

Смирнова Г.Б.¹, Цуркан С.А.², Борисова Ю.А.¹, Черкасова Ж.Р.², Романенко В.И.¹, Калишьян М.С.¹, Трещалина Е.М.¹

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *IN VIVO* ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА RECAF К АФП-СОДЕРЖАЩЕМУ КОМПЛЕКСУ АИМПИЛА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия;

²ООО «ФНЦ "ФармАксес"», 127322, г. Москва, Россия

Проведены эксперименты с нековалентным комплексом АИМПИЛА, направленным на рецепторы альфа-фетопротейна (ReCAF). Использованы подкожные ксенографты опухолей человека с разным содержанием ReCAF, трансплантированные иммунодефицитным мышам Balb/c nude: рака ободочной кишки SW620/ReCAF⁺, рака печени HepG2/ReCAF⁺⁺ и рака молочной железы T47D/ReCAF⁺⁺⁺. АИМПИЛА вводили начиная с 4-го дня после перевивки опухоли перорально ежедневно 5- или 10-кратно в суммарных дозах 0,5–2,0 мг/кг или 1,0–4,0 мг/кг соответственно. Показано, что ингибирование роста опухоли (критерий T/C < 42%) под действием АИМПИЛА возрастает в зависимости от содержания ReCAF: T/C = 70% (SW620/ReCAF⁺), T/C = 51% (HepG2/ReCAF⁺⁺) и T/C = 22% (T47D/ReCAF⁺⁺⁺). На наиболее чувствительной модели в серии опытов как оптимальный определен 10-кратный курс введения в суммарной дозе 4,0 мг/кг, позволяющий получить T/C = 15–37% ($p < 0,05$). При патоморфологическом исследовании срезов T47D/ReCAF⁺⁺⁺ верифицирована гибель большинства опухолевых клеток под действием АИМПИЛА через механизм апоптоза.

Ключевые слова: нековалентный комплекс АИМПИЛА; подкожные ксенографты человека; иммунодефицитные мыши; эффективность.

Для цитирования: Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Борисова Ю.А., Черкасова Ж.Р., Романенко В.И., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Чувствительность *in vivo* опухолей человека с различной экспрессией рецептора RECAF к АФП-содержащему комплексу аимпила. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (5): 288–291. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-288-291>

Для корреспонденции: Смирнова Галина Борисовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник Лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. E-mail: gsmir53@yandex.ru.

Smirnova G.B.¹, Tsurkan S.A.², Borisova Yu.A.¹, Tcherkassova J.R.², Romanenko V.I.¹, Kalishian M.S.¹, Treshalina H.M.¹
SENSITIVITY OF HUMAN TUMORS WITH VARIOUS EXPRESSION OF RECAF RECEPTOR TO AFP-CONTAINING COMPLEX OF AIMPILA *IN VIVO*

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russian Federation;

²Pharmaceutical Research Center «Pharmaccess», Moscow, 127322, Russian Federation

Experimental studies were carried out with non-covalent complex AIMPILA targeting on AFP receptors (ReCAF). The human subcutaneous xenografts were used with different ReCAF containing transplanted to immunodeficient mice Balb/c nude: colon cancer SW620/ReCAF⁺, liver cancer HepG2/ReCAF⁺⁺ and breast cancer T47D/ReCAF⁺⁺⁺. AIMPILA was administrated per os under beginning on 4th day after tumor transplantation daily for 5 or 10 days in the total doses of 0.5–2.0 mg/kg or 1.0–4.0 mg/kg, accordingly. The inhibiting effect ($T/C \leq 42\%$) of AIMPILA was shown to increase in dependence on ReCAF containing on tumor cells: $T/C = 70\%$ (SW620/ReCAF⁺); $T/C = 51\%$ (HepG2/ReCAF⁺⁺) and $T/C = 22\%$ (T47D/ReCAF⁺⁺⁺). On the more sensitive model in a series of experiences 10-times course for the treatment with the total dose of 4.0 mg/kg was detected and revealed to $T/C = 15–37\%$ ($p < 0.05$). In the pathomorphological investigation of the T47D/ReCAF⁺⁺⁺ tumor there was verified the death of the majority of tumor cells under the treatment of AIMPILA via the apoptosis pathway.

Key words: non-covalent complex AIMPILA; ReCAF; efficacy; subcutaneous human tumor xenografts; nude mice.

For citation: Smirnova G.B., Tsurkan S.A., Borisova Yu.A., Tcherkassova J.R., Romanenko V.I., Kalishian M.S., Treshalina H.M. Sensitivity of human tumors with various expression of RECAF receptor to AFP-containing complex of AIMPILA *in vivo*. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2017; 22 (5): 288–291. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-288-291>

For correspondence: Galina B. Smirnova, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Combination Therapy of Tumors of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: gsmir53@yandex.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work has no sponsorship.

Received 29 May 2017

Accepted 22 June 2017

Препарат АИМПИЛА представляет собой запатентованный в России нековалентный комплекс, состоящий из транспортного белка альфа-фетопротейна (АФП) с онкоспецифичным гликозилированием и цитостатической группы, индуцирующей апоптоз. Препарат пероральный, направлен на рецепторы

АФП (receptor alfa fetoprotein, ReCAF) и ориентирован соответственно государственному контракту №13411.1008799.13.166 от 31.07.2013 на лечение колоректального, в том числе метастазирующего, рака [«Трансфер зарубежных разработок лекарственного средства на основе нековалентного комплекса транс-

портного белка, обладающего онкоспецифичным гликозилированием, и агента, индуцирующего апоптоз раковых клеток, для лечения колоректального, в том числе метастазирующего, рака, и проведение его доклинических и клинических исследований». Шифр «2.3 Белковый комплекс 2013». Нековалентные комплексы, особенно с цитостатической группой, рекомендованы для введения в желудок [1]. Для АИМПИЛА нами показано, что при пероральном введении крысам он интернализуется в тонкой кишке [2]. Препарат оказался неактивным *in vitro* и *in vivo* на опухолевых моделях, не содержащих рецепторы АФП [3]. Действие АИМПИЛА на рост ReCAF-положительных опухолей человека ранее не изучали. Соответственно исследования проведены на трёх штаммах подкожных (п/к) ксенографтов опухоли человека с разным содержанием ReCAF: рака ободочной кишки SW620/ReCAF⁺, рака печени HepG2/ReCAF⁺ и рака молочной железы T47D/ReCAF⁺⁺⁺.

Материал и методы

Иммунодефицитные мыши. Для экспериментов с п/к ксенографтами использованы 8-недельные половозрелые мыши-самки и самцы Balb/c nude массой 20–22 г из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [4]. Мышей содержали в условиях специализированного кондиционированного вивария ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» в макролоновых клетках с твердым основанием, аксессуарными и аэросистемой (бумажный фильтр, бутылка внутри, Cage Type II – Hood of open design) фирмы «ЕНHREТGNBA» (Германия) со свободным доступом к воде. В день начала опыта всех мышей взвешивали на электронных весах MW-Tseries, User’s Manual («CAS», США), цена деления 0,01 г под контролем стандартной динамики прироста массы. Для введения в эксперимент мышей перед началом лечения делили на группы по 8–10 особей.

Опухолевые модели. Использовали линию перевиваемого рака молочной железы человека, штамм T47D (исходная линия клеток из ATCC® Cat. No HTB-133™), перевиваемого рака ободочной кишки, штамм SW620 (исходная линия клеток из ATCC® Cat. No CCL-227™) и рака печени человека, штамм HepG2 (исходная линия из ATCC® Cat. No HB-8065™). Штаммы опухолей и культуру клеток получали из Коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [5]. Трансплантацию опухоли выполняли мышам – самкам или самцам Balb/c nude под кожу бока по 40 мг опухолевой ткани в 0,5 мл питательной среды 199. Клеточную суспензию имплантировали мышам под кожу бока по 0,2 мл, что составляло 12·10⁶ опухолевых клеток на мышь.

Исследуемый препарат. АИМПИЛА в виде 5% (50 мг/мл) стокового раствора вводили в желудок металлическим зондом 5–10-кратно ежедневно в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг. Дозы препарата рассчитаны индивидуально на мышь. Лечение начинали через 48 ч после перевивки. Мыши контрольных групп получали соответствующий растворитель в адекватном объеме и режиме применения.

Оценка эффективности лечения. После окончания лечения у всех мышей трехкратно измеряли объемы опухолей, на каждый срок рассчитывали средний объем по формуле:

$$V_{ср} = a \cdot b \cdot c.$$

Для ксенографтов использован стандартный критерий T/C < 42% (treatment/control), рассчитанный по соотношению средних объемов опухолей [6].

Патоморфологическое исследование. Под контролем ряда показателей лечебного патоморфоза (ЛП) в сравнении с опухолью без лечения (контроль) исследованию подвергнуты срезы опухолевых узлов T47D/ReCAF⁺⁺⁺ от мышей, получавших АИМПИЛА в суммарной дозе 1,0 мг/кг. Исследованы образцы опухолей (n = 18), взятые от мышей на 12-е сутки после окончания эффективного лечения АИМПИЛА (n = 9) и от контрольных мышей на 18-е сутки роста (КРО) (n = 9). С помощью стандартной гистологической окраски при световой микроскопии изучены следующие морфологические особенности опухоли: структура, показатели программированной и некротической гибели клеток, пролиферативная активность и степень полиформизма.

Оценка переносимости воздействия. Проведена по состоянию и поведению мышей в процессе эксперимента, следили за гибелью от токсичности.

Статистическая обработка результатов. Результаты исследования подвергнуты статистической обработке путём расчёта критерия t Стьюдента с помощью компьютерных программ Excel 2013 и Excel для Windows 2007. Значимыми считали различия при p < 0,05. Расчетные статистические величины приведены в таблицах.

Завершение экспериментов. После завершения экспериментов животных умерщвляли посредством передозировки эфирного наркоза при соблюдении гуманных методов обращения, принятых в РФ. Павших или умерщвлённых мышей с соблюдением гуманных методов подвергали аутопсии для выявления визуальных патологических изменений внутренних органов [7, 8].

Результаты

T47D/ReCAF⁺⁺⁺

Показано, что п/к ксенографты без лечения в группе КРО растут достаточно быстро, опухолевые узлы увеличивались в период наблюдения более чем в 10 раз. АИМПИЛА при всех изученных суммарных дозах в режиме 5-кратного лечения (рис. 1) вызывал достоверное (p < 0,05), но кратковременное ингибирование роста T47D только в 1-е сутки после окончания лечения. Эффективность при суммарных дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг на этот срок составила T/C = 33%, T/C = 44% и T/C = 18% соответственно. Переносимость 5-кратного курса

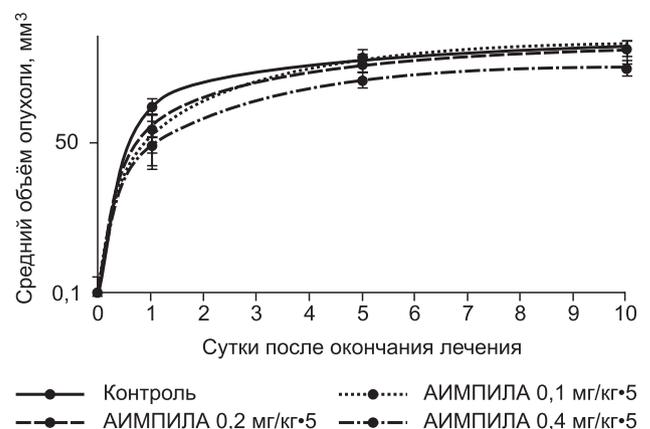


Рис. 1. Динамика роста T47D под действием 5-кратного курса лечения АИМПИЛА в суммарных дозах от 0,5 до 2,0 мг/кг.

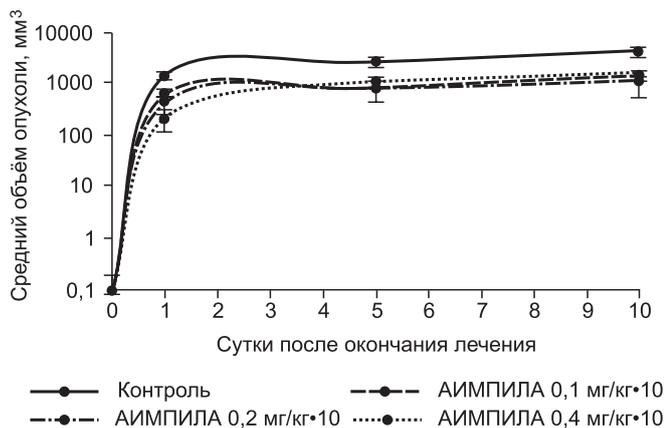


Рис. 2. Динамика роста T47D под действием 10-кратного курса лечения АИМПИА в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг.

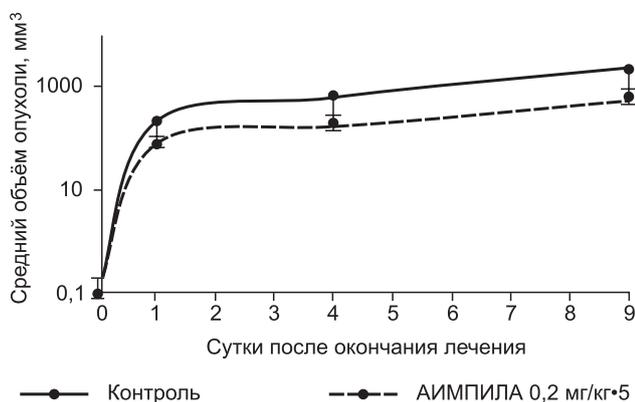


Рис. 3. Эффективность перорального АИМПИА в суммарной дозе 1 мг/кг при 5-кратном курсе лечения п/к ксенографтов рака печени человека HepG2.

лечения АИМПИА была удовлетворительной во всех случаях без побочных эффектов. Данные на T47D, полученные при 10-кратном курсе лечения АИМПИА в трех суммарных дозах от 1,0 до 4,0 мг/кг, представлены на рис. 2. Видно, что оценка эффективности лечения выполнена в более поздние сроки роста опухолевых узлов, размеры которых к началу измерений были больше исходных в 6,6 раза и увеличивались в период наблюдения в 2,8 раза. На этом фоне при применении АИМПИА в суммарных дозах 1,0–2,0–4,0 мг/кг при 10-кратном лечении получен достоверный ($p < 0,05$) противоопухолевый эффект во все сроки после окончания лечения. Соответственно ингибирование роста достигло Т/С = 37–43%, Т/С = 26–32% и Т/С = 15–37% в прямой зависимости от величины суммарной дозы. Переносимость 10-кратного курса лечения АИМПИА была удовлетворительной без побочных эффектов.

HepG2/ReCAF⁺⁺

АИМПИА вводили мышам 5-кратно (2–6-е сутки после трансплантации) в разовой дозе 0,2 мг/кг, суммарно 1,0 мг/кг. Наблюдение продолжали в течение 21 сут после трансплантации опухоли с трёхкратным измерением опухолевых узлов. Результаты исследования приведены на рис. 3.

На представленной иллюстрации видно, что п/к ксенографты HepG2 без лечения растут достаточно быстро, и начиная с 15-х суток после трансплантации опухолевые узлы увеличиваются в 10 раз в течение 3 нед после трансплантации. В группе мышей, получившей АИМПИА, наблюдали недостоверное ингибирование роста опухоли, $V_{ср} = 19,9 \pm 14,3 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 39,3 \pm 30,1 \text{ мм}^3$ в 1-е сутки, $V_{ср} = 112,9 \pm 97,2 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 70,4 \pm 46,0 \text{ мм}^3$ на 3-и сутки и $V_{ср} = 247,7 \pm 147,9 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 386,86 \pm 329,78 \text{ мм}^3$ ($p > 0,05$) на 7-е сутки после окончания лечения. Соответственно Т/С = 50, 62 и 64% ($p > 0,05$). Переносимость лечения АИМПИА была удовлетворительной без побочных эффектов. Таким образом, АИМПИА в разовой дозе 0,2 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 5 дней (суммарно 1,0 мг/кг) вызывает недостоверный противоопухолевый эффект на уровне Т/С = 50–64% ($p = 0,05–0,1$) на п/к ксенографтах рака печени человека HepG2.

SW620/ReCAF⁺

АИМПИА в разовых дозах 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг (суммарно 1,0, 2,0 и 4,0 мг/кг) вводили мышам ежедневно на 4–14-е сутки после трансплантации опухоли. Наблюдение продолжали в течение 7 сут после окончания лечения с двукратным измерением опухолевых узлов. П/к ксенографты рака ободочной кишки человека SW620 без лечения на 11-е сутки после трансплантации достигли объема $V_{ср} = 1565 \pm 677 \text{ мм}^3$ и $V_{ср} = 2747 \pm 1061 \text{ мм}^3$ к окончанию опыта. Под действием 10-кратного курса АИМПИА в диапазоне доз значимый противоопухолевый эффект не достигнут, Т/С = 70–88%. При этом в 1-е и 5-е сутки после окончания лечения независимо от величины применённой дозы размеры опухолей были все же достоверно меньше контрольных, Т/С = 70–72% ($p < 0,05$). Переносимость лечения была удовлетворительной (рис. 4, табл. 1).

Патоморфологическая картина T47D/ReCAF⁺⁺⁺

Показано, что в опухоли под действием АИМПИА на фоне значимого ингибирования её роста (в группе АИМПИА) при снижении пролиферативной активности и степени клеточного полиморфизма в опухоли многократно и достоверно ($p = 0,000$) усилены процессы апоптоза и некроза. В группе АИМПИА в сравнении с группой КРО (табл. 2):

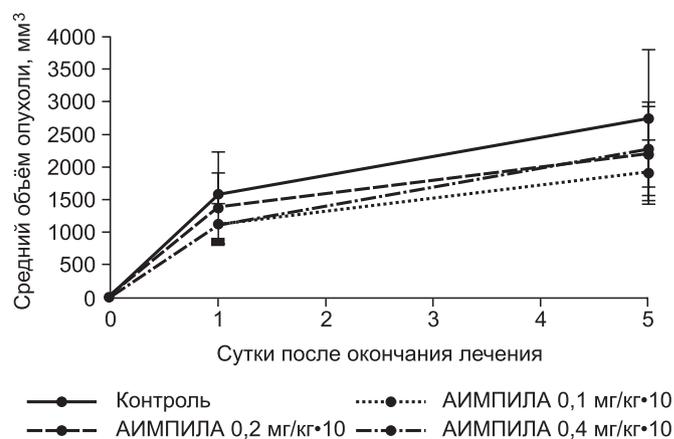


Рис. 4. Динамика роста SW620 под действием 10-кратного курса лечения АИМПИА в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг

Таблица 1
Чувствительность п/к ксенографтов T47D, HepG2 и SW620 с различной экспрессией ReCAF к АИМПИЛА

Группа	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, дни	Суммарная доза, мг/кг	T/C, %, через 8 дней после лечения*
Контроль	0,2 мл	–	–	100
<i>T47D/ReCAF + + +</i>				
АИМПИЛА	0,1–0,4	5	0,5–2,0	18–44
АИМПИЛА	0,1–0,4	10	1,0–4,0	15–37
<i>HepG2/ReCAF + +</i>				
АИМПИЛА	0,2	5	1,0	50–64
<i>SW620/ReCAF +</i>				
АИМПИЛА	0,1–0,4	10	1,0–4,0	70–88

Примечание. * – стандартный критерий эффективности T/C ≤ 42% (treatment/control × 100%).

Таблица 2
ЛП в п/к ксенографтах рака молочной железы человека T47D у мышей-самок Balb/c nude под действием АИМПИЛА 1,0 мг/кг

Группы, n = 9	Морфологические показатели ЛП				площадь некрозов, %
	диаметр поперечного среза опухоли, см	клетки с признаками		степень полиморфизма	
		митоза, %	апоптоза, %		
АИМПИЛА	0,67 ± 0,1	0,39 ± 0,09	1,8 ± 0,12	+	24,1 ± 1,23
КРО	1,6 ± 0,17	2,8 ± 0,24	0,29 ± 0,04	++	12,3 ± 0,45

- средний диаметр среза 0,67 ± 0,1 см против 1,6 ± 0,17 см (уменьшение в 2,4 раза);
- количество клеток в митозе 0,39 ± 0,09% против 2,8% (уменьшение в 9,6 раза);
- количество клеток с признаками апоптоза 1,8 ± 0,16% против 0,29% (увеличение в 6,2 раза);
- зона некротического поражения 24,1% против 12,1% (увеличение в 2 раза);
- двукратное уменьшение степени полиморфизма.

Закключение

Полученные количественные данные являются морфологическим подтверждением ингибирующего действия АИМПИЛА на рост п/к ксенографтов. Индукцию апоптоза и блокирование митоза, показавших многократную положительную антипролиферативную динамику под действием АИМПИЛА, можно обсуждать в качестве возможных механизмов ингибирования.

Эксперименты проведены с нековалентным комплексом АИМПИЛА, направленным на рецепторы АФП (ReCAF). Использованы подкожные ксенографты опухолей человека с разным содержанием ReCAF, трансплантированные иммунодефицитным мышам Balb/c nude: рак ободочной кишки SW620/ReCAF⁺, рак печени HepG2/ReCAF⁺⁺ и рак молочной железы T47D/ReCAF⁺⁺⁺. АИМПИЛА вводили, начиная на 4-й день после перерывки опухоли, перорально ежедневно 5-тикратно или 10-тикратно в суммарных дозах 0,5–2,0 мг/кг или 1,0–4,0 мг/кг, соответственно. Показано, что ингибирование роста опухоли (критерий T/C < 42%) под действием АИМПИЛА возрастает в зависимости от содержания ReCAF: T/C = 70% (SW620/ReCAF⁺), T/C = 51% (HepG2/

ReCAF⁺⁺) и T/C = 22% (T47D/ReCAF⁺⁺⁺). На наиболее чувствительной модели в серии опытов как оптимальный определен 10-кратный курс введения в суммарной дозе 4,0 мг/кг, позволяющий получить T/C = 15–37% (p < 0,05). При патоморфологическом исследовании срезов T47D/ReCAF⁺⁺⁺ верифицирована гибель большинства опухолевых клеток под действием АИМПИЛА через механизм апоптоза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пак В. Композиция альфа-фетопротейна и индукторов апоптоза для лечения рака. Патент РФ, №2438695; 2012.
2. Андропова Н.В., Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Оценка интернализации АФП-содержащего нековалентного комплекса АИМПИЛА в модели изолированного отрезка толстой кишки крыс. *Российский онкологический журнал*. 2016; 21(6): 308–11.
3. Трещалина Е.М., Цуркан С.А., Черкасова Ж.Р., Лесная Н.А. Роль рецептора альфафетопротейна в разработке таргетных препаратов для онкологической патологии. *Российский онкологический журнал*. 2017; 1(22): 4–14.
4. Трещалина Е.М. *Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования*. М.: Издательская группа РОНЦ; 2010.
5. Трещалина Е.М. *Коллекция опухолевых штаммов человека* / Под ред. М.И. Давыдова. М.: 2009.
6. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: изд. Гриф и К. 2012; 39: 642–57.
7. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург. *Ланималогия*. 1993; 1: 29.
8. Большаков, О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ. 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. *Качественная клиническая практика*. 2002; 9: 1–15.

REFERENCES

1. Pak V. Song alpha-fetoprotein and Inducers of apoptosis to treat cancer. Patent RF, №2438695; 2012. (in Russian)
2. Andronova N.V., Cherkasova Zh.R., Turcan S.A., Smirnova G.B., Treschalina H.M. Evaluation of the internalization of AFP-containing non-covalent co-plex of AMPILA in the model of an isolated segment of the large intestine of rats. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. 2016; 21(6): 308–11. (in Russian)
3. Treschalina H.M., Tsurkan S.A., Cherkasova Zh.R., Lesnaya N.A. The role of the receptor of alfa-fetoprotein in the development of targeted drugs for oncological pathology. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. 2017; 1(22): 4–14. (in Russian)
4. Treschalina H.M. *Immunodefitsitnye mice breeding RNTS im.NN Blohin RAMS. Possibilities of use*. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONC; 2010. (in Russian)
5. Treschalina H.M. *Collection of human tumor strains*. / Ed. M.I. Davydov. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2009. (in Russian)
6. Treschalina H.M. Methodical recommendations on preclinical study of antitumor activity of drugs. In: *The guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif i K. 2012; 39: 642–57. (in Russian)
7. European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Purposes, EEC, Strasbourg. *Lanimalogiya*. 1993; 1: 29.
8. Bolshakov O.P. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. WHO. 2000. Recommendations to ethics committees conducting an examination of biomedical research. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2002; 9: 1–15. (in Russian)

Поступила 29.05.17
Принята к печати 22.06.17