

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт

ВИЛИМ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск
2008

*О.П. Колесникова, О.Т. Кудаева, Т.Г. Сухенко, А.П. Лыков,
Т.В. Долгих, К.В. Гайдунь, *А.Н. Мирскова, *Г.Г. Левковская,
М.Г. Воронков, В.А. Козлов
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
*Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АРИЛГЕТЕРОАЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Несмотря на существование в клинической практике более 60 противоопухолевых веществ, эффективность большинства из них недостаточна и спектр онкологических заболеваний, чувствительных к химиотерапии, ограничен. Поэтому актуальным является разработка новых более активных веществ, а также веществ, эффективных при опухолях с первичной или приобретенной резистентностью к лекарственной терапии.

На основании скрининга иммуноактивных и противоопухолевых свойств 13 оригинальных соединений класса алканкарбонновых кислот (ряда трис-(2-оксиэтил) аммониевых солей производных органил-тио(сульфонил) уксусных кислот, замещенных ароксидуксусных кислот и ряда трис-(2-гидроксиэтил) аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты и ее производных), отобраны 3 соединения, обладающие наиболее активными иммуностропными и противоопухолевыми свойствами.

Целью исследования являлся скрининг противоопухолевых свойств *in vitro* и *in vivo* новых соединений – производных арилгетероалканкарбонновых кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тестируемые соединения. Для испытания противоопухолевых свойств из Иркутского института органической химии СО РАН были предоставлены следующие оригинальные соединения из производных алканкарбонновых кислот:

- соединение ВМ-42-99 – трис-(2-гидроксиэтил) аммониевая соль 2-гидроксифеноксидуксусной кислоты,
- соединение ВМ-7-02 – трис-(2-гидроксиэтил) аммониевая соль (1-бензилиндолил-3-тио)уксусной кислоты,

- соединение ВМ-8-02 – трис-(2-гидроксиэтил) аммониевая соль (1-метилиндолил-3-тио)уксусной кислоты.

Все соединения растворяли в среде RPMI и использовали в разных дозах относительно LD₅₀. Испытания соединений проводили в несколько серий опытов, соответственно каждая серия опытов имела свой контроль. Контрольные и опытные группы состояли не менее чем из 8-10 мышей.

Животные. В работе использовали здоровых половозрелых животных – мышей линии СВА, DBA/2 и мышей гибридов (CBAxС57BL/6)F1 (CBF1), (C57BL/6xDBA/2)F1 (BDF1) обоего пола, 8-10 недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышает ±10%. Контрольные и опытные животные одного возраста и получены одновременно из одного питомника (“Рассвет”, г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром).

Статистическая обработка. Полученные данные обрабатывались по непараметрическому критерию U Манна-Уитни (Гублер Е. В., 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Противоопухолевые свойства соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 *in vitro*

Основной целью исследований *in vitro* является оценка прямого цитотоксического эффекта потенциальных противоопухолевых препаратов и выявление возможной дифференциальной чувствительности опухолевых клеток человека различного генеза к изучаемым соединениям. Исследование может проводиться на всех стадиях разработки новых препаратов. Система отбора и изучения соединений с потенциальной противоопухолевой активностью *in vitro* основана на определении степени подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента, которое вычисляется по формуле $N = \text{Опыт} / \text{Контроль} \times 100\%$. При этом используются следующие методы оценки (метод подсчета клеток, МТТ тест, ³Н-тимидиновый тест).

Оценка противоопухолевых свойств соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 проводилась ³Н-тимидиновым методом на клетках мастоцитомы Р815, меланомы В16, лимфомы L1210 и гепатомы Г27. Клетки засеивали в

концентрации 10×10^3 /лунку, инкубировали с соединениями в течение 24 часов, за 6 часов до конца инкубации вносили 1 мкКи H^3 -тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на стеклянно-волоконистые фильтры ("Flow Lab") с помощью аппарата Harvester ("Titertek"). Результаты выражали в имп./мин. включенного тимидина на 10×10^3 клеток (средние данные по триплету). Степень подавления роста опухолевых клеток под влиянием тестируемых соединений вычисляли по формуле: $N = (\text{опыт/контроль}) \times 100\%$. В таблицах представлены данные по ингибции пролиферативной активности опухолевых клеток под действием тестируемых соединений относительно контрольных значений пролиферативной активности этих клеток.

Соединения ВМ-42-99, ВМ-7-02 и ВМ-8-02 испытывались в дозах 3, 30, 60, 75, 100, 150 и 300 мкг/мл. В качестве противоопухолевых препаратов сравнения использовали 5-фторурацил в дозе 5; 25 и 50 мкг/мл и цисплатин в дозе 0,5; 2,5; 5 мкг/мл. В таблице 1 и 2 представлены данные по цитотоксическому эффекту соединений *in vitro* на опухолевые клетки различного генеза.

Таблица 1

Цитотоксический эффект соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 *in vitro* на опухолевые клетки меланомы В16 и гепатомы Г27

Соединения	Дозы (мкг/мл)	Меланома В16 (% ингибции)	Гепатома Г27 (% ингибции)
ВМ-42-99	3	27	5
	30	18	12
	300	24	17
ВМ-7-02	3	30	17
	30	41	17
	60	94	34
	150	96	64
	300	96	99
ВМ-8-02	3	43	12
	30	41	28
	300	94	98
5-ФУ	5	12	+6
	25	36	+13
	50	59	1
Цисплатин	0,5	60	51
	2,5	93	85
	5,0	94	97

Как видно из данных таблицы 1, соединение ВМ-42-99 практически не оказывает противоопухолевой активности на клетки меланомы В16 и гепатомы Г27. Эффекты соединений ВМ-7-02 и ВМ-8-02 в дозах 30 и 300 мкг/мл проявляют сравнимый противоопухолевый эффект.

Таблица 2

Цитотоксический эффект соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 in vitro на опухолевые клетки лимфомы L1210 и мастоцитомы P815

Соединения	Дозы (мкг/мл)	Лимфома L1210 (% ингибиции)	Мастоцитома P815 (% ингибиции)
ВМ-42-99	30	16	14
	60	12	10
	75	15	7
	100	20	12
	150	11	14
ВМ-7-02	30	20	30
	60	49	61
	75	63	85
	100	72	93
	150	89	99
ВМ-8-02	30	23	27
	60	23	18
	75	31	31
	100	47	41
	150	64	44

Как видно из данных таблицы 2, соединение ВМ-42-99 практически не оказывает противоопухолевой активности на клетки лимфомы и мастоцитомы. Соединение ВМ-8-02 по сравнению с соединением ВМ-7-02 проявляет значительно меньший цитотоксический эффект на клетках лимфомы L1210 и мастоцитомы P815.

Таким образом, соединение ВМ-7-02 на опухолевых клетках 4-х типов проявляет дозозависимый цитотоксический эффект. Максимальный эффект соединения ВМ-7-02 при дозах 150-300 мкг/мл на всех используемых типах опухолевых клеток составляет 89-99%, что свидетельствует об отсутствии дифференциальной чувствительности опухолевых клеток к изучаемому соединению. В соответствии с критериями оценки цитотоксического эффекта для соединений нового класса LD₅₀ должно быть < 10⁻⁴. LD₅₀ для ВМ-7-02 составляет 50-60 мкг/мл в зависимости от вида опухоли. Молекулярный вес соединения ВМ-7-02 равен 446,3. Таким образом, доза соединения 10⁻⁴, равная 45 мкг/мл, близка к требуемой и соединение ВМ-

7-02 по данным исследований *in vitro* можно отнести к эффективным цитотоксическим соединениям нового класса.

Противоопухолевые свойства соединений *in vivo*

В соответствии с требованиями ФК МЗ РФ к моделям и методам изучения противоопухолевой активности *in vivo* в опытах должно быть использовано 2-8 генераций перевиваемых опухолей. В том числе обязательными для изучения являются опухоли лимфолейкоза L1210, меланомы В16, дополнительными – гепатома Г22 и др.

Изучали влияние соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 на метастазирование клеток гепатомы Г27.

Мышам линии СВА внутривенно вводили клетки гепатомы Г27 в дозе 100×10^3 /мл. Учет метастазов в легких проводили на 14-19 день после перевивки опухоли. Соединения ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 в различных дозах вводили внутрибрюшинно, проведено 11-15 инъекций.

Таблица 3

Влияние соединений ВМ-42-99, ВМ-7-02, ВМ-8-02 на метастазирование клеток гепатомы Г27 в легкие

Опыт I	Mts*	% ингибции	Опыт II	Mts*	% ингибции
Контроль	11,0		Контроль	9,2	
			ВМ-42-99 100 мг/кг	7,6	17
ВМ-7-02 10 мг/кг	11,1	-	ВМ-7-02 50 мг/кг	5,9	36
25 мг/кг	6,3	43	100 мг/кг	9,4	-
50 мг/кг	7,0	36			
100 мг/кг	10,5	4,5			
			ВМ-8-02 100 мг/кг	5,8	37

Mts* – среднее число метастазов в легких.

Как видно из данных таблицы 3, соединение ВМ-42-99 в дозе 100 мг/кг на 17% уменьшает количество метастазов в легких, соединение ВМ-8-02 в такой же дозе – 37%. Соединение ВМ-7-02 по данным двух опытов проявляет максимальный антиметастатический эффект – 43 и 36%, при этом наибольший эффект выявляется при сравнительно невысоких дозах соединения – 25, 50 мг/кг.

На основании данных по влиянию соединений на противоопухолевую активность *in vitro* и данных по антиметастатической активности *in vivo* на гепатоме Г27, в которых показана наибольшая противоопухолевая активность соединения ВМ-7-02, в дальнейшем проводили исследования только с этим соединением.

Влияние соединения ВМ-7-02 на метастазирование клеток гепатомы Г27 в сравнении с цисплатином

Мышам линии СВА внутривенно вводили клетки гепатомы Г27 в дозе 100×10^3 /мл. Учет метастазов в легких проводили на 26 день после перевивки опухоли. Использовали цисплатин в дозе 6 мг/кг (курсовая доза 120 мкг/мышь) и соединение ВМ-7-02 в дозе 10 мг/кг (курсовая доза 1200 мкг/мышь) и 25 мг/кг. Курсовая доза вводилась внутривенно ежедневно в течение 6 дней подряд начиная со дня перевивки опухоли.

Таблица 4

Влияние соединения ВМ-7-02 на метастазирование гепатомы Г27 в легкие в сравнении с цисплатином

Группы	Дозы	Mts*	% ингибиции
Контроль		3,4	
Цисплатин	6 мг/кг	2,6	23,5
ВМ-7-02	10 мг/кг	4,6	-
	25 мг/кг	2,2	35,3
	100 мг/кг	2,1	38,2

Mts* – среднее число метастазов в легких.

Как видно из данных таблицы 4, соединение ВМ-7-02 аналогично данным, представленным в таблице 3, где соединение вводилось внутрибрюшинно, в дозе 10 мг/кг не оказывает влияние на метастазирование, а в дозе 25 мг/кг на 35% уменьшает количество метастазов в легких. При внутривенном введении соединения ВМ-7-02 в дозе 100 мг/кг в отличие от внутрибрюшинного выявляется антиметастатический эффект. Антиметастатический эффект соединения ВМ-7-02 сравним с эффектом цисплатина.

Влияние комбинированного применения соединения ВМ-7-02 с цисплатином на метастазирование меланомы В16 и гепатомы Г27

Изучение противоопухолевой активности оригинальных веществ нового класса предусматривает изучение его эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами.

**Влияние комбинации соединения ВМ-7-02 с цисплатином
на количество метастазов в легких меланомы В16 и гепатомы Г27**

Группы	Меланома В16 (100x10 ³ /мышь)		Гепатома Г 27 (50x10 ³ /мышь)	
	Mts	% ингибции	Mts	% ингибции
Контроль	23,3		4,3	
ЦП*	11,8	49,4	2,5	41,9
ВМ-7-02*	17,2	26,2	3,7	14,0
ЦП+ВМ-7-02**	7,2	69,1	2,9	32,6

ЦП* - цисплатин – в дозе 20 мкг/мышь (ежедневно 6 инъекций в/в).

ВМ-7-02* – в дозе 2 мг/мышь (ежедневно 6 инъекций в/в).

ЦП+ВМ-7-02** – введение ЦП и ВМ-7-02 чередовали (всего по 3 в/в инъекции каждого). ЦП и ВМ-7-02 – ½ курсовой дозы.

Как видно из данных таблицы 5, установлена эффективность использования соединения ВМ-7-02 в комбинации с доступным наиболее эффективным и широко используемым в клинической онкологии препаратом цисплатином на модели меланомы: введение цисплатина в полной дозе на 49,4% тормозит метастазирование, введение ВМ-7-02 на 26,2%, а комбинация цисплатина (1/2 дозы) с ВМ-7-02 – на 69,1%, т.е. выявляется потенцирующий эффект – эффект комбинации меньше суммарного эффекта обоих комбинантов, но выше, чем при введении каждого из них. На модели гепатомы антиметастатической эффективности комбинации не выявлено.

**Влияние соединения ВМ-7-02 на метастазирование клеток
меланомы В16**

Клетки меланомы В16 внутривенно перевивали мышам линии С57ВL/6 в дозе 200x10³/мл. Соединение ВМ-7-02 в разных дозах вводили 10 раз внутрибрюшинно, ежедневно. Проводили учет метастазов в легких на 15 день после перевивки клеток опухоли.

Таблица 6

Влияние соединения ВМ-7-02 на метастазирование клеток меланомы В16

Доза	I опыт Mts*	% ингибции	II опыт Mts*	% ингибции
Контроль	106,7		96,4	
10 мг/кг	89,2	16,0	160,5	
25	71,6	33,0	128,6	
50	132,6	-	91,4	1,6
100	125,5	-	43,7	54,7

Mts* – среднее число метастазов в легких.

Как видно из данных таблицы 6, внутрибрюшинное применение соединения ВМ-7-02 по данным двух опытов, где в каждой группе было по 20 мышей, не дает четкого представления об эффективности такого способа введения соединения на метастазирование клеток меланомы В16.

Влияние соединения ВМ-7-02 на выживаемость мышей С57BL/6 с меланомой В16

Мышам-самцам С57BL/6 подкожно вводили 100×10^3 /мл клеток меланомы. ВМ-7-02 в дозе 300 мг/кг вводили в/б через 48 часов после инокуляции опухоли. Проведено 7 инъекций в течение 14 дней. Через 2 недели после окончания введения ВМ-7-02 (30 день после инокуляции опухоли) в контроле были живы 4 из 20 мышей (20%), в опыте – 7 из 18 (39%).

ВЫВОДЫ

1. Соединение ВМ-7-02 на опухолевых клетках 4-х типов проявляет дозозависимый цитотоксический эффект. Максимальный эффект соединения ВМ-7-02 при дозах 150-300 мкг/мл на всех используемых типах опухолевых клеток составляет 89-99%, что свидетельствует об отсутствии дифференциальной чувствительности опухолевых клеток к изучаемому соединению.

2. Антиметастатический эффект соединения ВМ-7-02 сравним с эффектом цисплатина.

3. Установлена эффективность использования соединения ВМ-7-02 в комбинации с наиболее эффективным и широко используемым в клинической онкологии препаратом цисплатином в модели меланомы.