

## Б. Экспериментальные исследования

© Т.А. Шарафутдинова, А.В. Петров, 2016  
УДК616-006-092.9-599-323.4:612.017.1

Вопросы онкологии, 2016. Том 62, № 1

Т.А. Шарафутдинова, А.В. Петров

### Создание модели HER2/neu-позитивной перевиваемой опухоли на иммунокомпетентных мышях

ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург

В работе описан процесс создания модели мышинной опухоли, экспрессирующей рецептор HER2/neu, на основе туморогенной линии DBA гепатомы МН-22а. С помощью постоянной трансфекции и последующего клонирования был отобран клон G10 со стабильно высокой экспрессией HER2/neu. При подкожном введении клеток G10 иммунокомпетентным мышам образуются солидные опухоли, в которых экспрессия человеческого рецептора сохраняется на протяжении, как минимум, трех недель. Терапия трастузумабом приводит к достоверному торможению роста опухолей у животных. Разработанная модель может быть использована для оценки терапевтической активности новых антител против HER2/neu, а также при тестировании конъюгатов на основе антител для диагностики.

**Ключевые слова:** модель опухоли, HER2/neu, гепатома МН-22а, трастузумаб

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста (ЭФР) является перспективной мишенью для таргетной терапии - наиболее привлекательного подхода в лечении онкологических заболеваний [1,2]. Особое внимание уделяется разработке препаратов, специфически направленных против рецептора ЭФР второго типа (HER2/neu), так как его сверхэкспрессия имеет место в 25-30 % случаев рака молочной железы (РМЖ) - одного из самых распространенных онкологических заболеваний. Кроме того, показано, что экспрессия HER2/neu в опухоли ассоциирована с повышением агрессивности опухоли и, следовательно, плохим прогнозом и низкой выживаемостью [5]. На сегодняшний день два препарата рекомбинантных антител к HER2/neu - трастузумаб (Герцептин®) и пертузумаб (Перьета®) («Hoffmann-La Roche») - одобрены в качестве первой линии терапии РМЖ, ряд антител находится на разных стадиях исследований и продолжается активный поиск новых.

Стремительное развитие технологий разработки и производства терапевтических антител

стимулирует поиск удобных моделей для их испытания, позволяющих ускорить внедрение препаратов в клинику. Стандартная схема доклинического тестирования вновь полученных антител включает в себя испытание на клеточных линиях и животных. Для демонстрации специфической активности антител к опухолеассоциированным антигенам *in vivo* обычно используют модели ксенотрансплантации клеток иммунодефицитным животным или трансгенных мышей [3], что усложняет проведение и значительно повышает стоимость ранних этапов скрининга антител.

Целью нашей работы стало создание простой в воспроизведении в условиях обычного вивария модели перевиваемой опухоли у иммунокомпетентных мышей для тестирования терапевтических антител к рецептору HER2/neu.

#### Материалы и методы

Клеточные линии А-549 (легочная аденокарцинома человека), U-2 OS (остеосаркома человека), HeLa (аденокарцинома шейки матки человека), CaCo-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека), CHO (клетки яичников китайского хомячка) и МН-22а (гепатома мыши) были получены из коллекции клеточных культур ИНИЦ РАН (Санкт-Петербург). Все линии, кроме CHO и U-2 OS, культивировали в среде DMEM/F12 (CHO и U-2 OS - в RPMI-1640) с 10% фетальной телячьей сыворотки («HyClone», США).

Фрагмент гена *HER2/neu*, кодирующий внеклеточный, трансмембранный и часть цитоплазматического домена рецептора, был клонирован из кДНК, выделенной из клеточной линии CaCo-2, в вектор pIRES-neo3 («Clontech», США), содержащий ген устойчивости к генетицину (G-418). Полученной плазмидой трансфицировали клетки линии МН-22а. Селекцию осуществляли на фоне 0,1 мг/мл G-418 («Invitrogen», США), индивидуальные клоны получали методом серийных разведений пула стабильно трансфицированных клеток. Оценку экспрессии рецептора HER2/neu на поверхности клеток проводили с помощью проточной цитофлюориметрии. В качестве первых антител при окрашивании использовали биотинилированные антитела к HER-2/neu (клон 2G11, «eBioscience», США). Далее клетки отмывали и докрашивали конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин («eBioscience»). Экспрессию HER2/neu оценивали на проточном цитофлюориметре Epics XL («Beckman Coulter», США).

Для получения опухолей клетки линий МН-22а и МН-22а/HER2<sup>+</sup> (клон G10) ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе (PBS) в концентрации  $1,5 \times 10^7$ /мл и вводили по 200 мкл суспензии подкожно самцам мышей линии DBA (питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия). Мыши содержались в условиях обычного вивария, получали гранулированный корм и воду *ad libitum*. Размеры опухолей измеряли штангенциркулем, объем рассчитывали по формуле:  $V = a \times b^2 / 2$ , где  $a$  - больший,  $b$  - меньший линейный размер опухолевого узла. Через 8-21 день, в зависимости от эксперимента, после инокуляции клеток животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Опухолевый узел вырезали в пределах здоровых тканей и фиксировали в 4% формалине для последующего гистологического и иммуногистохимического исследования. В случае, если в ходе эксперимента опухоль достигала объема более 2 см<sup>3</sup>, животное, из соображений гуманности, выводили из опыта преждевременно.

Фиксированные фрагменты опухолевых узлов обезжировали в спиртах восходящих концентраций и заливали в парафин. Микросрезы окрашивали гематоксилин-эозином («Biovitrum», Россия). Для иммуногистохимического выявления HER2/neu криосрезы толщиной 10 мкм фиксировали в холодном ацетоне, блокировали в растворе PBS с 10% бычьего сывороточного альбумина, окрашивали биотинилированными антителами против HER2/neu («eBioscience») и после отмывки - конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза («Sigma-Aldrich», США). Краску готовили по методу Ponder и Wilkinson [4]. Процесс окрашивания контролировали под микроскопом, ядра докрасивали гематоксилином. Препараты изучали и фотографировали с использованием светового микроскопа с системой визуализации изображений DMLB и цифровой камерой DC 300 («Leica», Германия).

Трастузумаб (Герцептин®, «Roche Diagnostics», Германия) в дозе 250 мкг на животное вводили мышам (n=8) внутрибрюшинно через 1, 5, 10, 13 и 16 суток после инокуляции клеток МН-22а/HER2<sup>+</sup>. Размеры опухолей измеряли через 10, 13, 16 и 20 суток и сравнивали с опухолями контрольных животных, не получавших терапию (n=7).

Для получения культур опухолевых клеток *ex vivo* фрагменты опухолевых узлов асептически гомогенизировали ножницами и инкубировали в растворе коллагеназы I типа из *Cl. histolyticum* («Sigma-Aldrich») и ДНК-зы I типа из поджелудочной железы быка («Биолот», Россия) в PBS 2 часа при комнатной температуре и перемешивании. После инкубации полученную взвесь клеток дважды отмывали раствором PBS. Далее клетки считали и высевали в обычной среде для культивирования.

Для усреднения объемов опухолей в пределах группы использовали среднее геометрическое. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непарного Т-теста Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При выборе клеточной линии для получения экспериментальных опухолей руководствовались следующими требованиями: линия должна иметь эпителиальное происхождение и быть опухолевой в сингенных мышах. Данным критериям среди доступных в коллекции Института цитологии РАН удовлетворяла линия гепатомы МН-22а, которая достаточно часто используется как модельный объект при исследовании действия цитостатиков на опухолевые клетки.

Клетки данной линии были стабильно трансфицированы с помощью вектора pIRES-neo3, содержащего фрагмент гена HER2/neu длиной 2151 п.о., включающий внеклеточный, трансмембранный и часть цитоплазматического домена рецептора HER2/neu. Далее, клетки пула, полученного в результате стабильной трансфекции (МН-22а/HER2<sup>+</sup>), были клонированы методом серийных разведений. У клонов, выросших из единичных клеток, проверяли уровень экспрессии рецептора, в результате чего был отобран клон G10, на клетках которого экспрессия HER2/neu была максимальной, что было подтверждено иммуногистохимически и цитофлюориметрически. При сопоставлении уровня экспрессии рецептора HER2/neu на поверхности клеток G10 и имеющих в нашем распоряжении человеческих линий A-549, U2-OS и HeLa, полученный клон показал наивысший результат (рис. 1).

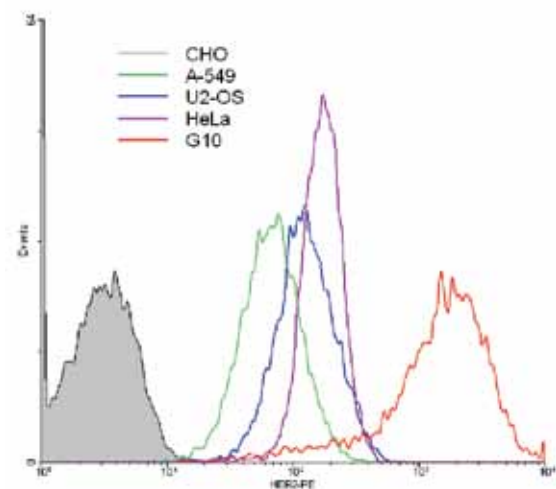


Рис. 1. Цитофлюориметрический анализ экспрессии HER2/neu на поверхности клеток различных линий и полученного клона G10. Серым показан отрицательный контроль – окрашивание клеток линии CHO, не экспрессирующих HER2/neu.

Сравнение скорости роста клеток G10 и родительской линии МН-22а *in vitro* показало, что обе линии имеют сопоставимое время удвоения:  $21,3 \pm 7,1$  часов у G10 и  $19,7 \pm 2,3$  часов у МН-22а.

Известно, что без селективирующего давления экспрессия трансгена в трансфицированных клетках может снижаться, иногда очень существенно. Перед тем, как приступить к работе с животными, выясняли, насколько стабильна экспрессия HER2/neu на поверхности клеток G10. Для этого часть клеток культивировали в течение 40 суток в среде без G-418 и анализировали экспрессию HER2/neu с помощью проточной цитофлюориметрии. При исходной средней интенсивности флуоресценции в  $85,3 \pm 12,3$  у.е. культивирование с селективирующим агентом привело к умеренному увеличению экспрессии до

125,8±13,8 у.е. через 10 суток, что сохранялось до 40 суток (121,5±12,2 у.е.). В отсутствие G-418 в культуральной среде интенсивность флюоресценции осталась на исходном уровне через 10 суток (84,5±12,7 у.е.) и снизилась до 68,0±12,2 у.е. еще через месяц. При этом все клетки оставались HER2/neu-позитивными, что позволяло рассчитывать, что в организме животных экспрессия трансгена может сохраниться достаточно долгое время.

Для получения опухолей *in vivo* суспензию клеток вводили подкожно мышам линии DBA. Сравнение опухолей, полученных при введении клеток МН-22а и G10 показало, что в обоих случаях пальпируемые образования в месте инъекции обнаруживались на 5-7 сутки и постепенно увеличивались в размерах, как правило, до момента вскрытия на 15 сутки. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов опухоли показало, что на протяжении, как минимум, 15 суток экспрессия рецептора HER2/neu на поверхности клеток опухоли сохраняется (рис. 2).

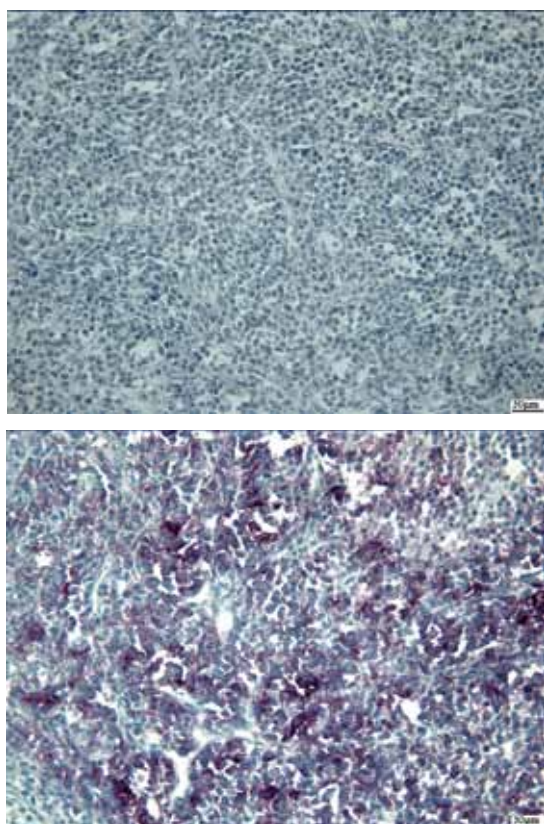


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к HER2/neu препаратов опухолей, полученных через 15 дней после инокуляции мышам клеток МН-22а (сверху) и G10 (снизу). Докрашивание гематоксилином, ×320.

Для того, чтобы проверить, может ли полученная экспериментальная модель быть использована для тестирования терапевтических антител против HER2/neu, был проведен следующий эксперимент: после подкожного введения клеток

G10 двум группам мышей животные опытной группы получали внутрибрюшинные инъекции трастузумаба (способность клеток G10 связываться с трастузумабом *in vitro* была предварительно проверена с помощью проточной цитофлюориметрии, данные не представлены). Измерение опухолей на 10 и 16 сутки после инокуляции показало, что в группе, получавшей инъекции трастузумаба, объемы опухолей были достоверно меньше, чем в контроле (рис. 3). Так, на 10 день средний размер опухолей на фоне терапии был 75 мм<sup>3</sup>, в контроле – 304 мм<sup>3</sup> (p=0,001); на 13 день – 284 мм<sup>3</sup> в опытной группе и 538 мм<sup>3</sup> в контрольной (p=0,1); на 16 день – средний объем образований на фоне лечения составил 218 мм<sup>3</sup>, без лечения – 798 мм<sup>3</sup> (p=0,017). На 16 сутки одна мышь из контрольной группы была выведена из эксперимента из-за неприемлемо большого размера опухоли.

В период с 16 по 20 сутки наблюдалось уменьшение размеров опухолей у мышей контрольной группы, в то время как у животных, получавших терапию антителами, размеры новообразований практически не изменились (рис. 3). Необходимо отметить, что у трех из восьми мышей в группе с лечением трастузумабом и у одной мыши в контрольной группе во время последнего измерения опухоли практически не пальпировались, а при вскрытии в месте введения клеток было обнаружено лишь небольшое соединительнотканное уплотнение.

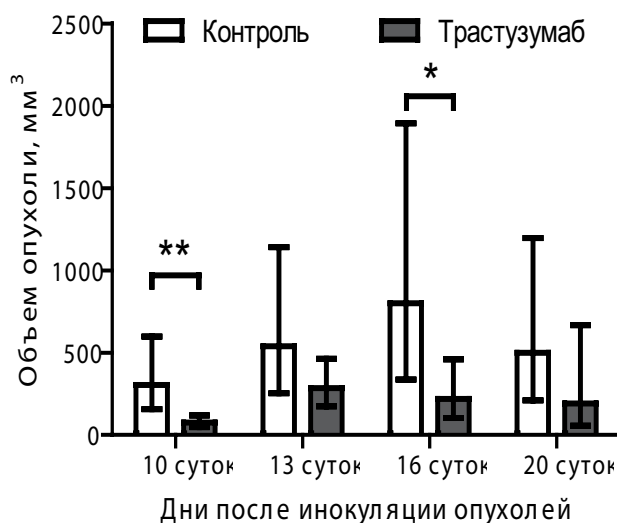


Рис. 3. Динамика размеров экспериментальных опухолей на фоне введения трастузумаба. Показаны средние геометрические и 5-95% доверительные интервалы.

\*, \*\* различия с контролем достоверны, p<0,05 и p<0,01, соответственно.

Наблюдавшееся нами уменьшение размеров опухолей к концу третьей недели после инокуляции у животных контрольной группы может быть потенциально связано как с развитием иммунного ответа против человеческого рецептора,

так и с некрозом опухолевой ткани из-за недостаточной васкуляризации. Следует отметить, что очаги некроза мы ранее наблюдали на препаратах опухолей, индуцированных клетками МН-22а, начиная с 14 суток. С другой стороны, полное исчезновение опухолей у 37% животных на фоне лечения анти-HER2 антителами по сравнению с 14% в контроле может быть прямым следствием таргетной терапии, однако, это утверждение требует более убедительных доказательств в экспериментах с большим количеством мышей.

Уточнение уровня экспрессии HER2/neu в экспериментальных опухолях при терапии трастузумабом проводили, вновь переведя опухолевые клетки в культуру после забоя животных. Для сравнения с исходной интенсивностью экспрессии трансгенного рецептора часть клеток, использованных для получения опухолей в описанном эксперименте, продолжали культивировать, исключив из среды селективный антибиотик. Цитофлюориметрический анализ экспрессии рецептора показал снижение его уровня на клетках, полученных из опухолей, в три-четыре раза по сравнению с культурой *in vitro* (рис. 4). При этом оказалось, что на клетках из опухолей мышей опытной группы, получавшей антитела, HER2/neu экспрессирован достоверно слабее, чем на клетках опухолей животных контрольной группы (рис. 4). Этот факт, по нашему мнению, доказывает, что при введении животным трастузумаба антитела взаимодействовали с опухолью и приводили к отбору клеток со сниженной экспрессией HER2/neu. Возможно, эффект был опосредован запуском механизмов противоопухолевой защиты (например, антителозависимой цитотоксичности), однако для доказательства этого также требуются дополнительные исследования.

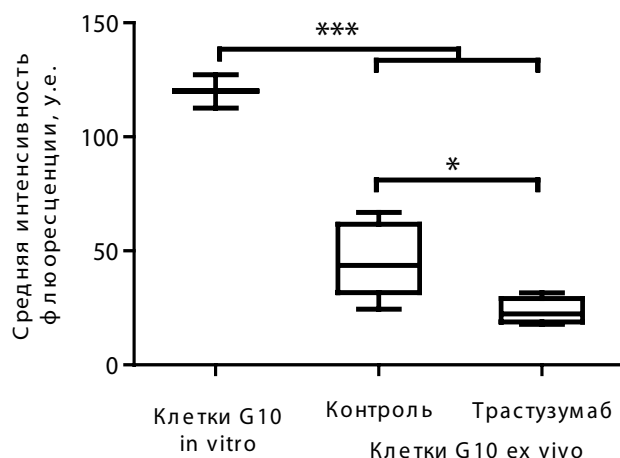


Рис.к 4. Интенсивность экспрессии HER2/neu по данным точной цитофлюориметрии на клетках G10, культивировавшихся *in vitro* без селективного давления, и клетках, выделенных из опухолей животных контрольной группы и группы, получавшей инъекции трастузумаба.

\* и \*\*\* - различия между группами достоверны,  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , соответственно.

В настоящей работе описан процесс создания модели мышинной опухоли, экспрессирующей рецептор HER2/neu, от конструирования экспрессионного вектора до оценки эффективности терапевтических антител для терапии полученной опухоли *in vivo*. Полученные результаты позволяют предполагать, что к концу третьей недели после инокуляции опухолевых клеток иммунокомпетентным сингенным мышам иммунный ответ против клеток опухоли, несущих ксенорецептор, все же развивается, однако, к этому моменту размер опухоли достигает примерно 1 см<sup>3</sup>. Введение трастузумаба приводит к достоверному замедлению скорости роста опухоли, что мы наблюдали в течение второй недели после введения опухолевых клеток; при этом экспрессия HER2/neu на клетках опухоли *in vivo* сохраняется на протяжении, как минимум, трех недель.

Область потенциального применения созданной модели включает оценку специфической активности новых терапевтических антител против HER2/neu. Кроме того, она может использоваться при разработке различных конъюгатов на основе антител для неинвазивной визуализации новообразований. Отсутствие полноценного цитоплазматического домена человеческого рецептора не позволяет применить полученную клеточную линию для изучения проведения сигнала от трансгенного рецептора, однако, это не является существенным недостатком модели. Важно отметить, что воспроизведение данной модели возможно в условиях обычного вивария, поскольку она предполагает использование животных с интактной иммунной системой.

Описанный нами подход вполне может быть применен и при создании моделей для тестирования терапевтических антител к другим опухолеассоциированным антигенам человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mendelsohn J. Blockade of receptors for growth factors: an anti-cancer therapy. // *Clinical Cancer Research* – 2000. – Vol. 6. – P. 747–753.
2. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. // *Endocr. Relat. Cancer* – 2001. – Vol. 8 (1). – P. 3–9.
3. Ostrand-Rosenberg S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. // *Current Opinion in Immunology* – 2004. – Vol. 16. – P. 143–150.
4. Ponder B.A., Wilkinson M.M. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. // *J. Histochem. Cytochem* – 1981. – Vol. 29. – P. 981–984.
5. Slamon, D.J., Clark G.M, Wong S.G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. // *Science* – 1987. – Vol. 235 (4785). – P. 177–182.

Поступила в редакцию 31.07. 2015 г.

*T.A.Sharafutdinova, A.V.Petrov*

**Creation of a model of HER2/neu-positive  
transplantable tumor on the immunocompetent  
mice**

State Research Institute of Pure Biochemicals  
St. Petersburg, Russia

In this study we established a HER2/neu expressing mouse tumor model using hepatoma MH-22a cell line tumorigenic in DBA mice. G10 clone with high level of HER2/neu expression was obtained by stable transfection and cloning. Solid tumors induced by subcutaneous injection of G10 cells into immunocompetent mice retain the expression of human receptor for at least three weeks. Treatment with trastuzumab results in statistically significant inhibition of tumor growth. This model can be used to evaluate in vivo efficiency of novel anti-HER2/neu antibodies and to test antibody-based conjugates for diagnostics.

Key words: tumor model, HER2/neu, hepatoma MH-22a, trastuzumab