

УДК 57.088.1

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА ЦЕТУКСИМАБ БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

© 2023 г. А. А. Хоромская², А. С. Сергеева², А. Г. Родионова², Д. С. Саакян² *,
Е. А. Гузов², А. В. Исеркапов¹, В. М. Кошшкин¹, В. Г. Игнатъев¹

¹АО «Р-Фарм», Москва, 119421 Россия

²Ярославский завод готовых лекарственных форм и биотехнологических субстанций,
филиал АО «Р-Фарм», Ярославль, 150061 Россия

*e-mail: ds.novoselova@rpharm.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

С целью разработки методики определения специфической активности препарата цетуксимаб, методом проточной цитометрии проанализирована способность клеточных линий эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC CRL-1555), аденокарциномы простаты человека DU 145 (ATCC HBT-81) и РС-3 (ATCC CRL-1435), колоректальной аденокарциномы человека Сасо-2 (ATCC HTB-37) и карциномы легкого А549 (ATCC CCL-185) экспрессировать EGFR. Установлено, что линия А431 отличается гиперэкспрессией EGFR на поверхности клеток. Методом ИФА установлено, что эта клеточная линия обладает наибольшей степенью связывания с препаратом цетуксимаб, поэтому именно она была выбрана для разработки и оптимизации методики. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста, используя для растворения кристаллов образующегося формазана лизирующий буфер. На основании валидационных испытаний подтверждено соответствие разработанной методики критерию приемлемости метода в аналитической области концентрации препарата 7812.5–30.5 нг/мл.

Ключевые слова: EGFR, рак, терапия моноклональными антителами, цетуксимаб

DOI: 10.56304/S0234275823020059

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR/c-erbB1) был впервые обнаружен в клетках эпидермоидной карциномы [1]. Как и другие рецепторы фактора роста семейства erbB, EGFR состоит из внеклеточного домена, который связывает соответствующие лиганды, трансмембранного домена и внутриклеточного тирозинкиназного домена [2]. Несколько лигандов, включая эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста- α , амфигулин, херегулин или бета-целлюлин, могут активировать данный рецептор [3]. Связывание лиганда с внеклеточным доменом EGFR приводит к димеризации рецепторного комплекса, что способствует активации последующих сигнальных путей и кросс-автофосфорилированию других трансмембранных рецепторов [4]. После активации лигандом, EGFR запускает каскад молекулярных реакций, включающий снижение экспрессии большой группы микроРНК, усиливает регуляцию вновь синтезированных мРНК и ковалентные модификации белков. Наряду с драйверными мутациями, EGFR стимулирует метастазирование [5]. Паракринные петли,

включающие опухолевые и стромальные клетки, позволяют EGFR стимулировать инвазию через тканевые барьеры, выживание скоплений циркулирующих опухолевых клеток, а также колонизацию отдаленных органов [6].

EGFR играет ключевую роль в онкогенезе [7], при этом многие солидные опухоли человека, а также рак толстой кишки [8], рак молочной железы и немелкоклеточный рак легких [9] сверхэкспрессируют EGFR. По этим причинам EGFR и его гетеродимер HER2/ERBB2, являются популярными мишенями противораковых терапий [10].

EGFR является первой молекулярной мишенью, для которой были разработаны моноклональные антитела (mAb) для терапии рака. Эффективность EGFR-специфического mAb при лечении рака достигается благодаря ингибированию EGFR-генерируемой сигнализации, кроме того, воздействие антител на иммунную систему, по-видимому, играет важную роль в формировании противоопухолевого ответа [11]. Анти-EGFR моноклональные антитела связываются с внеклеточным доменом EGFR в его неактивном состоя-

нии [12]. Происходит конкуренция за связывание с рецептором путем блокировки лиганд-связывающей области и ингибирование активации тирозинкиназы EGFR [13].

Современные научные исследования открывают для клинической практики хорошие перспективы лекарственного лечения онкологических заболеваний [14]. Одним из подходов противораковой терапии является регулирование активности EGFR. Ингибиторы EGFR входят в группу таргетных препаратов, действие которых направлено на конкретную специфическую молекулу, не поражая при этом нецелевые делящиеся клетки [15].

Вследствие повышенной активности EGFR раковые клетки начинают неконтролируемо делиться и метастазируют в соседние ткани и органы. Кроме того, начинается процесс образования кровеносных сосудов (ангиогенез), которые питают опухоль. Многочисленные исследования и медицинская практика показывают, что при мутации генов EGFR значительно ухудшается прогноз для больного [16]. Это понимание привело к необходимости создания препаратов, способных блокировать данный рецепторный белок. Основная проблема заключается в том, что молекулярно-генетические свойства рака и его гистологический тип не всегда связаны друг с другом. Даже если рассматривать два одинаковых типа рака, то может выясниться, что в одном активность EGFR выше нормы, а в другом наоборот, низкая [17]. Таким образом, повышенная экспрессия EGFR в тканях, вероятно, будет сильной прогностической особенностью при нескольких типах опухолей, и ингибирование ее клеточных действий, по-видимому, дает существенные терапевтические преимущества [18].

Одним из вариантов решения данной проблемы является применение моноклонального антитела – цетуксимаб. Цетуксимаб является анти-EGFR моноклональным антителом. Его механизм действия включает блокирование сигнала пролиферации раковых клеток посредством ингибирования сигнальных путей EGFR/Pi3K/AKT/mTOR или EGFR/Ras/Raf/MAPK/ERK. Блокирование сигнала приводит к ингибированию клеточного деления в G1 фазе из-за отсутствия необходимых факторов транскрипции с последующей элиминацией клеток путем апоптоза [19].

Кроме того, связывание цетуксимаба инициирует интернализацию и деградацию EGFR, что приводит к прекращению сигнала [20]. Более того, в отличие от ингибиторов тирозинкиназы EGFR, цетуксимаб потенциально может провоцировать иммунологические противоопухолевые эффекты, такие как ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) [21].

Целью данной работы была разработка и оптимизация методики оценки специфической активности препарата цетуксимаб биологическим методом,

выбор наиболее подходящей для этой цели клеточной линии, а также валидация данной методики.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Стандартный образец. В данном исследовании использовался внутренний стандартный образец предприятия цетуксимаб, полученный путем рекомбинантных технологий. Аминокислотная последовательность стандартного образца идентична препарату Эрбитукс® (цетуксимаб) и взята из открытого источника (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00002>). Нуклеотидные последовательности стандартного образца генерировались с аминокислотной последовательности Эрбитукса®, оптимизировались для клонирования и экспрессии в системе клеток яичников китайских хомячков CHO-K1 и искусственно синтезировались. После клонирования вектора, одновременно содержащего участки, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, проводилась трансфекция CHO-K1 клеток. Затем с помощью селекции и скрининга создавалась стабильная суспензионная клеточная линия, экспрессирующая цетуксимаб. Высокопроизводительные клоны клеток использовались для создания системы банков клеток для последующего производства препарата цетуксимаб.

Клеточные линии. В данном исследовании использовали клеточные линии эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC CRL-1555, США), клеточные линии аденокарциномы простаты человека DU 145 (ATCC HTB-81, США) и PC-3 (ATCC CRL-1435, США), колоректальной аденокарциномы человека Caco-2 (ATCC HTB-37, США) и карциномы легкого A549 (ATCC CCL-185, США).

Клетки культивировали, добавляя в среду эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США), L-глутамин (“ПанЭко”, Россия) и 1% пенициллин-стрептомицин (“ПанЭко”), в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C до образования монослоя. Использованные среды и концентрация сыворотки приведены в табл. 1.

Проточная цитометрия. Клеточные линии для исследования были отобраны из базы данных Human protein atlas на основании установленной экспрессии мРНК EGFR. В качестве контроля использовали клеточную линию A431 с гиперэкспрессией EGFR. Окраску проводили антителами к EGFR. Клетки переносили из культурального планшета в пробирки для проточной цитометрии, отмывали центрифугированием (скорость 200g, время 5 мин) в PBS и добавляли в каждую пробирку по 10 мкл флуоресцентного конъюгата Ат к EGFR с г-фикоэритрином (PE) и соответствующие изотипические антитела, инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали буфером FACS (PBS (Gibco, США), 0.2% (w/v) BSA

Таблица 1. Питательные среды для культивирования клеточных линий и содержание фетальной бычьей сыворотки в них**Table 1.** Nutrient media for cultivation of cell lines and the content of fetal bovine serum in them

Наименование клеточной линии	Наименование питательной среды	Концентрация фетальной бычьей сыворотки
A549	Ham's F-12	10
Caco-2	EMEM	20
DU-145	EMEM	10
PC-3	Ham's F-12	10
A431	DMEM/F12	10

(Sigma Aldrich, США), 10 мМ азида натрия (Sigma Aldrich)) и оценивали количество клеток с экспрессией EGFR при помощи программного обеспечения ACEA Novo Express software v1.3.1. Для проведения испытаний использовался прибор NovoCyte (Agilent, США).

МТТ тест. Каждую клеточную линию (5000–30000 клеток) инкубировали с цетуксимабом (1000 мкг/мл – 1.9 нг/мл) в 96-луночном планшете в трех повторностях. После инкубации в течение 48, 72, 96 ч при 37°C, в каждую лунку добавляли МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (Sigma Aldrich) и проводили инкубацию в течение 4 ч. Затем надосадочную жидкость удаляли и растворяли кристаллы формазана в ДМСО или в 100 мкл лизирующего буфера следующего состава: 50 мМ натрий ацетат (Merck, Германия), 700 мМ натрий лаурилсульфат (Sigma Aldrich), 6.5 М диметилформамид (Sigma Aldrich). Колориметрическую оценку раствора при 560/670 нм проводили с использованием планшетного спектрофотометра CLARIOstar Plus (BMG labtech, Германия). Ингибирование пролиферации оценивали, рассчитывая процент роста клеток, индуцированных цетуксимабом, по сравнению с ростом, индуцированным контрольным mAb.

Иммуноферментный анализ. Связывание цетуксимаба с рецептором EGFR проверяли с помощью иммуноферментного анализа на клетках. Клетки A431, A549, Du-145 были засеяны в 96-луночный планшет с концентрацией 20000 клеток/лунка. На следующий день клетки промывали раствором для промывки (0.05% твин-80 в фосфатно-солевом буферном растворе) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом (Santa Cruz, США). Для блокировки неспецифического взаимодействия использовали 1% BSA, после чего добавляли серийно разведенные образцы цетуксимаба и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Связывание цетуксимаба с EGFR на поверхности клеток фиксировали с помощью HRP-конъюгированного кроличьего античеловеческого IgG в течение 1 ч при комнатной температуре. Несвязанное вторичное детектирующее антитело удаляли путем трехкратной промывки промывочным буфером

(0.05% твин-80 в фосфатно-солевом буферном растворе). Активность HRP (horseradish peroxidase) в каждой лунке определяли по конверсии субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Sigma Aldrich), который добавляли после инкубирования со вторичными антителами в объеме 100 мкл/лунка. Образовавшуюся в кислых условиях желтую окраску фиксировали при 450 нм.

Метод определения титра антител с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографическое разделение проводили на приборе Waters, США) с использованием колонки Immuno Detection ProteinA C18 (2.1 × 3 мм, Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 25°C. Подвижная фаза: (А) – 50 мМ натрия фосфат, 150 мМ натрия хлорид, рН 7.0 ± 0.2 (В) – 100 мМ натрия фосфат, 150 мМ натрия хлорид. Условия элюирования: 0–0.51 мин 100% А; 0.51–1.51 мин 100% В; 1.51–3 мин. 100% А. Скорость потока – 3 мл/мин; объем вводимого образца – 100 мкл.

Методика определения специфической активности препарата цетуксимаб биологическим методом. Финальная версия. Клеточную линию A431 (10000 клеток) инкубировали с цетуксимабом (7812.5 нг/мл – 30.5 нг/мл) в 96-луночном планшете в трех повторностях. После инкубации в течение 96 ч при 37°C, каждую лунку добавляли 10 мкл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид, 5 мг/мл, (Sigma Aldrich) и проводили инкубацию в течение 4 ч. Затем растворяли кристаллы формазана в лизирующем буфере, нагретом до 37°C, и перемешивали на шейкере со скоростью 450 об/мин, при температуре 37°C в течение 3 ч. Окраску оценивали колориметрически при 560 нм с использованием планшетного спектрофотометра CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия).

Учет результатов испытания.

По полученным значениям оптической плотности строили график четырех параметрической логистической зависимости усредненных по трем повторностям значений оптической плотности стандартного и испытуемого образцов от концентрации (нг/мл). Используя значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50), по-

лученные из кривых зависимости, рассчитывали значения относительной активности испытуемого образца.

При валидационных испытаниях процедуры оценки специфической активности препарата цетуксимаб критериями пригодности методики были следующие требования:

1. Относительное стандартное отклонение (CV) значений оптической плотности для трех повторностей каждого разведения образца не более 20%;

Примечание – Допускается удаление не более трех точек из разных разведений и не более одной точки из одного разведения как выброс.

2. Квадрат коэффициента линейной аппроксимации R^2 не менее 0.95.

3. Среднее значение оптической плотности в лунках с клеточным контролем не должно быть ниже средних значений оптических плотностей в лунках с минимальной концентрацией образца более, чем на 0.2 о.е.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии EGFR в клеточных линиях A431, Caco2, PC-3, DU 145, A549

Согласно полученным данным, все исследованные клеточные культуры эпидермоидной карциномы A431, Caco2, аденокарциномы предстательной железы PC-3, DU 145, карциномы легкого A549 экспрессировали EGFR на поверхности клеток. Линия A431 отличалась гиперэкспрессией EGFR. Остальные клеточные линии имели сравнимый уровень экспрессии.

Поиск дозозависимого эффекта путем постановки МТТ-теста

После предварительных экспериментов с использованием клеточных линий A549, DU 145, A431, PC-3, Caco-2 последняя была исключена из испытания в связи с длительным временем удвоения числа данных клеток (~ 80 ч), что критично при времени анализа 96 ч в МТТ тесте (рис. 1а). Основанием для исключения из испытаний клеточной линии PC-3 послужили неудовлетворительные результаты, полученные при ее использовании: оптическая плотность в контрольных лунках (клетки+питательная среда) была в 2 раза ниже чем у клеточной линии DU-145 с аналогичным временем удвоения (рис. 1b, 1c).

а) Клеточная линия Caco-2

Для поиска дозозависимого эффекта при проведении МТТ-теста были использованы клеточные линии A549, DU 145, A431.

В диапазоне концентраций препарата цетуксимаб 5000–100 мкг/мл дозозависимого эффекта

не обнаружено. Разница между значениями оптической плотности была незначительной.

Анализ связывания EGFR и препарата цетуксимаб методом иммуоферментного анализа

Ввиду отсутствия видимого дозозависимого эффекта, при постановке МТТ-теста с концентрациями исследуемого образца (5000–100 мкг/мл), определение связывания препарата цетуксимаб с EGFR проводили методом иммуоферментного анализа с использованием клеточных линий A431, A549 и DU 145. Наличие связывания было подтверждено на всех клеточных линиях, однако его степень у клеточных линий A549 и DU-145 гораздо ниже чем у клеточной линии A431.

При одинаковых количествах клеток и испытуемого препарата, оптическая плотность в точке с максимальной концентрацией препарата составляла: 1.5 о.е для клеток A431; 0.698 о.е для клеток A549; 0.293 о.е для клеток Du-145 (рис. 2). На основании этих данных клеточная линия DU-145 была исключена из анализа.

Анализ связывания EGFR и препарата цетуксимаб методом аффинной ВЭЖХ

Клетки A431 и A549 засеивали в 96-луночный планшет с концентрацией 2000 и 4000 клеток/лунка, через 4 ч добавляли цетуксимаб, разбавленный в питательной среде без фетальной бычьей сыворотки, в концентрациях от 1000 до 4 мкг, с шагом разбавления 2. Инкубировали клетки с препаратом 24, 48, 72 и 96 ч и в каждой контрольной точке отбирали супернатант и проводили анализ титра антител в исследуемом образце методом ВЭЖХ.

На основании полученных результатов установлено, что при данных концентрациях клеток и препарата аффинная хроматография не позволяет оценить степень взаимодействия препарата с EGFR.

Подбор оптимальной концентрации клеток

Ввиду большого количества сайтов связывания на клеточной линии A431, упрощается подбор оптимального соотношения концентраций клеток и препарата, так как может быть использован достаточно широкий диапазон используемых концентраций. Для клеточной линии A549 рабочий диапазон концентраций будет находиться в области с более низкими концентрациями препарата.

При анализе роста клеточной линии A431 в 96-луночный планшет засеивали 2, 5, 10, 15, 20, 30 тыс. клеток в соответствующие лунки, инкубировали 24, 48, 72, 96 ч и в каждой контрольной точке оценивали конfluence и производили подсчет клеток. Полученные результаты представлены в табл. 2.

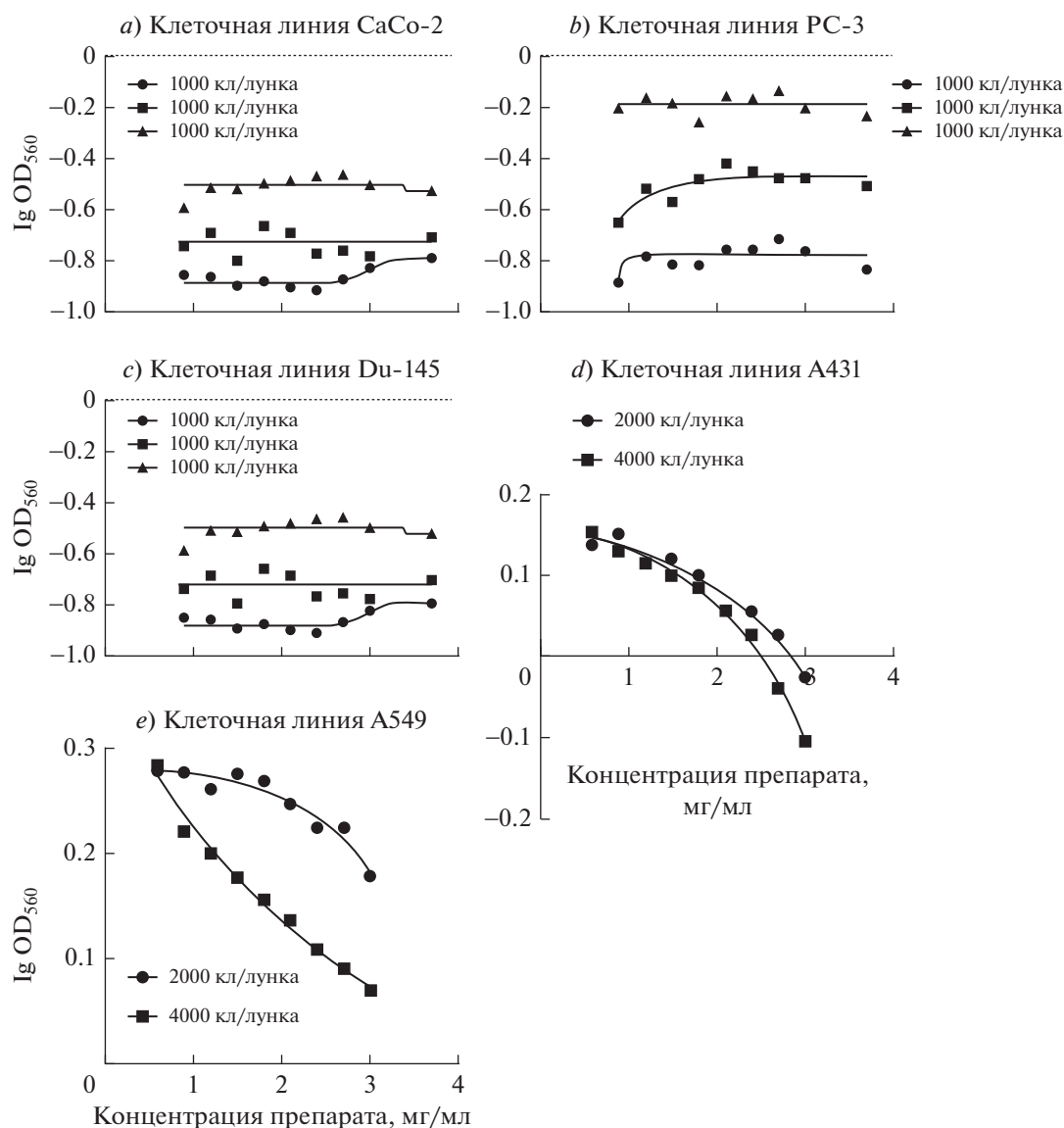


Рис. 1. Результат МТТ-теста при инкубировании клеток с образцом цетуксимаба в течение 96 ч, концентрация препарата 5000–7.8 мкг/мл.
Fig. 1. MTT-test result when cells were incubated with cetuximab sample for 96 h, drug concentration 5000–7.8 µg/mL.

С учетом полученных результатов для проведения МТТ теста первоначально для анализа были выбраны концентрации препарата от 1000 мкг/мл до 1.91 нг/мл с шагом разбавления 2 и концентрациями клеток 20 и 30 тысяч клеток на лунку. Препарат разводили в среде без фетальной бычьей сыворотки и инкубировали с клетками в течение 96 ч. Затем к препарату добавляли 10 мкл МТТ с концентрацией 5 мг/мл, инкубировали 4 ч при температуре 37°C, по окончании времени инкубации, вносили в планшет 150 мкл ДМСО. Дозозависимый эффект был обнаружен в диапазоне концентраций цетуксимаба от 31.25 мкг/мл до 30.50 нг/мл (рис. 3).

Далее был проведен аналогичный анализ с концентрациями клеток 5 и 10 тысяч на лунку и концентрациями препарата от 31.25 мкг/мл до 30.50 нг/мл (рис. 4).

На основании полученных результатов оптимальной концентрацией клеток является 10000 кл/лунку. Именно эта концентрация была выбрана для проведения дальнейших испытаний.

Анализ используемых красителей

Для проведения испытаний по определению ингибирования пролиферации могут использо-

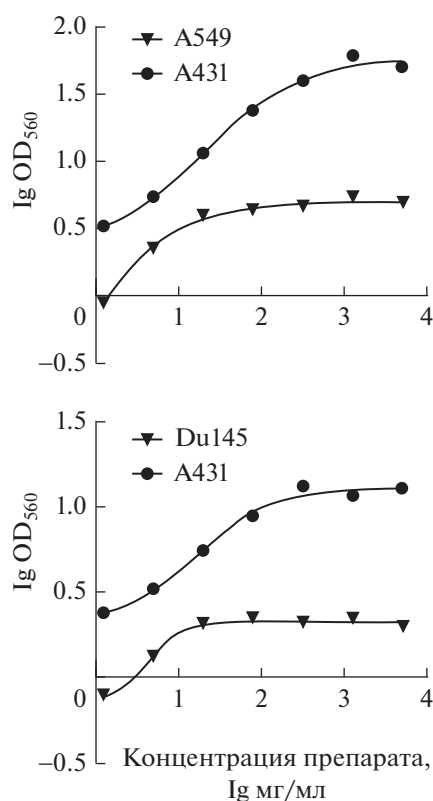


Рис. 2. Определение связывания препарата цетуксимаб с ERGF на поверхности клеток методом иммуноферментного анализа.

Fig. 2. Determination of cetuximab binding to ERGF on the cell surface by enzyme immunoassay.

ваться различные красители, определяющие число жизнеспособных клеток в лунке планшета В рамках данного эксперимента был проведен анализ жизнеспособных клеток в МТТ – тесте с применением красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, в резазурин –те-

сте и определение количества живых клеток по активности их внутриклеточных протеаз с использованием люминесцентного красителя CellTiterGlo (Promega, США).

Поскольку резазурин восстанавливается широким спектром ферментов, содержащихся в клетке, при его использовании степень флуоресценции не увеличивалась при превышении их концентрации 20 тысяч клеток/лунка. Таким образом для определения концентрации жизнеспособных клеток А431 этот краситель не пригоден.

Производитель реактива CellTiterGlo не рекомендует использовать этот краситель при превышении концентрации 50 тысяч клеток/лунка.

Учитывая все вышесказанное для определения был выбран краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, применяемый в МТТ-тесте. При использовании МТТ красителя основная задача заключалась в подборе растворителя для эффективного растворения кристаллов формазана. В качестве растворителя были использованы ДМСО и лизирующий буфер. При образовании большого количества кристаллов формазана требуется объем ДМСО больший, чем объем лизирующего буфера. При использовании последнего появляется возможность не удалять из

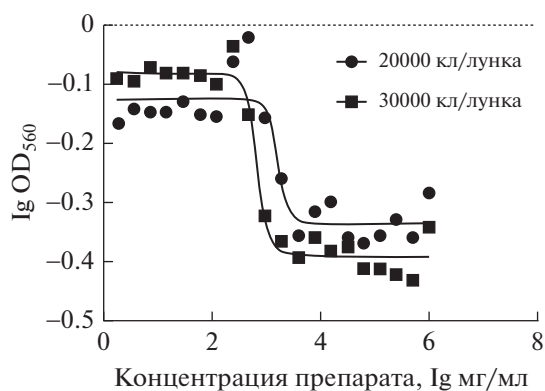


Рис. 3. Результат МТТ-теста. Концентрация препарата 1000000–1.9 нг/мл, концентрация клеток 20000 и 30000 кл/лунка.

Fig. 3. MTT test result. Drug concentration 1000000–1.9 ng/mL, cell concentrations 20000 and 30000 cells/well.

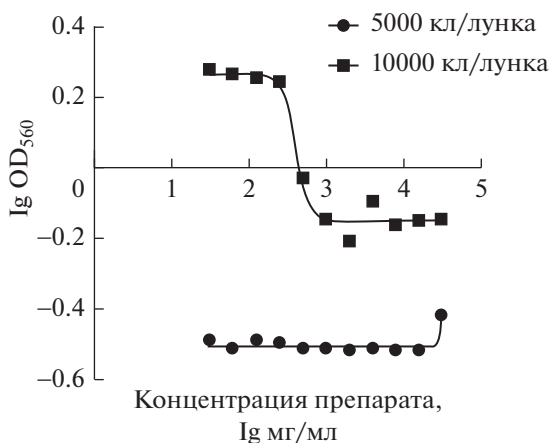


Рис. 4. МТТ-тест (концентрация препарата 31250–30.50 нг/мл, концентрация клеток 5000 и 10000 кл/лунка).

Fig. 4. MTT test (drug concentration 31250–30.50 ng/mL, cell concentration 5000 and 10000 cells/well).

планшета органический растворитель, это исключает потери кристаллов формазана, что, в свою очередь, влияет на точность анализа и коэффициент вариации.

Валидация методики

В рамках валидации данного метода были оценены следующие валидационные характеристики: специфичность, правильность, линейность, прецизионность, аналитическая область, устойчивость.

Специфичность и правильность методики подтверждены идентичностью результатов анализа опытного и стандартного образца, в качестве которого использовался внутренний стандартный образец предприятия цетуксимаб, полученный путем рекомбинантных технологий. Аминокислотная последовательность стандартного образца идентична препарату Эрбитукс® (цетуксимаб) и взята из открытого источника (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00002>).

Для определения аналитической области исследовали диапазон концентраций цитуксимаба 31.25 мкг/мл до 30.50 нг/мл, в котором был обнаружен дозозависимый эффект. Оптическая плотность при анализе образцов прямо пропорциональна концентрации препарата в интервале 7812.5–30.5 нг/мл.

На рис. 5 представлены результаты, подтверждающие прецизионность разработанной методики.

Оценка устойчивости методики проводилась путем постановки анализа на двух разных питательных средах:

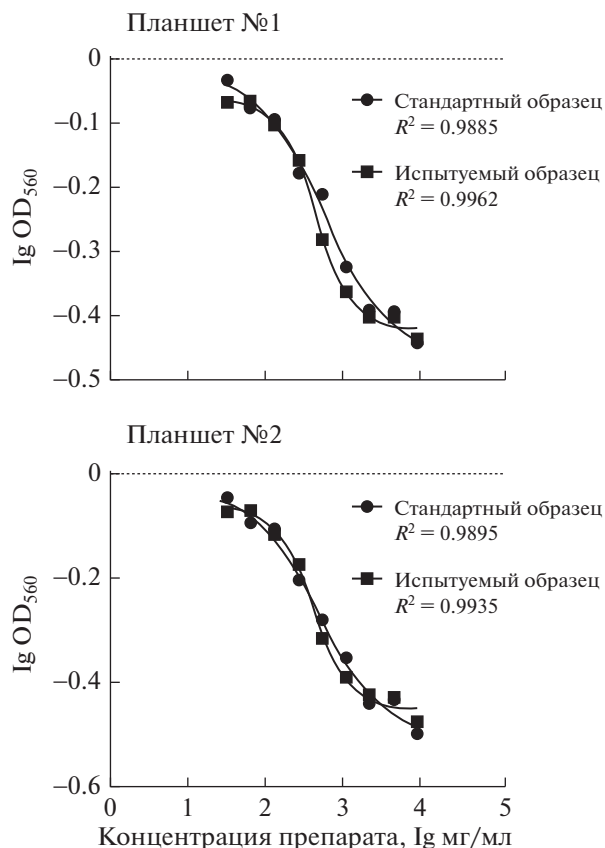


Рис. 5. Валидация финальной методики. МТТ-тест (инкубирование клеток А431 с образцом 96 ч, концентрация препарата 7812.5–30.5 нг/мл, концентрация клеток 10000 кл/лунка).

Fig. 5. Validation of the final technique. MTT assay (incubation of A431 cells with the sample for 96 h, drug concentration 7812.5–30.5 ng/mL, cell concentration 10000 cells/well).

- DMEM без фенолового красного (Gibco);
- DMEM без фенолового красного и L-глутамина (R&D systems, США).

Полученные результаты приведены в табл. 3.

Максимальное относительное стандартное отклонение между результатами, полученными на разных питательных средах составило 18.1%, что соответствует критерию приемлемости метода.

Таким образом результаты валидационных испытаний подтверждают соответствие разработанной методики критерию приемлемости метода в аналитической области концентрации препарата 7812.5–30.5 нг/мл.

В результате проведенных исследований разработана методика определения специфической активности препарата цетуксимаб биологическим методом. Подобрана клеточная линия эпидермоидной карциномы человека А431, обладающая наибольшей степенью связывания с препаратом и оптимальная концентрация ее клеток для

Таблица 2. Процент образования монослоя в зависимости от посевной концентрации клеток и времени инкубирования с препаратом**Table 2.** Percentage of monolayer formation as a function of seed cell concentration and incubation time with the preparation

Образование монослоя, %				
посевная концентрация клеток А431, тыс/мл	время инкубирования, ч			
	24	48	72	96
2000	10	30	45	50
5000	20	60	100	100
10000	80	100	100	100
15000	90	100	100	100
20000	100	100	100	100
30000	100	100	100	100

Таблица 3. Результаты, полученные при проверке устойчивости методики**Table 3.** The results obtained in the stability test

Концентрация Цетуксимаба в планшете для испытания, нг/мл	Оптическая плотность, ОЕ		RSD, %
	питательная среда DMEM без фенолового красного и L-глутамина	питательная среда DMEM без фенолового красного	
3906.2	0.859	0.872	1.6
1953.1	0.890	0.811	6.3
976.6	1.024	0.964	4.0
488.3	1.501	1.159	18.1
244.1	1.546	1.353	8.8
122.1	1.516	1.320	9.4
61.0	1.541	1.290	12.5
30.5	1.456	1.227	12.6
15.25	1.505	1.322	9.0

проведения анализа с использованием МТТ-теста. Проведены валидационные испытания и установлено, что в аналитической области концентрации препарата 7812.5–30.5 нг/мл методика соответствует критерию приемлемости метода.

Преимуществом разработанного метода является точность и надежность, по сравнению с другими методами определения специфической активности препарата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем особую благодарность коллегам: Голоте Ольге Викторовне и Светлаковой Анне Владимировне за оказанную помощь в проведении исследований, а

также за важные рекомендации при оформлении научной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krupp M.N., Connolly D.T., Lane M.D.* Synthesis, turnover, and down-regulation of epidermal growth factor receptors in human A431 epidermoid carcinoma cells and skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 11489–11496. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33787-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33787-6)
2. *Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A.* The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 1986, 319, 226–230. <https://doi.org/10.1038/319226a0>

3. *de Boer W.I., Hau C.M., van Schadewijk A., Stolk J., van Krieken J.H.M., Hiemstra P.S.* Expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin Pathol.*, 2006, 125, 184–192. <https://doi.org/10.1309/W1AX-KGT7-UA37-X257>
4. *Alroy I., Yarden Y.* The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.*, 1997, 410, 83–86. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00412-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00412-2)
5. *Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., Haber D.A.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, 2129–2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>
6. *Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F.J., Lindeman N., Boggon T.J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M.J., Sellers W.R., Johnson B.E., Meyerson M.* EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004, 304, 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>
7. *Yarden Y.* The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer*, 2001, 37, S3–S8. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00230-1)
8. *Nygren P., Sørbye H., Osterlund P., Pfeiffer P.* Targeted drugs in metastatic colorectal cancer with special emphasis on guidelines for the use of bevacizumab and cetuximab: an Acta Oncologica expert report. *Acta Oncol.*, 2005, 44, 203–217. <https://doi.org/10.1080/02841860510029798>
9. *Shelton J.G., Steelman L.S., Abrams S.L., Bertrand F.E., Franklin R.A., McMahon M., McCubrey J.A.* The epidermal growth factor receptor gene family as a target for therapeutic intervention in numerous cancers: what's genetics got to do with it? *Expert Opin. Ther. Targets*, 2005, 9, 1009–1030. <https://doi.org/10.1517/14728222.9.5.1009>
10. *Nava M., Dutta P., Zemke N.R., Farias-Eisner R., Vadgama J.V., Wu Y.* Transcriptomic and ChIP-sequence interrogation of EGFR signaling in HER2 and breast cancer cells reveals a dynamic chromatin landscape and S100 genes as targets. *BMC Med. Genom.*, 2019, 12, 32. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0477-8>
11. *Ciardello F., Tortora G.* EGFR antagonist in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358, 1160–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707704>
12. *Normanno N., Bianco C., De Luca A., Maiello M.R., Salomon D.S.* Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer*, 2003, 10, 1–21. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100001>
13. *Bianco R., Damiano V., Gelardi T., Daniele G., Ciardello F., Tortora G.* Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr. Pharm. Des.*, 2007, 13, 3358–67. <https://doi.org/10.2174/138161207782360564>
14. *Neuzillet C., Tijeras-Raballand A., de Mestier L., Cros J., Faivre S., Raymond E.* MEK in Cancer and Cancer Therapy. *Pharmacol. Ther.*, 2014, 141(2), 160–71. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.001>
15. *Chia P.L., Scott A.M., John T.* Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in mesothelioma. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2019, 16(4), 441–451. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019>
16. *Showket H., Sonam T., Sajad A.D., Sandeep S.* Role of epigenetics in carcinogenesis: Recent advancements in anti-cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.*, 2021, 83, 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.023>
17. *Tanaka T., Matsuoka M., Sutani A., Gemma A., Maemondo M., Akira Inoue, Okinaga S., Nagashima M., Oizumi S., Uematsu K., Nagai Y., Moriyama G., Miyazawa H., Ikebuchi K., Morita S., Kobayashi K., Hagiwara K.* Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int. J. Cancer*, 2010, 126(3), 651–655. <https://doi.org/10.1002/ijc.24746>
18. *Wang D., Wang B., Wang R., Zhang Z., Lin Y., Huang G., Lin S., Jiang Y., Wang W., Wang L., Huang O.* High expression of EGFR predicts poor survival in patients with resected T3 stage gastric adenocarcinoma and promotes cancer cell survival. *Oncol. Lett.*, 2017, 13, 3003–3013. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5827>
19. *Zhuang X., Wang Z., Fan J., Bai X., Xu Y., Chou J.J., Hou T., Chen S., Pan L.* Structure-guided and phage-assisted evolution of a therapeutic anti-EGFR antibody to reverse acquired resistance. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1), 4431. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32159-6>
20. *Sinclair J.K.L., Robertson W.E., Mozumdar D., Quach K., Schepartz A.* Allosteric Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Biochemistry*, 2021(60), 500–512. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00978>
21. *Veloso E.S., Gonçalves I.N.N., Silveira T.L., Oliveira F.S., Vieira D.S., Cassali G.D., Del Puerto H.L., Ferreira E.* Diverse roles of epidermal growth factors receptors in oral and cutaneous canine melanomas. *BMC Vet. Res.*, 2020, 16(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2249-2>

Development and Optimization of a Biological Method for the Cetuximab Drug Specific Activity Analysis Using Cell Culture

A. A. Khoromskaya^b, A. S. Sergeeva^b, A. G. Rodionova^b, D. S. Saakyan^{b, #},
E. A. Guzov^b, A. V. Iserkapov^a, V. M. Kolyshkin^a, and V. G. Ignatiev^a

^aR-Pharm JSC, Moscow, 119421 Russia

^bPlant of Finished Dosage Forms and Biotechnological Substances,
Branch of R-Pharm, Yaroslavl, 150061 Russia

[#]e-mail: ds.novoselova@rpharm.ru

Abstract—In order to develop a method for determining the specific activity of cetuximab, the ability to express epidermal growth factor receptor (EGFR) of human epidermoid carcinoma A431 (ATCC CRL-1555), human prostate adenocarcinoma DU 145 (ATCC HBT-81) and PC-3 (ATCC CRL-1435), human colorectal adenocarcinoma Caco-2 (ATCC HTB-37), and lung carcinoma A549 (ATCC CCL-185) cell lines was analyzed by flow cytometry. It was established that the A431 line is characterized by overexpression of EGFR on the cell surface. ELISA showed that this cell line has the highest degree of binding to the cetuximab drug; therefore, it was chosen for the development and optimization of the methodology. Cell viability was determined by MTT-test using a lysis buffer to dissolve the resulting formazan crystals. According to the results of validation tests, the compliance of the developed method with the acceptance criterion in the analytical range of drug concentrations 7812.5–30.5 ng/mL was confirmed.

Keywords: EGFR, cancer, monoclonal antibody therapy, cetuximab

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 15.09.2023 г. Дата выхода в свет 20.09.2023 г. Формат 60 × 88¹/₈ Усл. печ. л. 14.76 Уч.-изд. л. 15.0
Тираж 117 экз. Зак. 6498 Цена договорная

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1
Исполнитель по контракту № 35-3-23-44-139 от 03.08.2023 г. ООО "СИС",
129164, г. Москва, Ракетный б-р, д. 16, пом. XXXI, пом. 23
Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+