
18. Tseng PH, Wang YC, Weng SC, Weng JR, Chen CS, Brueggemeier RW, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. Mol Pharmacol. 2006; 70(5): 1534–41.
19. Юргель НВ, ред. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. М.: Спорт и Культура–2000; 2007.
20. Costantini DL, Bateman K, McLarty K, Vallis KA, Reilly RM. Trastuzumab-resistant breast cancer cells remain sensitive to the auger electron-emitting radiotherapeutic agent 111 In-NLS-trastuzumab and are radiosensitized by methotrexate. J Nucl Med. 2008; 49(9): 1498–505.
21. Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Maihle NJ. Trastuzumab-induced HER Reprogramming in “resistant” breast carcinoma cells. Cancer Res. 2009; 69(6): 2191–4.
22. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use:

- London, 2009. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
23. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.

References

- Danilybaeva GA, Zhylykbaev, Rykov VA, Tritek VS, Silaev DV, Gulyaev AE. Cytotoxicity of carboranyl compounds. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika* 2012; (3): 49–54 (in Russian).
- Hartung T, Gstraunthaler G, Coecke S, Lewis D, Blanck O, Balls M. Good cell culture practice (GCCP) – an initiative for standardization and quality control of in vitro studies. The establishment of an ECVAM Task Force on GCCP. *ALTEX* 2001; 18(1): 75–8.
- Shpakova AP, Pavlova KS, Bulychева TI. MTT colorimetric method for determining the cytotoxic activity of natural killer cells. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2000; (2): 20–3 (in Russian).
- Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Int.* 1992; 27(3): 501–10.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
- Niks M, Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J Immunol Methods* 1990; 130(1): 149–51.
- Nouri AM, Mansouri M, Hussain RF, Dos Santos AVL, Oliver RTD. Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1995; 180(1): 63–8.
- Niu Q, Zhao C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001; 251(1–2): 11–9.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48(17): 4827–33.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salt. *Biochemica* 1996; 4(1): 15–9.
- Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. *A methodological study. J Immunol Methods* 1991; 141(1): 15–22.
- Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994; 174(1–2): 311–20.
- Giuseppe SA, Longo-Sorbello, Saydam G, Banerjee D. Cytotoxicity and cell growth assays. *Elsevier Science* 2006; chapter 38: 315–24.
- Huyck L, Ampe C, Van Troys M. The XTT Cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *Assay Drug Dev Technol.* 2012; 10(4): 382–92.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(2): 127–37.
- Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* 2002; 9(2): 75–85.
- Le XF, Pruefer F, Bast RC, Jr. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle* 2005; 4(1): 87–95.
- Tseng PH, Wang YC, Weng SC, Weng JR, Chen CS, Brueggemeier RW, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(5): 1534–41.
- Yurgel NV, ed. Guide for the pharmaceutical industry. Guidelines. Moscow: Sport i Kultura–2000; 2007 (in Russian).
- Costantini DL, Bateman K, McLarty K, Vallis KA, Reilly RM. Trastuzumab-resistant breast cancer cells remain sensitive to the auger electron-emitting radiotherapeutic agent 111 In-NLS-trastuzumab and are radiosensitized by methotrexate. *J Nucl Med.* 2008; 49(9): 1498–505.
- Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Mahle NJ. Trastuzumab-induced HER Reprogramming in “resistant” breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009; 69(6): 2191–4.
- Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.

Authors:

International Biotechnological Center «Generium», 14 Vladimirskaia Street, Vladimir region, Volginskiy, 601125, Russian Federation.

Lyagoskin IV. Researcher of the Department of analytical methods. Candidate of Biological Sciences.

Berestovoy MA. Researcher of the Department of cell biology.

Poteryaev DA. Head of the Department of cell biology. Candidate of Biological Sciences.

Zeynalova ES. Senior researcher of the Department of cell biology.

Vishnevsky AY. Head of the Department of analytical methods. Candidate of Biological Sciences.

Kazarov AA. Head of the Laboratory of analytical control of the Department of analytical methods.

Об авторах

ООО Международный биотехнологический центр «Генериум». Российская Федерация, 601125, Владимирская область, п. Вольгинский, ул. Владимирская, 14.

Лягоскин Иван Владимирович. Научный сотрудник отдела аналитических методов, канд. биол. наук.

Берестовой Михаил Алексеевич. Научный сотрудник отдела клеточной биологии.

Потеряев Дмитрий Александрович. Начальник отдела клеточной биологии, канд. биол. наук.

Зейналова Эльмира Сафаиловна. Старший научный сотрудник отдела клеточной биологии.

Вишневский Александр Юрьевич. Начальник отдела аналитических методов, канд. биол. наук.

Казаров Александр Александрович. Руководитель лаборатории аналитического контроля отдела аналитических методов.

Адрес для переписки: Лягоскин Иван Владимирович; Lyagoskin@ibcgenerium.ru

Поступила 13.10.2014 г.
Принята 16.03.2015 г.