

УДК 618.19-006.6-092.9:616-089.843

*D.V. Filonenko, N.V. Andronova, H.M. Treshalina,
E.Sh. Solomko, E.V. Stepanova, A.Yu. Baryshnikov*

EVALUATION OF HERCEPTIN-SENSITIVITY OF SUBCUTANEOUS BREAST CANCER XENOGRAPHS TRANSPLANTED TO THE NUDE MICE OF BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEACH CENTER BREEDING

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The drug Herceptin blocking receptor *Her2/neu* (*ErbB2*) was introduced in clinical practice and is successfully used in treatment of breast cancer patients.

Development of novel effective and cheap drugs against *HER2/neu* is a perspective trend. Tests of such drugs require adequate tumor models *in vivo*. Sensitivity of tumor models to the drugs often depends on biology of tumor growth in deferent types of animals. We adapted *SKBR3*, tumor cell lines with hyperexpression of *HER2/neu*, to the subcutaneous growth in *Balb/c* nude mice of Blokhin Russian Cancer Reseach Center breeding.

The purpose of the study was to evaluate Herceptin-sensitivity of subcutaneous breast cancer xenografts *SKBR3* transplanted to the nude mice of Blokhin Russian Cancer Reseach Center breeding.

Key words: targeted therapy, Herceptin, cell lines, subcutaneous xenografts, transplantation.

*Д.В. Филоненко, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина,
Э.Ш. Соломко, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников*

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ГЕРЦЕПТИНУ ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА *SKBR3* ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУНОДЕФИЦИТНЫМ МЫШАМ *BALB/C NUDE* РАЗВЕДЕНИЯ ГУ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Препарат герцептин, блокирующий рецептор эпидермального фактора роста *HER2/neu* (*ErbB2*), внедрен в клиническую практику и с успехом применяется при лечении рака молочной железы (РМЖ). Доклиническое изучение новых кандидатов для такой терапии невозможно без адекватных опухолевых моделей, чувствительность которых зависит от биологических особенностей животных-доноров. Нами адаптирована к росту у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ клеточная линия опухолей человека с гиперэкспрессией *HER2/neu* – рак молочной железы человека *SKBR3*.

Целью данной работы была оценка чувствительности полученных подкожных ксенографтов *SKBR3* к действию таргетного препарата герцептина на мышах *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ.

Ключевые слова: направленная терапия, герцептин, клеточные линии, подкожные ксенографты, трансплантация.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из последних успехов в лекарственном лечении рака молочной железы (РМЖ) стало создание нового адресного противоопухолевого препарата герцептин (трастузумаб), выпускаемого фирмой «Roche».

Препарат герцептин представляет собой гуманизированное полноразмерное моноклональное антитело против рецептора *HER2/neu*. В результате использования герцептина у пациенток с гиперэкспрессией *HER2/neu* достигается положительная динамика опу-

холевого процесса с увеличением выживаемости больных [1; 2; 4; 5; 9].

Для доклинического изучения препаратов, адресованных на *HER2/neu*, используются адаптированные к росту у иммунодефицитных мышей клеточные линии опухолей человека с гиперэкспрессией рецептора *HER2*, одна из которых – рак молочной железы *SKBR3* [8; 10; 11].

В ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина произведена адаптация клеточной линии *SKBR3* к росту п/к у иммунодефицитных мышей собственного разведения. Эта линия при трансплантации 3,0 млн. клеток на мышью дает п/к ксенографты, пригодные для доклинических исследований [3].

Цель исследования – оценка чувствительности к таргетной терапии герцептином ксенографтов *SKBR3* на мышах-самках *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Опыт проведен на конвенциональных мышах-самках *Balb/c nude* 8–10 нед массой тела 18–21 г. Мышей содержали в SPF-зоне специализированного кондиционированного бестимусного отсека при нормированном температурно-влажностном режиме на стерильном экструдированном корме («МЭСТ», РФ), стерильной воде и стерильной бумажной подстилке.

Опухолевая модель

В качестве модели опухолевого роста использована аденокарцинома молочной железы человека *SKBR3* (получена от проф. С.М. Деева), содержащая на своей поверхности до $1,6 \times 10^6$ рецепторов *HER2/neu* на клетку. Линия не требует создания гормонального фона для роста *in vivo*.

Для трансплантации *SKBR3* под кожу бока мышам инокулировали по $3,0 \times 10^6$ клеток. В опыт отбирали мышей с объемами опухоли 2–3 мм³ (6-е сут после трансплантации) на основе визуальной и пальпаторной верификации опухолевых узлов, из которых формировали экспериментальные группы (n=8). Динамику роста опухоли контролировали, рассчитывая соотношение объемов опухолей, последующих к предыдущему V_t/V_{t-1} . Верификацию гиперэкспрессии рецептора на поверхности клеток опухоли проводили в культуре клеток до имплантации по стандартной методике [3].

Препарат

Для введения мышам использован герцептин («Hoffman La Roche»), который разводили *ex tempore* стерильным физиологическим раствором хлористого натрия до получения рабочих концентраций. Терапевтические дозы выбраны, исходя из данных литературы [6; 7]. Препарат вводили мышам внутривентриально (в/б) в день формирования экспериментальных групп. Курс лечения составлял 9 инъекций, которые выполняли каждые 48–72 ч. Соответственно клиническим рекомендациям 1-я доза препарата была удвоена.

Экспериментальные группы

Были сформированы 4 группы мышей:

1 – контроль. Каждая мышья получала в/б физ. раствор по 0,2 мл по той же схеме, что группы с герцептином.

2 – вводили герцептин. 1-я доза 0,2 мг/кг, остальные разовые дозы по 0,1 мг/кг, суммарная доза 1,1 мг/кг.

3 – вводили герцептин. 1-я доза 2,0 мг/кг, остальные разовые дозы по 1,0 мг/кг, суммарная доза 11,0 мг/кг.

4 – вводили герцептин. 1-я доза 20,0 мг/кг, остальные разовые дозы по 10,0 мг/кг, суммарная доза 110,0 мг/кг.

Оценка эффективности терапии

Для оценки противоопухолевого действия герцептина использован стандартный критерий T/C, где T («*treatment*») – средний объем опухоли в группах с герцептином, а C («*control*») – средний объем опухоли в группе контроля. Минимальный критерий эффективности $T/C \leq 42\%$. Для определения объема опухоли многократно измеряли в различные сроки на фоне и после окончания лечения.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали статистически, используя доверительные интервалы для средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова. Статистическая обработка выполнена с использованием компьютерной программы *Microsoft Excel*. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$. Все результаты фиксировали в специальных протоколах и оформляли в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контроль маркера в культуре клеток показал наличие гиперэкспрессии *Her2+++* (рис. 1).

Показано, что без лечения в группе 1 (контроль) опухоль растет достаточно быстро с коротким латентным периодом (4 дня). Первые пальпируемые опухоли появляются уже на 6-е сут. Прирост опухоли в интервале времени от 16 до 22 сут составил от 61 [30÷92] до 150 [61÷239] мм³, $V_t/V_{t-1}=2,5$; от 22 до 28 сут – от 150 [61÷239] до 299 [188÷410] мм³, $V_t/V_{t-1}=1,9$; от 28 до 34 сут – от 299 [188÷410] до 622 [249÷995] мм³, $V_t/V_{t-1}=2,0$ (см. таблицу, рис. 2).

В группе 2 при лечении герцептином в суммарной дозе 1,1 мг/кг получено слабое ингибирование роста опухоли соответственно срокам наблюдения $T/C=70\%$, 46 %, 42 % ($p < 0,05$) и 64 %. В группе 3 при лечении герцептином в суммарной дозе 11,0 мг/кг получено умеренное ингибирование роста опухоли на все сроки наблюдения: $T/C=38\%$, 27 %, 26% ($p < 0,05$) и 31%.

В группе 4 при лечении герцептином в суммарной дозе 110 мг/кг получен выраженный стойкий достоверный ($p < 0,05$) ингибирующий эффект по всем срокам наблюдения: $T/C=11\%$, 8 %, 7 % и 8 %.

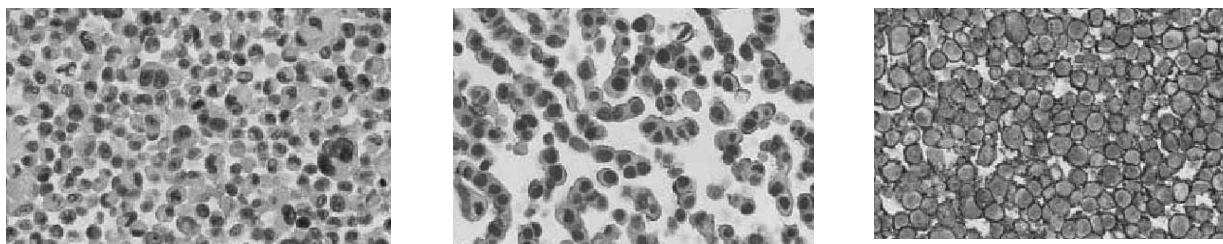


Рис. 1. Контроль гиперэкспрессии *Her2/neu* (окраска с помощью *HercepTest*):

А – контрольный препарат;
Б – атлас по оценке *Her2/neu* окрашивания;
В – DAKO HercepTest.

Эффективность герцептина при лечении подкожных ксенографтов рака молочной железы человека *SKBR3* у мышей-самок *Balb/c nude*

Группа, доза	Объем опухоли на сутки после трансплантации, мм ³				Т/С% на сутки после начала лечения			
	16	22	28	34	11	17	23	29
1. Контроль 0,2 мл физ. раствора	61 [30÷92]	150 [61÷239]	299 [188÷410]	622 [249÷995]	100	100	100	100
2. Герцептин 0,1 мг/кг	43 [23÷63]	69 [33÷105]	126 [71÷181]	399 [222÷576]	70	46	42	64
3. Герцептин 1,0 мг/кг	23 [4÷42]	40 [8÷72]	77 [24÷130]	190 [62÷318]	38	27	26	31
4. Герцептин 10 мг/кг	7 [2÷12]	13 [2÷24]	22 [3÷41]	51 [2÷100]	11	8	7	8

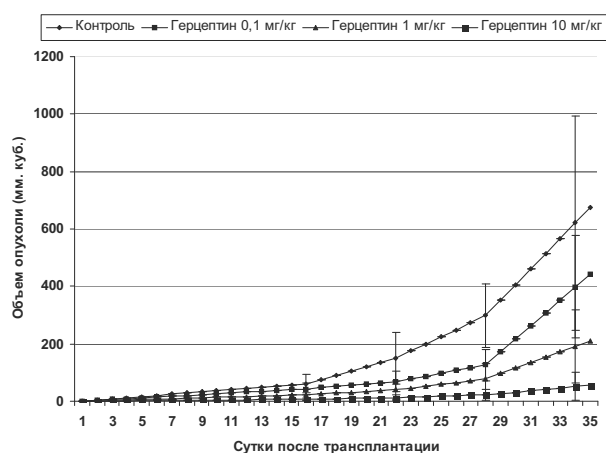


Рис. 2. Кинетика роста подкожных ксенографтов рака молочной железы человека *SKBR3* у мышей-самок *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ под действием герцептина

Представленные данные свидетельствуют о том, что ксенографты рака молочной железы человека *SKBR3* проявляют стандартную чувствительность к герцептину, примененному в/б длительно в диапазоне суммарных доз от 1,1 до 110 мг/кг.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность герцептина на ксенографтах рака молочной железы человека *SKBR3* выражается в достоверном ингибировании роста опухоли, возрастающей при увеличении суммарной дозы в диапазоне от 1,1 до 110 мг/кг при 9-кратном введении в интервалах 48–72 ч.

2. Суммарные дозы герцептина 1,1 и 11 мг/кг вызывают кратковременное достоверное ингибирование роста *SKBR3* (Т/С=42 % и 26 % соответственно) через 2 нед после начала лечения. Суммарная доза 110 мг/кг приводит к стойкому достоверному ингибированию роста опухоли в течение всего периода лечения и затем в течение 5 дней.

3. Подкожные ксенографты *SKBR3 Her2+++* на мышах *Balb/c nude* разведения ГУ РОНЦ характеризуются стандартной чувствительностью к герцептину в диапазоне терапевтических доз и могут быть использованы в качестве модели для экспериментальной оценки моноклональных антител, блокирующих рецептор *HER2/neu*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганьишина И.П., Личиницер М.Р. Герцептин в лечении рака молочной железы с гиперэкспрессией *HER2* // Фарматека. – Онкология ASCO. – 2006. – С. 7–9.
2. Имянитов Е.Н., Князев П.Г. Активация онкогена *ERBB-2* и прогноз течения рака молочной железы у человека. // Вопросы онкологии. – 1991. – Т. 37, № 5. – С. 527–34.
3. Филоненко Д.В., Андропова Н.В., Трещалина Е.М. и др. Разработка моделей для доклинического изучения новых адресных препаратов против *HER2/neu* // РБЖ. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 33–8.
4. *Bangemann N., Burstein H., Harvey V. et al.* Trastuzumab. A Review of its Use in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Overexpressing *HER2* // *Drugs*. – 2002. – 62. – supp. 1. – P. 209–43.
5. *Bangemann N., Kuhle A., Ebert A. et al.* Capecitabine combined with Trastuzumab in the therapy of inten-

sively pretreated *HER2*–overexpressing metastatic breast cancer [abstract] // *Ann. Oncol.* – 2000. – 11(4). – supp. 1. – P. 143.

6. *Baselga J., Norton L., Albanell J. et al.* Recombinant humanized anti-*HER2* antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against *HER2/neu* overexpressing human breast cancer xenografts // *Cancer Res.* – 1998. – 58. – P. 2825–31.

7. *Carter P., Presta L., Gorman C.M. et al.* Humanization of an anti-p185 antibody for human cancer therapy // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1992. – 89. – P. 4285–9.

8. *Fogh J.* One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1997. – 59. – P. 221–6.

9. *Harries M., Smith I.* The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin) // *Endocrine-Related Cancer.* – 2002. – 9. – P. 75–85.

10. *Morimoto H.* Synergistic effect of tumor necrosis factor- α and diphtheria toxin mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines // *J. Immunol.* – 1991. – 147. – P. 2609–16.

11. *Trempe GL.* Human breast cancer in culture // *Recent Results Cancer Res.* – 1976. – 57. – P. 33–41.

Поступила 06.02.2008.