

Received: 2014.12.14  
Accepted: 2015.07.30  
Published: 2015.12.03

## Przeciwciało monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi

### Trastuzumab – a monoclonal antibody – and dendrimers in a targeted therapy for breast cancer

Monika Marcinkowska<sup>1</sup>, Maciej Stańczyk<sup>2</sup>, Barbara Klajnert-Maculewicz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

<sup>2</sup> Oddział Chirurgii Onkologicznej, Regionalny Ośrodek Onkologiczny, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Kopernika w Łodzi

<sup>3</sup> Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Niemcy

#### Streszczenie

Rak piersi to najczęściej występujący nowotwór u kobiet. Dane literaturowe potwierdzają, iż u około 30% pacjentek występuje nadekspresja receptora nabłonkowego czynnika wzrostu HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2) na powierzchni komórek nowotworowych. Przeciwciało białku HER2 skierowane jest trastuzumab - rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne. Wzbogacenie nim tradycyjnej chemioterapii, z zastosowaniem antracyklin czy taksonów, zwiększa skuteczność leczenia. Jednak ogólnoustrojowa toksyczność samych leków nadal stanowi poważny problem. Z tego powodu poszukuje się nowych rozwiązań, zwłaszcza na poziomie selektywnego transportu leku do komórki nowotworowej.

Dendrymery, zbudowane z rdzenia oraz promieniście odchodzących od niego gałęzi, są jedną z najlepiej poznanych grup nanocząsteczek. Liczne publikacje wskazały, iż mogą być wykorzystane jako nośniki różnego typu cząsteczek, m.in. leków przeciwnowotworowych. Ich rozgałęziona struktura zapewnia skuteczną ochronę przed przedwczesnym uwalnianiem leku w układzie krążenia, dzięki czemu istnieje szansa na zmniejszenie dawki przy zachowaniu zbliżonego działania terapeutycznego i jednoczesnym obniżeniu toksyczności leku względem komórek prawidłowych. Ponadto modyfikacja powierzchni dendrymeru przeciwciałem monoklonalnym zapewnia skutek terapii celowanej. Dlatego tak ważną jest synteza koniugatów trastuzumabu, dendrymerów oraz leków przeciwnowotworowych. W pracy przedstawiono przegląd publikacji dotyczący zastosowania trastuzumabu *in vitro*, *in vivo* oraz wykorzystania go w badaniach klinicznych, a także najnowsze osiągnięcia z pogranicza biologii i chemii, których celem jest stworzenie idealnego przenośnika, mogącego znaleźć zastosowanie w terapii celowanej.

**Słowa kluczowe:** dendrymery PAMAM • trastuzumab • rak piersi • przeciwciało

#### Summary

Breast cancer is the most frequently occurring cancer in women. It has been confirmed that approximately 30% of patients have overexpression of human epidermal growth factor 2 (HER2) on the surface of tumor cells. Trastuzumab – a recombinant, humanized monoclonal antibody – is directed against this receptor. Its use in traditional chemotherapy (with anthracyclines or taxanes) causes an increase of therapy efficiency. However, the systemic toxicity of the anticancer drugs is still a serious problem. Therefore, new solutions are sought, especially in the field of selective drug transport to tumor cells. Dendrimers are composed of a core and branches. They are the best-

	-known group of nanoparticles. A lot of publications have shown that they can be used as carriers of various types of molecules, including anticancer drugs. The branched structure provides effective protection against premature release of the drug into the circulatory system. It gives a chance to reduce the dose while maintaining a therapeutic effect, and to reduce the toxicity of the drug for normal cells. Furthermore, the surface of dendrimers can be modified by a monoclonal antibody to achieve a targeted therapy. For that reason synthesis of conjugates of trastuzumab, dendrimers, and anticancer drugs is so crucial. This paper presents an overview of publications about the use of trastuzumab in <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> and clinical studies, as well as the latest developments of biology and chemistry, whose goal is to create the perfect, targeted carrier.
<b>Key words:</b>	<b>PAMAM dendrimers • trastuzumab • breast cancer • antibody</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1184555">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1184555</a>
<b>Word count:</b>	4503
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	3
<b>References:</b>	83

**Adres autorki:** mgr dr Monika Marcinkowska, Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: m\_monika123@interia.eu

## WSTĘP

Procesy, takie jak różnicowanie, proliferacja czy apoptoza są ściśle regulowane w każdej żywej komórce i zależą w znacznym stopniu od czynników zewnętrznych aktywujących wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnałów. Akumulacja mutacji w komórkach nowotworowych jest bezpośrednią przyczyną zaburzeń w przekazywaniu, czego konsekwencją jest niekontrolowany podział komórek nowotworowych oraz brak reakcji na sygnały, które w warunkach prawidłowych aktywują szlaki apoptotyczne. Poznając etiologię chorób nowotworowych stwierdza się, że jednym z najczęściej występujących zaburzeń w przekazywaniu sygnałów jest szlak związany z rodziną receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [23].

U około 30% pacjentek, u których potwierdzono raka piersi zaobserwowano również nadekspresję receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) na powierzchni komórek nowotworowych [8]. Receptor ten, w literaturze opisywany za pomocą skrótów: NEU; CD340; ERBB2; MLN 19; HER-2/neu pełni bardzo ważną funkcję w kontroli prawidłowego podziału komórki czy regulacji procesu apoptozy.

Gen *ERBB2* kodujący białko HER2 jest protoonkogenem i leży na długim ramieniu siedemnastego chromosomu (17q12). Jego zwielokrotnienie (amplifikacja) jest przyczyną nadmiernej ekspresji białka HER2 w komórce nowotworowej. Uważa się, że jedna trzecia z rozpoznanych przypadków raka piersi ma zbyt wiele kopii tego genu, czego naturalną konsekwencją jest nadekspresja recep-

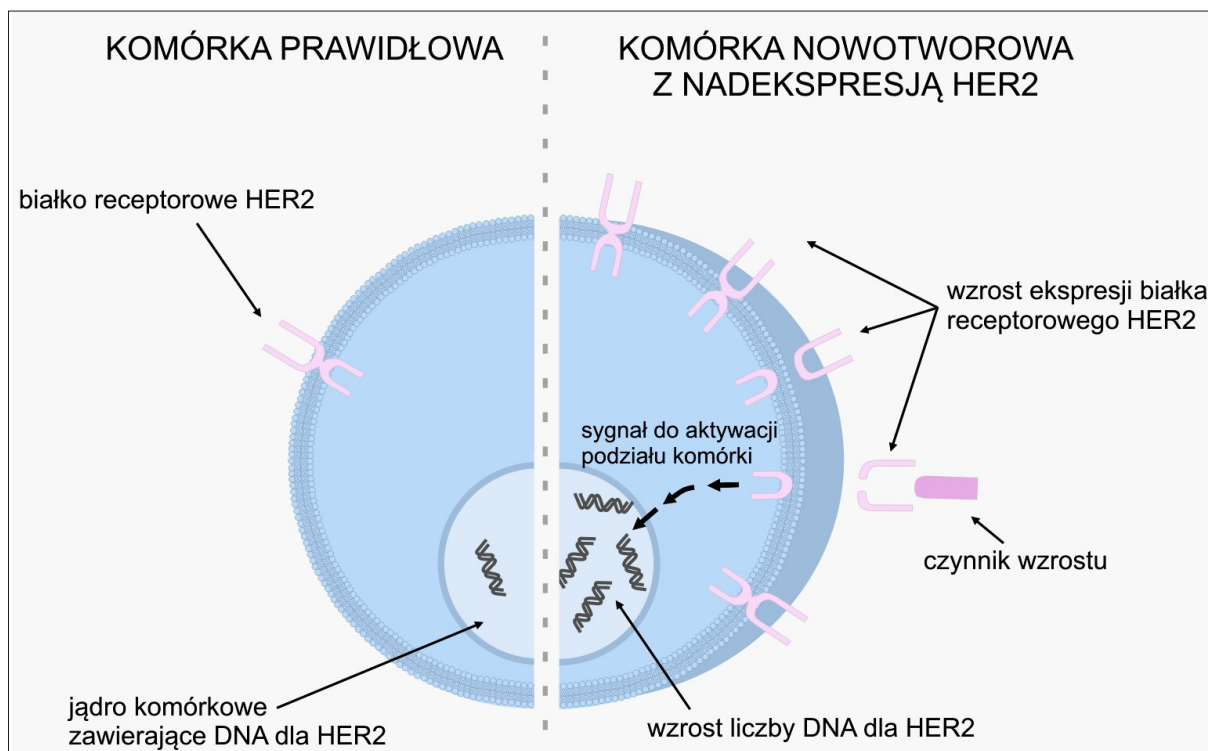
tora HER2 [11,68]. Anomalia ta niesie za sobą poważne konsekwencje, ponieważ prowadzi do szybszego wzrostu raka oraz agresywniejszego przebiegu choroby. Udowodnione, iż nowotwory z nadekspresją receptora HER2 wykazują także większą lekooporność [74], dlatego decydując o sposobie leczenia raka piersi tak ważne jest aby zbadać liczbę kopii genu *ERBB2*, a co się z tym wiąże ocenić „złośliwość” nowotworu oraz szanse pacjentki na wyleczenie. Jeśli liczba kopii genu *ERBB2* przekroczy 4 zakłada się, że nastąpiła amplifikacja. Jako kryteria oceny kopii genu, przyjmuje się następującą klasyfikację:

- poniżej 4 kopii genu/komórkę – brak amplifikacji,
- 5-10 kopii genu/komórkę – niska amplifikacja,
- powyżej 10 kopii genu/komórkę – wysoka amplifikacja [51].

Powstające w wyniku ekspresji genu *ERBB2* białko należy do rodziny czterech, transbłonowych, silnie ze sobą związanych oraz wchodzących w interakcje receptorów, tj.:

- ERBB1 (HER2, EGFR)
- ERBB2 (HER2)
- ERBB3 (HER3)
- ERBB4 (HER4)

Wszystkie cztery receptory należą do transbłonowych białek i zawierają wiążącą ligand domenę zewnątrzkomórkową, domenę transbłonową oraz domenę wewnątrzkomórkową wykazującą aktywność kinazową [12]. Po związaniu HER2 z ligandem receptor ulega homo- lub heterodimeryzacji będącej skutkiem autofosforylacji reszt tyrozyny w domenie cytoplazmatycznej. Reakcja uruchamia wiele szlaków sygnałowych, tj.: kinaz białkowych aktywowanych mitogenem



Ryc. 1. Mechanizm działania nadekspresji HER2

(MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases) [44], fosfolipaz C<sub>g</sub>, kinaz białkowych C (PKC, Protein Kinase C) oraz aktywatora transkrypcji (STAT, Signal Transducers and Activators of Transcription). Konsekwencją zwiększenia gęstości występowania receptora HER2 na powierzchni komórki jest ekspresja białek biorących udział w proliferacji, przeżyciu i migracji komórek, a także zapoczątkowanie procesu angiogenezy, będącego pierwszym etapem prowadzącym do przerzutowania [45]. Rycina 1 przedstawia mechanizm działania i nadekspresji receptora HER2 w komórce.

Trastuzumab to rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne (mAb, Monoclonal Antibody) klasy IgG1 wybiórczo łączące się z EGFR2. Wiążąc się z IV domeną zewnątrzkomórkowej części białka HER2 trastuzumab blokuje receptor hamując nadmierną proliferację komórek guza. Wyniki badań sugerują, że zahamowanie proliferacji jest rezultatem zatrzymania cyklu komórki w fazie G1 [35,37].

Zaobserwowano również, iż trastuzumab jest silnym mediatorem cytotoxyczności zależnej od przeciwciał (ADCC, Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) [1,34].

#### **BADANIA *IN VITRO***

Potrzeba obniżenia toksyczności stosowanych leków przeciwnowotworowych, przy jednoczesnym zwiększeniu ich skuteczności, zaowocowała wzrostem zainteresowania badaniami nad terapią celowaną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych [24].

Dotychczas zbadano wpływ trastuzumabu m.in. na żywotność komórek (test tetrazoliowy), cykl komórkowy (barwienie jodkiem propidyny), apoptozę (kaspazy egzekutorowe i aneksyna V), ekspresję receptora HER2 na powierzchni komórek SK-BR3 oraz receptora estrogenowego na powierzchni komórek gruczołowego raka sutka (MCF-7), przy jednoczesnej kontroli wpływu dwóch endogennych ligandów: czynnika wzrostu naskórka (EGF) i hereguliny- $\beta$ 1 (HRG- $\beta$ 1). Zaobserwowano, że przeżywalność komórek SK-BR3 zmniejsza się po ekspozycji na trastuzumab. Jest to związane ze spadkiem względnej gęstości receptora HER2 oraz zatrzymaniem cyklu w fazie G1, wspieranych przez cytotatyczne działanie trastuzumabu. Ilość aktywnego receptora HER2 jest znacznie redukowana przez trastuzumab, EGF i heregulinę- $\beta$ 1 [35].

Liu i wsp. zbadali wpływ kombinacji przeciwciała MM-121/SAR256212 oraz trastuzumabu [33]. MM-121/SAR256212 to ludzkie przeciwciało skierowane przeciwko nadekspresji receptora HER3. Do badania przeżywalności wykorzystano metodę MTS (z użyciem 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-5-(karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazolu). Za pomocą cytometrii przepływowej dokonano oceny cyklu komórkowego, a metodą Western blot zastosowano do wykrycia ekspresji białek na powierzchni komórek nowotworowych. Okazało się, że przeciwciało MM-121/SAR256212 w znacznym stopniu wzmacnia hamujący wpływ trastuzumabu na dwie badane linie komórkowe raka piersi (SK-BR3 i BT474). Przeciwciało MM-121 podane w połączeniu z trastuzumabem powodowało znaczący spadek ekspresji ufosforylowanych

białek ERBB3 (P-ERBB3) i AKT (P-AKT). Stosowane jednocześnie przeciwciała nie indukowały jednak apoptozy w liniach komórkowych opornych na działanie trastuzumabu, a jedynie prowadziły do zatrzymania cyklu w fazie G1. Natomiast obserwowano zwiększenie ekspresji białka p27<sup>kip1</sup> [33].

Interesujące okazały się wyniki barwienia immunohistochemicznego (IHC, Immunohistochemistry), cytometrii przepływowej, PCR w czasie rzeczywistym oraz ocena amplifikacji genu za pomocą fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH, Fluorescent *in situ* Hybridization), które wykazały znaczący wpływ trastuzumabu podawanego z innym przeciwciałem monoklonalnym - pertuzumabem, którego działanie jest skierowane również przeciwko receptorowi HER2, na liniach komórkowych raka piersi USPC ARK-1, USPC ARK-2, USPC ARK-3, USPC ARK-4, USPC ARK-5 i USPC ARK-6. Trzy z badanych linii komórkowych wykazały amplifikację genu *C-ERBB2* oraz wysoką ekspresję receptora HER2 [26]. Obserwowana cytotoksyczność trastuzumabu i pertuzumabu oceniona na podstawie wyników proliferacji była na podobnym poziomie, choć przeciwciała podane jednocześnie hamowały w znacznym stopniu proliferację badanych komórek oraz indukowały cytotoksyczność zależną od ich stężenia [7].

Obecnie prowadzi się badania nad pochodną trastuzumabu, trastuzumab-DM1 (T-DM1), stosowaną w przypadku nabycia przez komórki nowotworowe oporności na leczenie tradycyjnym przeciwciałem. W eksperymentach *in vitro* wykorzystano linie komórkowe: UACC-893, MDA-453 i JIMT-1. Do badania przeżywalności komórek zastosowano test AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Zaobserwowano, że pochodna w znaczący sposób hamuje przeżywalność HER2-dodatnich komórek nowotworowych opornych na trastuzumab. Ponadto T-DM1, podobnie jak trastuzumab, wywołuje selektywną cytotoksyczność [4].

W raku piersi trastuzumab podawany jest z taksanami [28], dlatego też prowadzone są badania mające na celu ocenę synergistycznego działania przeciwciała podawanego z paklitaksem lub docetaksem. Niestety otrzymane wyniki IC<sub>50</sub> oraz wartości IC<sub>30</sub>-IC<sub>70</sub> nie potwierdziły synergistycznego działania leków i przeciwciała, a załdwie ich addytywny wpływ na badane linie komórkowe MCF-7, MDA-MB453 i SK-BR3 [47].

Natomiast synergiczną cytotoksyczność trastuzumabu względem linii komórkowej SK-BR3 obserwowano po podaniu przeciwciała w połączeniu z lekami, takimi jak: tiotepa, cisplatyna, etopozyd. Addytywne interakcje były obserwowane również dla doksorubicyny i metotraksatu. Podczas gdy interakcje fluorouracylu z trastuzumabem wykazywały charakter antagonistyczny [56].

Badania innego zespołu wykazały, iż trastuzumab hamuje klonalny wzrost komórek BT-474 już w dawce 0,5-2,5 nM oraz SK-BR3 w dawce 0,5-10 nM i w mniejszym stopniu komórek raka jajnika (w dawce 10-100 nM). W terapii

skojarzonej trastuzumabu i paklitakselu obserwowano wzmocnienie przeciwnowotworowego efektu odpowiednio o 67% w przypadku komórek BT-474, 50% dla linii SK-BR3 i o 32% dla linii raka jajnika SK-OV3 [6].

Terapia skojarzona trastuzumabu i leków antyestrogenowych może nasilać hamowanie wzrostu niektórych rodzajów guzów [59]. Trastuzumab w dawce 0,05-0,2 mg/l podany w połączeniu z tamoksyfenem (w stężeniu 0,5-5 μM) będącym selektywnym modulatorem receptora estrogenowego (SERM, Selective Estrogen Receptor Modulators), znacząco wzmacniał przeciwnowotworowe działanie leku wobec HER2-opornej linii komórkowej BT-474 [80]. Trastuzumab podawany z fulystrantem - innym antyestrogenowym lekiem - hamował wzrost komórek raka piersi linii ML-20. Natomiast nie obserwowano efektu terapeutycznego w przypadku linii komórkowych niewykazujących ekspresji receptora estrogenowego, charakteryzujących się niską ekspresją receptora HER2 (KPL-4, MDA-MB-231) [41].

Podobnie podanie CP461 (inhibitora fosfodiesterazy cGTP stosowanego w przypadku raka prostaty) z trastuzumabem spowodowało hamowanie proliferacji oraz generację procesu apoptozy. Komórki linii BT-474 wykazujące nadekspresję HER2 traktowane trastuzumabem i CP461 wykazywały wzrost inhibicji, w przeciwieństwie do komórek linii MDA-MB-435S, wykazujących niską ekspresję receptora EGFR2. Jednoczesne podanie obu aktywnych substancji hamowało wzrost komórek linii SK-BR3 i BT-474 i dodatkowo powodowało fragmentację DNA w komórkach SK-BR3 [78].

## BADANIA *IN VIVO*

Zastosowanie modeli zwierzęcych, bardziej złożonych niż model komórkowy, stanowi kolejny etap badań związków, które wykazują potencjalne działanie przeciwnowotworowe względem linii komórkowych. Możliwość wykonania heterogennych przeszczepów komórek ludzkich nowotworów do organizmów zwierzęcych daje badaczom unikalną możliwość sprawdzenia skuteczności przeciwnowotworowego działania badanych związków *in vivo*.

Baselg i wsp. zaobserwował korelację między podaną *in vivo* dawką trastuzumabu, a efektywnością działania przeciwnowotworowego. Grupie 24 myszy pozbawionym grasicy, z uprzednio wykonanym heteroprzeszczepem ludzkich komórek raka piersi wykazujących nadekspresję receptora HER2 podawano w dawkach: 0,1, 0,3 i 1 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo jeden raz na tydzień przez 5 tygodni przeciwciała, które hamowało wzrost guza wprost proporcjonalnie do podanej dawki w 25, 40 i 80% w porównaniu do myszy, którym podawano przeciwciała kontrolne (1 mg/kg dootrzewnowo) nieswoistej rekombinowanej immunoglobuliny [6].

Myszom z utrwalonymi heteroprzeszczepami nowotworowymi komórek linii BT-474 podawano trastuzumab dootrzewnowo w dawce 0,3 mg/kg masy ciała dwa razy

w tygodniu przez 5 tygodni w monoterapii lub w połączeniu z doksorubicyną lub paklitakselem. Monoterapia trastuzumabem, doksorubicyną oraz paklitakselem spowodowała zmniejszenie objętości guza odpowiednio o 36, 27 i 35%. Dopiero zastosowanie trastuzumabu w połączeniu z paklitakselem, stosowanym w dawce 10 mg/kg i podawanym dożylnie w pierwszym i czwartym dniu leczenia redukowało objętość guza o 93%, w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast trastuzumab w połączeniu z doksorubicyną podawany dożylnie w stężeniu 10 mg/kg zahamował wzrost guza o 70% [56].

Wyniki innych badań wykazały, iż leczenie trastuzumabem wraz z paklitakselem powoduje znaczące zahamowanie wzrostu guza nawet po podaniu niższych dawek paklitakselu (5 lub 10 mg/kg). Trastuzumab w połączeniu z doksorubicyną, cyklofosfamidem, metotreksatem [71], etopozydem lub winblastyną [20] zmniejszał wielkość guza u myszy pozbawionych grasic, z heteroprzeszczepami ludzkich komórek raka piersi wykazującymi nadekspresję receptora HER2. Jednak zaobserwowano, iż nie było to synergistyczne, gdy leki podawano w różnym czasie. Ponadto, gdy doksorubicyna była podawana jako pierwsza to działanie z trastuzumabem było antagonistyczne [80].

Leahy i wsp. wykazali, iż guzy z nadekspresją HER2 wykazują zahamowanie wzrostu ilości zewnątrzkomórkowej domeny (ECD, Extracellular Domain) HER2 jako skutek leczenia trastuzumabem [20]. Związek między masą guza, ekspresją ECD i odpowiedzią na terapię liposomalną doksorubicyną (100 µg jeden raz w tygodniu) oraz trastuzumabem został sprawdzony na grupie 80 myszy z utrwalonym heteroprzeszczepem linii BT-474 i MCF7. Trastuzumab powodował zależny od dawki wzrost w poziomie cyrkulacji HER2 ECD. Tak jak trastuzumab, liposomalna doksorubicyna znacznie hamowała wzrost guza, ale w przeciwieństwie do trastuzumabu nie wykazywała znaczącego wpływu na zależność regresji między ilością ECD HER2 oraz objętością guza w odniesieniu do kontrolnego roztworu soli fizjologicznej [55].

## ZASTOSOWANIA KLINICZNE

Trastuzumab został zarejestrowany w 2001 roku, początkowo w terapii rozlanego raka piersi z nadekspresją HER2. Status rejestracyjny w Polsce w leczeniu uzupełniającym, czyli adiuwantowym, raka piersi uzyskał w 2006 roku [19]. Trastuzumab okazał się skuteczny w licznych badaniach klinicznych dotyczących raka piersi z nadekspresją HER2. Jego działanie polega na inhibicji sygnału do jądra komórkowego, w wyniku czego dochodzi do zahamowania proliferacji komórki. Dodatkowo uaktywnia cytotatyczną funkcję układu dopełniacza oraz przeciwciał w stosunku do komórki HER2(+) [69,70]. Jego działanie może zostać dodatkowo wzmocnione poprzez inne leki cytotatyczne [76]. Obecność receptora HER2 stwierdza się prawie u 20% chorych na raka piersi [15]. Leczenie trastuzumabem może być zastosowane wyłącznie w tej grupie chorych.

Trastuzumab początkowo stosowano u chorych z zaawansowaną, rozlaną chorobą nowotworową po leczeniu pierwszego rzutu i po nawrocie. Liczne badania kliniczne potwierdziły skuteczność trastuzumabu w takich przypadkach terapii raka piersi. Cobleigh i wsp. podając chorym w II rzucie leczenia – czyli po niepowodzeniu leczenia I rzutu – w rozsiewie choroby nowotworowej odnotowali obiektywną odpowiedź u 15% chorych [64]. Następnie w 2001 r. Slamon i wsp. badając skuteczność leczenia paklitakselem lub programem AC (doksorubicyna z cyklofosfamidem) w połączeniu z trastuzumabem lub bez trastuzumabu uzyskali odpowiedź na leczenie odpowiednio u 50% i 32% chorych ( $p < 0,001$ ) oraz wydłużenie czasu do progresji (PFS, Progression Free Survival) o 7,4 miesiąca ( $p < 0,001$ ). To samo badanie wskazało również, że skojarzenie doksorubicyny z trastuzumabem wywołuje dużą kardiotoxycyzość, którą obserwowano u 27% chorych [64].

**Biologia nowotworu z nadekspresją HER2.** Obecnie w celu rozróżnienia rokowniczo-predykcyjnego raka piersi na podstawie fenotypu zobrazowanego w badaniu histopatologicznym i immunohistochemicznym podzielono go na kilka podtypów. Wyróżnione następujące podtypy: luminalny A, luminalny B – HER ujemny, luminalny B HER dodatni, HER dodatni (nieluminalny), trójujemny (bazalny) oraz podtyp zawierający tzw. „specjalne typy histologiczne”. Podtypy wykazujące nadekspresję HER2 są uznawane za podtypy o rokowaniu pośrednim, gdyż mimo potencjalnie większej złośliwości wdrożone leczenie anty HER2 jest bardzo skuteczne [32,36,62,66].

Biologiczny rozwój nowotworów HER2(+) jest szybszy, szybsza jest proliferacja komórek, zwiększona angiogeneza oraz inwazyjność, a zmniejszona apoptoza. Raki HER2(+) są często niewidoczne w badaniu mammograficznym, a zatem trudne do wykrycia we wczesnym stadium rozwoju guza. Fenotyp HER2(+) jest zazwyczaj stwierdzany u młodszych chorych, komórki nowotworu mają zazwyczaj większe jądra komórkowe i liczniej występują figury podziału w polu widzenia mikroskopu. Częściej, w przypadku nadekspresji HER2, dochodzi do przerzutów do węzłów chłonnych i towarzyszy temu ujemny status receptorów estrogenowych i progesteronowych – pośrednio związany z gorszym rokowaniem [75].

**Leczenie raka piersi z nadekspresją HER2.** Analiza 107 prac przeprowadzona przez zespół Ross, zawierająca ponad 40 000 obserwowanych chorych oraz inne prace wskazują, że do czasu wprowadzenia leczenia trastuzumabem obecność nadekspresji HER2 wiązała się ze zdecydowanie większą śmiertelnością w porównaniu z innymi podtypami raka piersi uwzględniając wiek, status społeczny, wielkość guza, stan węzłów chłonnych, stopień złośliwości oraz status receptorowy [60,67].

W przypadkach HER2(+) raka piersi częściej dochodzi do wznów w miejscu operowanym, zarówno w przypadku chirurgicznego leczenia oszczędzającego jak i amputacji piersi. Częściej również dochodzi do powstawania prze-

rzutów w płucach i w wątrobie, a rzadko guzy HER2(+) przerzutu do mózgu i kości [54]. Wprowadzenie celownego leczenia przeciw receptorowi HER2 zrewolucjonizowało sposób leczenia raka piersi HER2(+) oraz sprawiło, że średnie przeżycie w rozsiałym raku tego podtypu wynosi ponad 24 miesiące.

Obecnie trastuzumab jest stosowany zarówno w monoterapii jak i w połączeniu z innymi preparatami cytostatycznym lub z hormonoterapią. Najczęściej w terapii raka piersi łączy się paklitaksel i docetaksel. Skojarzenie jednoczesowe z antybiotykami antrycylinowymi, takimi jak epirubicyna i doksorubicyna, jest bardzo skuteczne, może jednak potęgować działania niepożądane w postaci wspomnianej dużej kardiotoksyczności.

**Leczenie uzupełniające** to leczenie pooperacyjne, którego zadaniem jest trwałe wyleczenie lub przynajmniej maksymalne wydłużenie czasu do progresji.

Podawanie leków dożylnie, ma za zadanie uzyskanie dawki terapeutycznej we wszystkich tkankach organizmu jednocześnie. Leczenie uzupełniające powinno się rozpocząć 2-4 tygodnie po zabiegu najpóźniej 3 miesiące po operacji. Zalecany czas trwania terapii to 12 miesięcy lub do nawrotu choroby. Z powodu kardiotoksyczności trastuzumabu w połączeniu z antrycylinami zaleca się podawanie 4 cykli AC. Następnie w kolejnych cyklach stosuje się połączenie taksoidów z trastuzumabem (czyli paklitakselu z trastuzumabem lub docetakselu z trastuzumabem); stosowane jest również połączenie docetakselu z karboplatiną i z trastuzumabem [48,54,57,68].

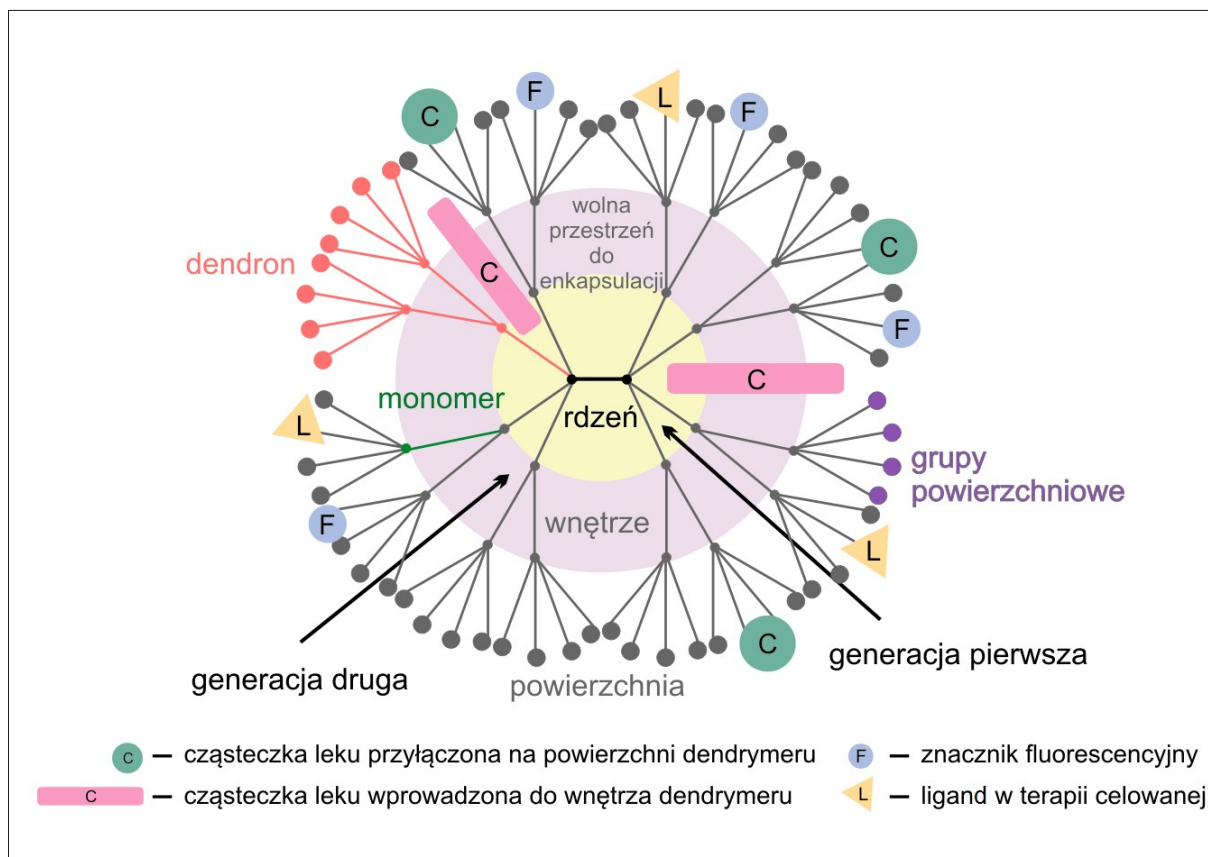
**Leczenie wstępne** czyli neoadiuwantowe prowadzi się w terapii miejscowo lub regionalnie zaawansowanego nieoperacyjnego pierwotnie raka piersi, kiedy wielkość guza przekracza 5 cm lub/i kiedy klinicznie i histopatologicznie stwierdza się przerzuty do węzłów chłonnych łączące się w pakiety. W tych przypadkach celem poprawienia wyniku leczniczego, a niezwykle celem umożliwienia zabiegu operacyjnego stosuje się leczenie wstępne. Według licznych opracowań oraz trzech dużych badań klinicznych: NOAH, German Breast Group i MD. Anderson Cancer Center potwierdzono dużą skuteczność chemioterapii z dodatkiem trastuzumabu prowadzoną przez 6 miesięcy [31]. Uzyskano wyniki 37-65,2% - remisji całkowitych, która oznacza całkowitą patologiczną remisję. W niektórych badaniach dodatek trastuzumabu podwajał odsetek całkowitych remisji, w stosunku do leczenia wyłącznie chemicznego. American Cancer Society zaleca leczenie neoadiuwantowe przy zastosowaniu paklitakselu z trastuzumabem, a w dalszej kolejności 5-fluorouracylu z epirubicyną i następnie cyklofosfamidu z trastuzumabem.

Interesujące wyniki badania opisują Mittendorf i wsp., którzy grupę badaną - 143 chorych poddali leczeniu czterema cyklami paklitakselu, a następnie trzema cyklami opartym na antrycylinach i półrocznemu leczeniu trastuzumabem. 72 chorych czyli 50,3% uzyskało całkowitą remisję, częściową remisję stwierdzono u 61 chorych -

42,7%, a brak remisji u 7 pacjentów, co stanowiło 4,9%. W analizie histopatologicznej chorych z częściową remisją stwierdzono w 33% zmianę fenotypu raka na HER2(-). Badanie to sugeruje konieczność pooperacyjnego powtórzonego badania histopatologicznego również w zakresie statusu receptorowego HER2 [16].

**Leczenie zaawansowanego raka piersi.** W przypadkach miejscowo zaawansowanego lub rozsianego raka piersi HER2(+) zaleca się monoterapię lub leczenie skojarzone. Należy uwzględnić, że na tym etapie terapii częściej dochodzi do niepowodzenia prowadzonego leczenia. Stosowane są zazwyczaj schematy oparte na trastuzumabie w połączeniu z doksorubicyną, epirubicyną i cyklofosfamidem lub paklitakselem [69]. Leczenie to wydłuża czas bez progresji. W rekomendacjach National Comprehensive Cancer Network (NCCN) sugerowane są schematy łączące trastuzumab z paklitakselem, docetakselem, winorelbina, analogami platyny i kapecytabiną [13]. Interesującym problemem jest podnoszona przez niektórych autorów sprawa zaprzestania podawania trastuzumabu w przypadku progresji choroby, która jest uwzględniona we wskazaniach ogólnych. Wielu autorów podkreśla skuteczność stosowania leku po wystąpieniu progresji, sugerując zmianę skojarzonego cytostatyku [16,44,50], obawiając się, że po jego odstawieniu mogłoby dojść do gwałtownego nawrotu choroby. Sugerują wielomechanizmowe działanie leku nie tylko przez jego zwykły szlak metaboliczny, ale również przez synergistyczny wpływ na działanie cytostatyków, chociaż nie ma to potwierdzenia w analizie badań retrospektywnych prowadzonych przez innych autorów [25].

Pojawiająca się oporność na trastuzumab, o jak dotąd niewyjaśnionej etiologii, jest często przyczyną zaprzestania leczenia. Kardiotoksyczność stanowi niejednokrotnie przeciwwskazanie do jego podania lub kontynuacji leczenia. W czasie leczenia trastuzumabem, jak i po jego zakończeniu należy monitorować czynność serca [48,69]. Mechanizm uszkodzenia mięśnia sercowego potęguje dysfunkcję spowodowaną przez antrycyliny, których kardiotoksyczne działanie jest związane z wywołaniem stresu oksydacyjnego [39]. Efektem kardiotoksycznym trastuzumabu jest upośledzenie kurczliwości lewej komory serca obserwowane pod postacią zmniejszenia się frakcji wyrzutowej serca. W przypadku połączenia trastuzumabu z antrycylinami, które dodatkowo zaburzają przewodnictwo pod postacią zmian w elektrokardiogramie, arytmii, pogłębienia zaburzeń kurczliwości lewej komory oraz zapalenie mięśnia sercowego, obserwowany niekorzystny efekt jest synergistyczny. U podstaw zaburzeń leży zakłócenie przez trastuzumab szlaku sygnałowego w mięśniu sercowym, który jest zależny od HER2. Struktura miocytu pozwala utrzymać właściwe przewodnictwo mięśnia sercowego, jego budowę i funkcję polegającą na kurczliwości oraz chroni przed stresem oksydacyjnym. Uszkodzenie zależne od trastuzumabu polega na zmianie geometrii, a przez to funkcji, białek strukturalnych komórki mięśnia sercowego, co upośledza kurczliwość



Ryc. 2. Mechanizmy transportu cząsteczek

mięśnia. Uszkodzenie miocytów trastuzumabem sprawia, że stają się podatne na stres oksydacyjny wywołany przez antracykliny.

W obserwacjach klinicznych Seidman i wsp. stwierdzili objawowe zmniejszenie rzutu serca u 27% chorych, z których u 16% doszło do krytycznego uszkodzenia mięśnia sercowego III-IV w skali NYHA (New York Heart Association) przy jednoczesnym podawaniu doksorubicyny z trastuzumabem [63]. Uszkodzenie mięśnia sercowego objawia się podniesieniem stężenia troponiny w osoczu, co może być stosowane do jego monitorowania [17]. Uszkodzenie mięśnia sercowego przez samo leczenie trastuzumabem jest niezależne od dawki leku i pozostaje bezobjawowe zazwyczaj przez pierwsze 9 tygodni, co było punktem wyjścia do ustalenia harmonogramu badań kontrolnych [72]. Uszkodzenie miocytów spowodowane trastuzumabem jest w większości przypadków odwracalne i ustępuje stopniowo po zaprzestaniu leczenia. W badaniach Pereza i wsp. nad bezpieczeństwem stosowania chemioterapii w połączeniu z trastuzumabem w grupie 2992 chorych udowodniono, że po ustąpieniu objawów klinicznych upośledzenia kurczliwości lewej komory serca można było powrócić do leczenia trastuzumabem u 50% pacjentów [57]. Mimo to ponowne włączenie leku należy dokładnie rozważyć i przeanalizować, czy ryzyko nawrotu choroby przewyższa ryzyko ciężkiego uszkodzenia serca.

Obecnie w terapii anty-HER2 są stosowane inne preparaty pertuzumab i lapatinib; trwają obserwacje i badania nad ich skutecznością oraz niepożądanymi działaniami.

Lapatinib jest inhibitorem kinazy tyrozynowej receptora EGFR i receptora HER2/neu (ERBB-2) komórek nowotworowych. Może być kojarzony z kapecytabiną, letrozolem i trastuzumabem. Spowodowane przez niego powikłania kardiologiczne występują rzadziej niż w przypadku trastuzumabu i wynoszą 0,2-1,6% versus 0,4-3,8%. W przypadku tego chemioterapeutyku ważne są działania niepożądane dotyczące układu pokarmowego oraz zespół dłoniowo-podeszwy [39,57]. Humanizowane przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw receptorowi HER2 - pertuzumab - obecnie nie jest zarejestrowane w Polsce, mimo to może być stosowane z trastuzumabem lub docetakselem. Ciężkie uszkodzenie funkcji lewej komory podczas podawania pertuzumabu stosowanego bez trastuzumabu wynosi 3,2-5%, a zastosowanych łącznie około 16%. Częstość występowania gorączki neutropenicznej wynosi około 16% [42].

Zastosowanie przeciwciała monoklonalnego trastuzumab w terapii HER2(+) raków piersi przyniosło ogromny przełom w leczeniu tego źle rokującego raka. Ze względu na to, że rak dotyka zazwyczaj młodszych kobiet pożądanym efektem jest uzyskanie jak najdłuższego czasu przeżycia całkowitego i czasu do nawrotu choroby. Słabym punk-

tem terapii anti-HER2 z użyciem trastuzumabu są jego działania niepożądane. Uszkodzenie serca występujące wskutek leczenia trastuzumabem oraz jego potęgowanie przy stosowaniu innych preparatów ciągle ograniczają jego stosowanie oraz skłaniają do modyfikowania terapii opartych na trastuzumabie.

## DENDRYMERY JAKO NOŚNIKI TRASTUZUMABU

Poszukiwanie skutecznego, nietoksycznego dla komórek prawidłowych i taniego leku przeciwnowotworowego wyznacza nowe kierunki badań w dziedzinie onkologii. Dobrze udokumentowane wyniki nad zastosowaniem dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych [27] w sposób naturalny kierują uwagę badaczy na zastosowanie dendrymerów jako ogniwa łączącego przeciwciało monoklonalne trastuzumab i leki przeciwnowotworowe. Ponieważ badania te dotyczą kilku ostatnich lat, nie ma wiele publikacji na ten temat.

Dendrymery to organiczne związki chemiczne o bardzo regularnej budowie, składające się z rdzenia oraz promieniście odchodzących gałęzi (dendronów). Ich fenomen polega na tym, że mogą transportować lek w dwojaki sposób: przez kowalencyjne związanie cząsteczek leku z grupami powierzchniowymi nanocząsteczki oraz ich enkapsulację w przestrzeniach między gałęziami polimeru [77]. Oprócz transportu leków przeciwnowotworowych te nanocząsteczki mogą przenosić wiele innych substancji, takich jak: znaczniki fluorescencyjne, fotouczulacze czy przeciwciała monoklonalne (ryc. 2).

Obecność dużej liczby grup funkcyjnych na powierzchni dendrymeru stwarza olbrzymie możliwości syntezy nie tylko koniugatów polimer-lek, ale również wiązania z powierzchnią dendrymeru innych cząsteczek mających bezpośredni wpływ na zwiększenie efektywności terapii i zminimalizowanie jej toksycznych skutków na komórki prawidłowe. Zachęcające są wyniki badań, w których do modyfikowania powierzchni dendrymeru zastosowano kwas foliowy. Modyfikacja ma na celu skuteczniejszy transport leku do komórki nowotworowej, ponieważ niektóre nowotwory, w tym rak jajnika, wykazują nadekspresję receptorów kwasu foliowego (FR, Folate Receptor) [40].

Konsekwencją postrzegania receptorów jako „wrót” prowadzących do wnętrza komórki i stosowania substancji działających na nie jak „klucz” jest zastosowanie przeciwciała. Utworzenie immunokoniugatów trastuzumab-dendrymer-lek ma kilka podstawowych, choć zdecydowanie ważnych zalet. Po pierwsze lek jest chroniony przed wcześniejszym uwalnianiem w układzie krwionośnym oraz zbyt szybką transformacją w wątrobie, w związku z tym istnieje możliwość ograniczenia dawki przy zachowaniu efektu terapeutycznego [5]. Po drugie, bezpośrednie uwalnianie substancji czynnej w środowisku guza pozwala uniknąć jej toksyczności na komórki prawidłowe, zwłaszcza kardiotoksyczności występującej u pacjentów po podaniu antracyklin oraz nefrotoksyczności wywoływanej taksanami stosowanymi w konwencjonalnej terapii no-

wotworów złośliwych. Zastosowanie koniugatu pozwala także uniknąć stosowania toksycznych rozpuszczalników oraz leków antyhistaminowych podawanych w czasie leczenia taksanami [2,14,73].

Obecność dokoniugowanego trastuzumabu do powierzchni dendrymeru (ryc. 3) związanego z lekiem umożliwia skuteczny transport substancji aktywnej do wnętrza komórki, co zostało potwierdzone przez zastosowanie koniugatów zmodyfikowanych powierzchniowo barwnikiem fluorescencyjnym.

Skuteczność przeciwciała monoklonalnego skoniugowanego z dendrymerem potwierdziły badania *in vitro* Miyano i wsp. Wykorzystali dendrymery PAMAM generacji 6 modyfikowane powierzchniowo dwoma aminokwasami - lizyną i kwasem glutaminowym (KG6E). Do tak otrzymanych nanocząsteczek dokoniugowano trastuzumab oraz barwnik fluorescencyjny AlexaFlour 488. Badania z wykorzystaniem tego koniugatu były prowadzone na dwóch liniach komórkowych ludzkiego raka piersi: SK-BR3 (HER2-pozytywna) oraz MCF7 (HER2-negatywna). Wyniki potwierdziły skuteczność selektywnego wnikania koniugatu do komórek wykazujących nadekspresję receptora HER2. Ponadto udowodniono, że koniugat kumulował się w lizosomach, gdzie na skutek działania lizosomalnych enzymów oraz niskiego pH były uwalniane z nanocząsteczek leki przeciwnowotworowe [49].

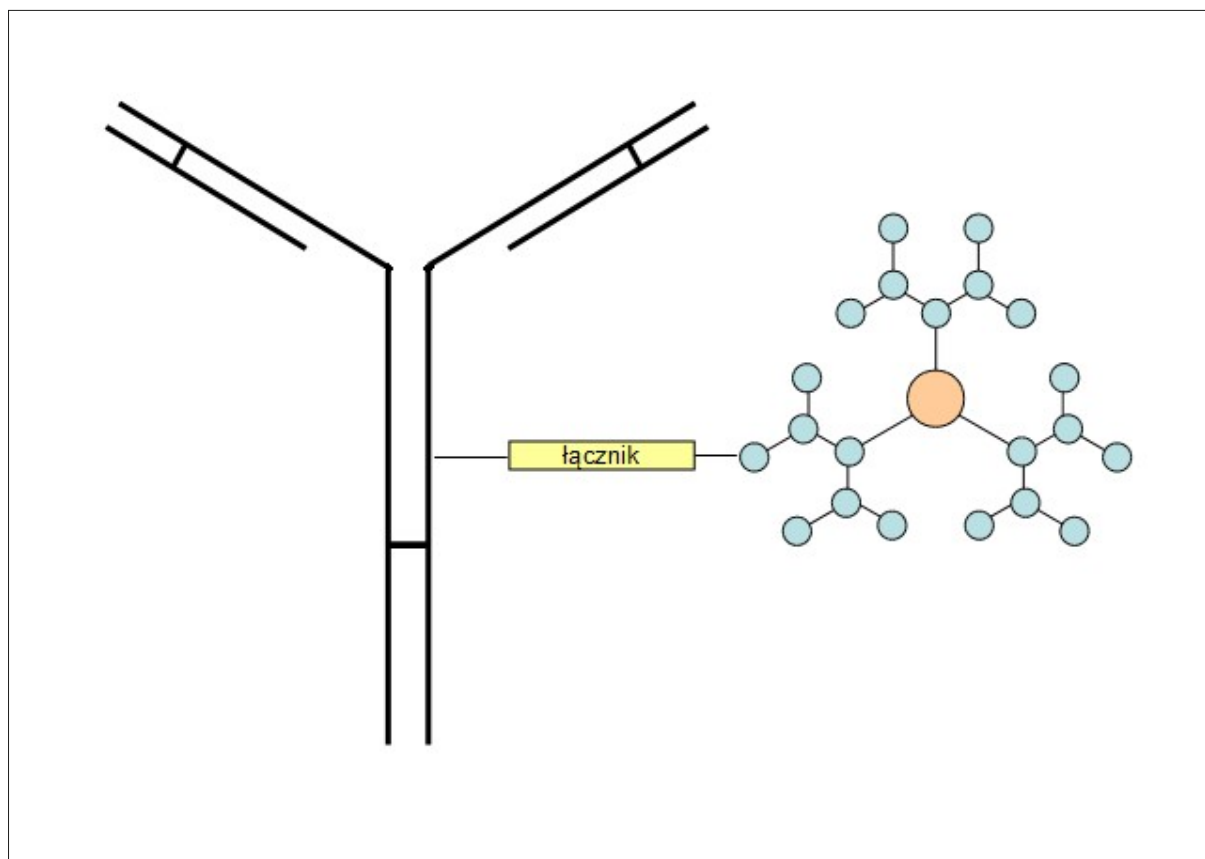
Cline i wsp. przeprowadzili syntezę koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 5 zmodyfikowanego powierzchniowo paklitakselem [22], natomiast Garea i wsp. skoniugowali z tym samym lekiem dendrymery PAMAM generacji 1,4 i 6 [30].

Inna wieloetapowa synteza wykonana przez Majorosa i wsp. doprowadziła do uzyskania koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 5 z paklitakselem. Do cząsteczki dendrymeru została przyłączona fluoresceina (FITC, Fluorescein Isothiocyanate) oraz kwas foliowy pełniący funkcję wektora nakierowującego koniugat do komórek nowotworowych z nadekspresją receptora kwasu foliowego [43].

Równie interesujące okazały się wyniki badań zespołu Jamesa R. Bakera Jr., który zsyntezował koniugat dendrymeru PAMAM generacji 5 z trastuzumabem i metotreksatem - lekiem stosowanym w leczeniu m.in. raka skóry, płuc i piersi. Obserwowano zwiększone wnikania koniugatu do komórki w porównaniu z wolnym lekiem. Toksyczność koniugatu względem komórek raka piersi linii MCA207-HER2 była jednak nieco mniejsza w porównaniu z wolnym metotreksatem. Przypisano to powolnemu uwalnianiu się metotreksatu z koniugatu oraz długiemu okresowi przebywania nanocząsteczki połączonej z lekiem w lizosomie [64].

Istotne jest to, aby lek przyłączony kowalencyjnie do nośnika był szybko i selektywnie dostarczany oraz uwalniany w środowisku guza. Koniugaty dendrymerów PAMAM generacji 4 spełniają swoją funkcję, co wykazano prowa-





Ryc. 3. Schemat budowy koniugatu trastuzumabu

dząc badania z koniugatem tego dendrymeru z dokсорubicyną. Lek z nanocząsteczką był związany za pomocą łącznika *cis*-akonitynowego (CAA, *Cis*-Aconitic Anhydride). Zaobserwowano, że tego typu pH-zależne wiązanie ulega hydrolizie, a lek zostaje uwolniony w otoczeniu guza, co umożliwia kontrolowane podanie określonej ilości substancji aktywnej w wybranym miejscu. Badania Pei i wsp. wykazały, że w zależności od stopnia PEGylacji koniugatu zachodzi w różnym stopniu jego kumulacja w komórkach nowotworowych. Badania były prowadzone na komórkach raka jajników (SKOV-3). Obecność koniugatu była obserwowana w lizosomach i późnych endosomach, a uwalniająca się dokсорubicyna akumulowała się w jądrze komórki nowotworowej [83]. Obserwowano również akumulację koniugatu w guzach w warunkach *in vivo*.

Badania Yabbarova i wsp. potwierdziły zależność uwalnianej dokсорubicyny od zmniejszającego się pH. Zaobserwowano, iż w warunkach fizjologicznych (pH=7,4, t=37°C) po 24 godzinach inkubacji z koniugatem dendrymeru PAMAM generacji 2 i dokсорubicyny uwolniono zaledwie 8% leku. Wraz ze zmniejszającym się odczynem ilość uwalnianej substancji czynnej zwiększała się tak, że dla pH=6,0 wynosiła 50%, dla pH=5,5 - 90%, a dla pH=5,0 - 93% [82].

W ostatnich latach zaobserwowano skuteczność terapii antynowotworowej będącej wynikiem połączenia właściwości przeciwciał monoklonalnych i nuklidów promienio-

twórczych. Mechanizm niszczenia komórek nowotworowych z wykorzystaniem promieniowania jonizującego jest doskonale poznany, a jego zastosowanie leży u podstaw leczenia paliatywnego. Oprócz bezpośrednich skutków działania promieniowania jonizującego, np. pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA można zaobserwować także skutki pośrednie, będące wynikiem radiolizy wody, a co za tym idzie nadprodukcji reaktywnych form tlenu (ROS, Reactive Oxygen Species). Dlatego radioterapia, podobnie jak inne tradycyjne metody walki z rakiem, jest obciążona działaniami niepożądanymi. Zastosowanie odpowiednich nuklidów promieniotwórczych oraz dobór przenośników pozwala uniknąć m.in. choroby popromiennej oraz zwiększa skuteczność samej terapii. Zaobserwowano, że bardzo skuteczne jest połączenie izotopu promieniotwórczego z trastuzumabem. Radioimmunoterapię (RIT, Radioimmunotherapy) można podzielić na tradycyjną (conventional RIT) i tzw. „pretargeted RIT”. Tradycyjna radioimmunoterapia zakłada wprowadzenie do organizmu trastuzumabu związanego kowalencyjnie z izotopem [10]. „Pretargeted RIT” jest związana z dwoma etapami: w pierwszym dożylnie jest podawane zmodyfikowane przeciwciało monoklonalne. Po określonym czasie, gdy nastąpi jego maksymalna akumulacja w okolicy guza wykonuje się dożylny wlew zawierający substancję promieniotwórczą. Udowodniono, że radioaktywny izotop łączy się kowalencyjnie z przeciwciałem po dostaniu się do komórek guza. Taka dwuetapowa metoda pozwala na zwiększenie skuteczności

leczenia, gdyż podawane substancje promieniotwórcze, o małej masie molowej (w porównaniu z przeciwciałem) znacznie szybciej docierają w okolicę guza, niż te kowalencyjnie związane z trastuzumabem [61].

Inną modyfikacją tradycyjnej radioimmunoterapii jest wykorzystanie nanocząsteczek. Zespół naukowców z Uniwersytetu w Toronto przeprowadził badania, których celem było porównanie znakowanego izotopem indu-  $^{111}\text{In}$  koniugatu dendrymeru PAMAM generacji 4 i trastuzumabu połączonego z pierwiastkiem promieniotwórczym. Zarówno koniugat jak i samo przeciwciało zostały uprzednio wzbogacone w sekwencję NLS (Nuclear Translocation Sequence) – peptyd zawierający duży procent aminokwasów kationowych. Niska energia izotopu  $^{111}\text{In}$  (poniżej 25 keV) oraz bardzo wysoki LET (Linear Energy Transfer) pozwala na transfer energii na odległości nano- i mikrometrów. Z tego powodu jest to stosunkowo bezpieczna metoda chroniąca pacjentów przed skutkami napromieniowania zdrowych tkanek. Ponadto rozpad indu w okolicy guza jest związany z emisją promieniowania  $\beta^-$ , co wpływa negatywnie na komórki nowotworowe, powodując pęknięcia dwuniciowe (DSBs, Double-Strand Breaks) prowadzące do śmierci komórki w wyniku apoptozy. Wpływ promieniotwórczego koniugatu trastuzumabu z dendrymerem oraz radioaktywnego przeciwciała badano na dwóch liniach

komórkowych raka piersi. Zaobserwowano, że koniugat dendrymeru i przeciwciała wykazywał 2-4 razy większą aktywność wobec komórek SK-BR3 oraz 9 razy wobec komórek MDA-MB-231 niż samo przeciwciało połączone z pierwiastkiem promieniotwórczym [18].

## PODSUMOWANIE

Prowadzone badania jednoznacznie wskazują, iż użycie koniugatów nie tylko zwiększa skuteczność leczenia, ale również zmniejsza toksyczność terapeutyków względem komórek prawidłowych. Zastosowanie połączenia trastuzumabu, dendrymeru i leków pozwala na uzyskanie efektu terapii celowanej oraz dostarczenie bezpośrednio do komórek nowotworowych wysokiej dawki leku, przy jednoczesnej rezygnacji z dotychczas stosowanych toksycznych rozpuszczalników. Koniugaty są interesującą propozycją mogącą przynieść poprawę skuteczności terapii najczęściej występującego nowotworu u kobiet, jakim jest nowotwór piersi. Jednak aby zastosować je w przyszłości w terapii przeciwnowotworowej niezbędne jest jeszcze wykonanie wielu badań.

## PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękujemy Dominice Wróbel za wykonanie rycin do pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Albanell J., Codony J., Rovira A., Mellado B., Gascon P.: Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003; 532: 253-268
- [2] Alexis F., Rhee J.W., Richie J.P., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C.: New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.*, 2008; 26: 74-85
- [3] Arpino G., Weiss H., Lee A.V., Schiff R., De Placido S., Osborne C.K., Elledge R.M.: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005; 97: 1254-1261
- [4] Barok M., Tanner M., Köninki K., Jorma I.: Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab resistant breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Res.*, 2011; 13: R46
- [5] Barratt G.M.: Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2000; 3: 163-171
- [6] Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim Y.M., Mendelsohn J.: 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: 2825-2831
- [7] Beano A., Signorino E., Evangelista A., Brusa D., Mistrangelo M., Polimeni M.A., Spadi R., Donadio M., Ciuffreda L., Matera L.: Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J. Transl. Med.*, 2008; 6: 25
- [8] Bishop J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983; 52: 301-354
- [9] Blanco M.D., Teijón C., Olmo R.M., Teijón J.M.: Targeted nanoparticles for cancer therapy. *W: Recent advances in novel drug carrier systems*. 2012; 241-277
- [10] Boerman O.C., van Schaijk F.G., Oyen W.J., Corstens F.H.: Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J. Nucl. Med.*, 2003; 44: 400-411
- [11] Borg A., Tandon A.K., Sigurdsson H., Clark G.M., Fernö M., Fuqua S.A., Killander D., McGuire W.L.: HER-2/*neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.*, 1990; 50: 4332-4337
- [12] Bublil E.M., Yarden Y.: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2007; 19: 124-134
- [13] Burstein H.J., Keshaviah A., Baron A.D., Hart R.D., Lambert-Falls R., Marcom P.K., Gelman R., Winer E.P.: Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer*, 2007; 110: 965-972
- [14] Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L.: Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008; 60: 1615-1626
- [15] Cadoo K.A., Fornier M.N., Morris P.G.: Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013; 57: 312-321
- [16] Cancellò G., Montagna E., D'Agostino D., Giuliano M., Giordano A., Di Lorenzo G., Plaitano M., De Placido S., De Laurentiis M.: Continuing trastuzumab beyond disease progression: outcomes analysis in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2008; 10: R60
- [17] Cardinale D., Colombo A., Tortisi R., Sandri M.T., Civelli M., Salvatici M., Lamantia G., Colombo N., Cortinovis S., Dessanai M.A., Nolè F., Veglia F., Cipolla C.M.: Trastuzumab-induced cardiotoxicity: clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 3910-3916

- [18] Chan C., Cai Z., Reilly R.M.: Trastuzumab labeled to high specific activity with  $^{111}\text{In}$  by conjugation to G4 PAMAM dendrimers derivatized with multiple DTPA chelators exhibits increased cytotoxic potency on HER2-positive breast cancer cells. *Pharm. Res.*, 2013; 30: 1999-2009
- [19] Charliński G., Boguradzki P.: Zastosowanie trastuzumabu w leczeniu guzów litych. *Współcz. Onkol.*, 2003; 7: 39-44
- [20] Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney D.W.Jr., Leahy D.J.: Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 2003; 421: 756-760
- [21] Clark A.S., West K., Streicher S., Dennis P.A.: Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 707-717
- [22] Cline E.N., Li M.H., Choi S.K., Herbstman J.F., Kaul N., Meyhöfer E., Skiniotis G., Baker J.R., Larson R.G., Walter N.G.: Supporting information for: paclitaxel-conjugated PAMAM dendrimers adversely affect microtubule structure through two independent modes of action. University of Michigan, Ann Arbor, MI48109: S1-S12
- [23] Cohen S., Carpenter G., King L.Jr.: Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 4834-4842
- [24] Colbern G.T., Hiller A.J., Musterer R.S., Working P.K., Henderson I.C.: Antitumor activity of Herceptin® in combination with STEALTH® liposomal cisplatin or nonliposomal cisplatin in a HER2 positive human breast cancer model. *J. Inorg. Biochem.*, 1999; 77: 117-120
- [25] Dębska S., Potemski P.: Kontynuowanie leczenia trastuzumabem po progresji u chorych na raka piersi - argumenty za i przeciw. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2009; 5: 189-197
- [26] El-Sahwi K., Bellone S., Cocco E., Cargnelutti M., Casagrande F., Bellone M., Abu-Khalaf M., Buza N., Tavassoli F.A., Hui P., Silasi D.A., Azodi M., Schwartz P.E., Rutherford T.J., Pecorelli S., Santin A.D.: *In vitro* activity of pertuzumab in combination with trastuzumab in uterine serous papillary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 134-143
- [27] Esfand R., Tomalia D.A.: Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today*, 2001; 6: 427-436
- [28] Fountzilias G., Tsavdaridis D., Kalogera-Fountzila A., Christodoulou C.H., Timotheadou E., Kalofonos C.H., Kosmidis P., Adamou A., Papakostas P., Gogas H., Stathopoulos G., Razis E., Bafaloukos D., Skarlos D.: Weekly paclitaxel as first-line chemotherapy and trastuzumab in patients with advanced breast cancer. A Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study. *Ann. Oncol.*, 2001; 12: 1545-1551
- [29] Fuchs I., Vorsteher N., Buhler H., Evers K., Sehouli J., Schaller G., Kümmel S.: The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. *Anticancer Res.*, 2007; 27: 959-963
- [30] Garea S.A., Ghebaur A.: FT-IR spectroscopy and thermogravimetric characterization of prodrugs based on different dendritic polymers and antitumoral drug. *Mater. Plast.*, 2012; 49: 1-4
- [31] Gianni L., Eiermann W., Semiglazov V., Lluch A., Tjulandin S., Zambetti M., Moliterni A., Vazquez F., Byakhov M.J., Lichinitser M., Climent M.A., Ciruelos E., Ojeda B., Mansutti M., Bozhok A., et al.: Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.*, 2014; 15: 640-647
- [32] Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J.; Panel members.: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.*, 2013; 24: 2206-2223
- [33] Huang J., Wang S., Lyu H., Cai B., Yang X., Wang J., Liu B.: The anti-erbB3 antibody MM-121/SAR256212 in combination with trastuzumab exerts potent antitumor activity against trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer*, 2013; 12: 134
- [34] Hudis C.A.: Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 357: 39-51
- [35] Hurrell T., Othoff K.: The *in vitro* influences of epidermal growth factor and heregulin- $\beta$ 1 on the efficacy of trastuzumab used in Her-2 positive breast adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.*, 2013; 13: 97
- [36] Jackson S.E., Chester J.D.: Personalised cancer medicine. *Int. J. Cancer*, 2015; 137: 262-266
- [37] Kim J.W., Kim Y.T., Kim D.K., Song C.H., Lee J.W.: Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.*, 1996; 60: 283-287
- [38] Kobayashi H., Wu C., Kim M.K., Paik C.H., Carrasquillo J.A., Brechbiel M.W.: Evaluation of the *in vivo* biodistribution of indium-111 and yttrium-88 labeled dendrimer-1B4M-DTPA and its conjugation with anti-Tac monoclonal antibody. *Bioconjug. Chem.*, 1999; 10: 103-111
- [39] Kroep J.R., Linn S.C., Boven E., Bloemendal H.J., Baas J., Mandjes I.A., van den Bosch J., Smit W.M., de Graaf H., Schröder C.P., Vermeulen G.J., Hop W.C., Nortier J.W.: Lapatinib: clinical benefit in patients with HER2-positive advanced breast cancer. *Neth. J. Med.*, 2010; 68: 371-376
- [40] Kukowska-Latalo J.F., Candido K.A., Cao Z., Nigavekar S.S., Majoros I.J., Thomas T.P., Balogh L.P., Khan M.K., Baker J.R.Jr.: Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 5317-5324
- [41] Kunisue H., Kurebayashi J., Otsuki T., Tang C.K., Kurosumi M., Yamamoto S., Tanaka K., Doihara H., Shimizu N., Sonoo H.: Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br. J. Cancer*, 2000; 82: 46-51
- [42] Lamond N.W., Younis T.: Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations. *Int. J. Womens Health*, 2014; 6: 509-521
- [43] Majoros I.J., Myc A., Thomas T., Mehta C.B., Baker J.R.Jr.: PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 572-579
- [44] Mannocci A., De Feo E., de Waure C., Specchia M.L., Gualano M.R., Barone C., Ricciardi W., La Torre G.: Use of trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer beyond disease progression: a systematic review of published studies. *Tumori*, 2010; 96: 385-391
- [45] Margolis B.L., Lax I., Kris R., Dombalagian M., Honegger A.M., Howk R., Givol D., Ullrich A., Schlessinger J.: All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/*neu* are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 10667-10671
- [46] Mendelsohn J.: The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001; 8: 3-9
- [47] Merlin J.L., Barberi-Heyob M., Bachmann N.: *In vitro* comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann. Oncol.*, 2002; 13: 1743-1748
- [48] Milani A., Sangiolo D., Montemurro F., Aglietta M., Valabrega G.: Active immunotherapy in HER2 overexpressing breast cancer: current status and future perspectives. *Ann Oncol.*, 2013; 24: 1740-1748
- [49] Miyano T., Wijagkanalan W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M.: Anionic amino acid dendrimer-trastuzumab conjugates for specific internalization in HER2-positive cancer cells. *Mol. Pharm.*, 2010; 7: 1318-1327
- [50] Montemurro F., Donadio M., Clavarezza M., Redana S., Jacomuzzi M.E., Valabrega G., Danese S., Vietti-Ramus G., Durando A., Venturini M., Aglietta M.: Outcome of patients with HER2-positive advanced bre-

ast cancer progressing during trastuzumab-based therapy. *Oncologist*, 2006; 11: 318-324

[51] Mrozowskiak M., Olszewski W.P., Piaścik A., Olszewski W.T.: HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results. *Pol. J. Pathol.*, 2004; 55: 165-171

[52] Nahta R., Esteva F.J.: HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 5078-5084

[53] Nishimura R., Okumura Y., Arima N.: Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer: time to progression and survival. *Breast Cancer*, 2008; 15: 57-64

[54] Olson E.M., Najita J.S., Sohl J., Arnaout A., Burstein H.J., Winer E.P., Lin N.U.: Clinical outcomes and treatment practice patterns of patients with HER2-positive metastatic breast cancer in the post-trastuzumab era. *Breast*, 2013; 22: 525-531

[55] Park J.W., Colbern G., Nuijens A.: Increased levels of circulating HER2 ECD in response to anti-HER2 antibody therapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1997; 46: 267

[56] Pegram M., Hsu S., Lewis G., Pietras R., Beryt M., Sliwkowski M., Coombs D., Baly D., Kabbinnar F., Slamon D.: Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene*, 1999; 18: 2241-2251

[57] Perez E.A., Suman V.J., Davidson N.E., Sledge G.W., Kaufman P.A., Hudis C.A., Martino S., Gralow J.R., Dakhil S.R., Ingle J.N., Winer E.P., Gelmon K.A., Gersh B.J., Jaffe A.S., Rodeheffer R.J.: Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 1231-1238

[58] Ritter C.A., Arteaga C.L.: The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Semin. Oncol.*, 2003; 30 (Suppl. 1): 3-11

[59] Ropero S., Menéndez J.A., Vázquez-Martín A., Montero S., Cortés-Funes H., Colomer R.: Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004; 86: 125-137

[60] Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Puzstai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N.: The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 2009; 14: 320-368

[61] Rossin R., Verkerk P.R., van den Bosch S.M., Vuldens R.C., Verel I., Lub J., Robillard M.S.: *In vivo* chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010; 49: 3375-3378

[62] Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J.S., Hortobagyi G.N., Puzstai L.: Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 5678-5685

[63] Seidman A., Hudis C., Pierri M.K., Shak S., Paton V., Ashby M., Murphy M., Stewart S.J., Keefe D.: Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1215-1221

[64] Shukla R., Thomas T.P., Desai A.M., Kotlyar A., Park S.J., Baker J.R.: HER2 specific delivery of methotrexate by dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Nanotechnology*, 2008; 19: 295102

[65] Simon R., Nocito A., Hübscher T., Bucher C., Torhorst J., Schraml P., Bubendorf L., Mihatsch M.M., Moch H., Wilber K., Schötzau A., Kononen J., Sauter G.: Patterns of HER-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 1141-1146

[66] Singletary S.E., Allred C., Ashley P., Bassett L.W., Berry D., Bland K.I., Borgon P.I., Clark G., Edge S.B., Hayes D.F., Hughes L.L., Hutter R.V., Morrow M., Page D.L., Recht A., et al.: Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 3628-3636

[67] Sjögren S., Inganäs M., Lindgren A., Holmberg L., Bergh J.: Prognostic and predictive value of *c-erbB-2* overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 462-469

[68] Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987; 235: 177-182

[69] Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 783-792

[70] Sosińska-Melcarek K., Jassem J.: Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2005; 1: 225-232

[71] Stemmler H.J., Menegele K., Schmitt M., Harbeck N., Laessig D., Herrmann K.A., Schaffer P., Heinemann V.: Intrathecal trastuzumab (Herceptin) and methotrexate for meningeal carcinomatosis in HER2-overexpressing metastatic breast cancer: a case report. *Anticancer Drugs*, 2008; 19: 832-836

[72] Suter T.M., Procter M., van Veldhuisen D.J., Muscholl M., Bergh J., Carlomagno C., Perren T., Passalacqua R., Bighin C., Klijn J.G., Ageev F.T., Hitre E., Groetz J., Iwata H., Knap M., et al.: Trastuzumab-associated cardiac adverse effects in the herceptin adjuvant trial. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 3859-3865

[73] Talekar M., Kendall J., Denny W., Garg S.: Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. *Anticancer Drugs*, 2011; 22: 949-962

[74] Tang Y., Lamberti G., Curran E., Kiani M., Wang B.: Development and characterization of a multi-drug resistant Her-2/neu positive breast cancer cell line (58.6). *FASEB J.*, 2014; 28 (Suppl.): 58.6

[75] Taucher S., Rudas M., Mader R.M., Gnatt M., Dubsky P., Bachleitner T., Roka S., Fitzal F., Kandioler D., Sporn E., Friedl J., Mittlböck M., Jakesz R.: Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer*, 2003; 98: 2547-2553

[76] Treish I., Schwartz R., Lindley C.: Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2000; 57: 2063-2076

[77] Tripathy S., Das M.K.: Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers. *J. Appl. Pharmaceut. Sci*, 2013; 3: 142-149

[78] Tseng P.H., Wang Y.C., Weng S.C., Weng J.R., Chen C.S., Brueggemeier R.W., Shapiro C.L., Chen C.Y., Dunn S.E., Pollak M., Chen C.S.: Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol. Pharmacol.*, 2006; 70: 1534-1541

[79] Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., Stewart S.J.: First-line Herceptin® monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology*, 2001; 61 (Suppl. 2): 37-42

[80] Witters L.M., Kumar R., Chinchilli V.M., Lipton A.: Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1997; 42: 1-5

[81] Wu C., Brechbiel M.W., Kozak R.W., Gansow O.A.: Metal-chelate-dendrimer-antibody constructs for use in radioimmunotherapy and imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994; 4: 449-454

[82] Yabbarov N.G., Posypanova G.A., Vorontsov E.A., Popova O.N., Severin E.S.: Targeted delivery of doxorubicin: drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry*, 2013; 78: 884-894

[83] Zhu S., Hong M., Zhang L., Tang G., Jiang Y., Pei Y.: PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: *in vitro* evaluation and *in vivo* tumor accumulation. *Pharm. Res.*, 2010; 27: 161-174

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.