



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К.КОЛЬЦОВА РАН

УДК 615.21/26 + 577.152.34  
№ госрегистрации 01201279534  
Инв. № 412.2014.4



УТВЕРЖДАЮ  
Директор, профессор, д.б.н.

Н.Д. Озернюк

«01» декабря 2014 г.

**ОТЧЕТ**

**О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

«Доклинические исследования нового противоопухолевого лекарственного средства,  
воздействующего на пул 26S-протеасом»  
(шифр «2.1 Протеасомы 2012»)

(итоговый)

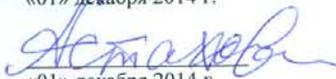
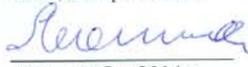
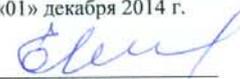
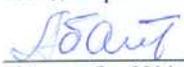
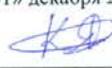
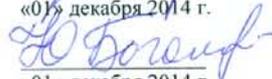
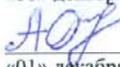
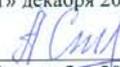
Руководитель работы,  
д.б.н.

Н.П. Шарова

«01» декабря 2014 г.

Москва 2014

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель работ, д.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Шарова Н. П.
Ст. науч. сотр., к.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Астахова Т.М.
Ст. науч. сотр., к.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Люпина Ю.В.
Ст. науч. сотр., к.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Ерохов П.А.
Науч. сотр., к.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Абатурова С.Б.
Науч. сотр., к.б.н.	 «01» декабря 2014 г.	Карпова Я.Д.
Ст. лаборант	 «01» декабря 2014 г.	Горелова В.С.
Ст. лаборант	 «01» декабря 2014 г.	Богомягкова Ю.В.
Ст. лаборант	 «01» декабря 2014 г.	Орлова А.Ш.
Аспирант	 «01» декабря 2014 г.	Степанова А.А.
Нормоконтролер	 «01» декабря 2014 г.	Карпова Я.Д.

## РЕФЕРАТ

Отчет 34 стр., 6 табл., 13 рис.

### 26S-ПРОТЕАСОМЫ, АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ, БОРТЕЗОМИБ, РЕЦЕПТУРЫ ПРЕПАРАТОВ, ОПУХОЛЕВЫЕ ЛИНИИ

Объектом исследования является новое предлагаемое противоопухолевое средство, ДМНСН в сочетании с низкими нетоксичными дозами бортезомиба, которое должно повреждать, в основном, одну из форм протеасом (26S-протеасомы) и проявлять меньшую токсичность по отношению к организму.

Целью выполнения НИР является проведение доклинических исследований нового противоопухолевого лекарственного средства, воздействующего на пул 26S-протеасом.

Методология проведения работ (на втором этапе):

- отработка технологии наработки образцов для дальнейших исследований
- разработка лабораторного регламента (проекта);
- экспериментальная оценка параметров острой токсичности исследуемых препаратов на организм подопытных животных с определением переносимых, токсических и летальных доз (доклинические исследования острой токсичности);
- экспериментальная оценка характера, выраженности и обратимости возможного повреждающего действия исследуемого препарата на организм крыс при многократном внутривенном введении (доклинические исследования хронической токсичности);
- разработка плана определения максимальной переносимой дозы и изучение противоопухолевой активности комплексных препаратов для онкологии (план доклинического исследования эффективности)

В ходе работы была отработана технология наработки образцов и проведен анализ качества, полученных композиций. Полученные данные были использованы для описания технологии получения композиций в лабораторных условиях. Был оформлен лабораторный регламент получения лекарственного средства согласно ОСТ 64-2-003-2002, в части следующих разделов:

- технологическая схема производства
- аппаратная схема производства и спецификация оборудования
- изложение технологического процесса
- материальный баланс
- контроль производства

Исследования острой токсичности не выявило существенных признаков общетоксического действия нового комплексного противоопухолевого средства на основе бортезомиба и ДМНСН при повторном многократном введении беспородным крысам.

По результатам исследований хронической токсичности выявлены дозозависимые неспецифические симптомы отравления: снижение двигательной активности, потребления корма и воды, угнетенное состояние в течение от нескольких часов до нескольких суток после введения. По данным гибели животных в экспериментах установлены параметры острой токсичности препаратов (ЛД10, ЛД16, ЛД50, 95% доверительный интервал ЛД50, ЛД84) для мышей и крыс. Значения ЛД50 препаратов по готовой лекарственной форме для мышей и для крыс обоего пола в возрастающем ряду располагаются следующим образом: препарат сравнения < композиция №1 < композиция №4. В качестве препарата сравнения был использован VELCADE®.

Определены максимальные переносимые дозы композиций №1 и №4 и препарата сравнения при шестикратном (по два раза в неделю) внутрибрюшинном введении интактным мышам C57Bl/6 (мышам без опухолей) и мышам с привитыми опухолями. Значения максимальных доз, не вызывающих во время курса введения гибели как интактных мышей, так и мышей с привитой опухолью, в возрастающем ряду располагаются следующим образом: препарат сравнения < композиция №1 < композиция №4.

При изучении противоопухолевой активности комплексных препаратов для онкологии и препарата сравнения по показателю торможения роста опухоли, привитой мышам C57Bl/6, препараты использовали в концентрациях, не превышающих максимально переносимые дозы, и получили следующие результаты. У мышей с развивающейся меланомой В-16 композиция №4 через 7 дней после последнего введения оказывала противоопухолевое действие, в 2 раза превышающее действие препарата сравнения, противоопухолевый эффект композиции №1 был сравним с эффектом препарата сравнения.

У мышей с развивающейся аденокарциномой молочной железы 755 (Ca 755) эффект обеих композиций превышал действие препарата сравнения в 1,5 раза через 14 дней после последнего введения.

У мышей с развивающимся гемоцитобластозом La обе композиции так же, как и препарат сравнения, не оказывали действия на опухоль.

У мышей с развившейся гепатоцеллюлярной карциномой Нера 1-6 обе композиции проявляли соизмеримый друг с другом и с препаратом сравнения противоопухолевый эффект на 7, 14 и 21 день после начала лечения.

Таким образом, композиция №1 и композиция №4 проявляют противоопухолевый эффект, либо соизмеримый с препаратом сравнения, либо превосходящий его в 1,5-2 раза, при значительно меньшей токсичности по отношению к организму.

При исследовании действия комплексных препаратов для онкологии и препарата сравнения на химотрипсинподобную активность протеасом был выявлен синергетический эффект входящих в состав композиций веществ: бортезомиба и ДМНСН. Учитывая тот факт, что, как было показано ранее, *in vivo* аналог ДМНСН повреждает функции 19S (РА700) активатора протеасом в составе 26S-протеасом [1], можно сказать, что композиции №1 и №4 оказывают сложное, комплексное действие на протеасомы. В целом, действие этих композиций связано с угнетением функций протеасом, отличающимся по механизму с действием препарата сравнения.

Проделанная работа и полученные результаты позволяют сделать заключение о перспективности использования композиции №1 и композиции №4 для клинических испытаний в качестве противоопухолевых препаратов для лечения онкологических заболеваний молочной железы, печени, меланомы кожи и, возможно, других онкологических заболеваний.

## Оглавление

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1 Обоснование выбора активных компонентов для разработки нового противоопухолевого средства.....	9
2 Анализ эффективности двух вариантов композиций нового противоопухолевого средства в исследовании <i>in vitro</i> .....	11
2.1 Исследование цитотоксического эффекта композиций №1 и №4 в МТТ-тесте.....	11
2.2 Оценка эффективности подавления активности протеасом композициями №1 и №4.....	15
3 Обоснование выбора перевиваемых штаммов злокачественных опухолей для исследования противоопухолевых эффектов композиций <i>in vivo</i> .....	21
3.1 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в Российской Федерации .....	21
3.2 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в Великобритании .....	22
3.3 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в США.....	22
3.4 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в различных регионах мира.....	23
3.5 Разработка плана исследований композиций <i>in vivo</i> .....	24
3.5.1 Модели перевиваемых штаммов гемоцитобластома La, Ca 755, меланомы В-16.....	25
3.5.2 Получение модели перевиваемой гепатоцеллюлярной (гепатоклеточной) карциномы .....	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	33

## Список сокращений

Активатор 19S (PA700) – активатор протеасом, субчастица, входящая в состав 26S-протеасом;

ГЦК – гепатоцеллюлярная (гепатоклеточная) карцинома;

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид;

Vel - VELCADE<sup>®</sup>, Велкейд.

## Введение

В 2003 г. в США было разработано и введено в медицинскую практику противоопухолевое лекарство Велкейд, содержащее активный компонент бортезомиб. Это первое и пока единственное лекарство, механизм действия которого связан с подавлением функций протеасом за счет конкурентного ингибирования активных центров протеасом [2]. В настоящее время Велкейд используется более чем в 50 странах мира. За 10 лет применения этого лекарства выяснено, что оно нарушает функции иммунной системы, желудочно-кишечного тракта, почек, вызывает утомляемость и ухудшение общего состояния пациентов [2]. Поэтому период его использования ограничен. Несмотря на это, идея создать противоопухолевое лекарство на основе его действия на протеасомы крайне актуальна до сих пор в связи с многофункциональностью протеасом и регуляцией ими всех клеточных процессов, в том числе в злокачественных опухолях.

Наличие в клетках опухолей множественных форм протеасом с разными функциями определило возможность инновационных подходов к созданию лекарств, дифференцированно воздействующих на эти формы. Предыдущие работы в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» показали, что в растущих опухолях различного происхождения увеличивается экспрессия 19S-субчастицы 26S-протеасом, в регрессирующей опухоли, напротив, она уменьшается. Это позволило выбрать 19S-субчастицу 26S-протеасом в качестве новой мишени для терапии онкологических заболеваний.

На первом этапе работ были отобраны активные компоненты нового противоопухолевого средства. В их число вошел ДМНСН, который подавляет функции 19S-субчастицы 26S-протеасом *in vivo*. Для усиления противоопухолевого эффекта в качестве второго активного компонента был выбран бортезомиб, в значительно более низких концентрациях, чем в составе лекарства Велкейд. Новое предложенное лекарственное средство обещает быть более эффективным и менее токсичным для организма в целом по сравнению с бортезомибом.

На втором этапе работ по Госконтракту были поставлены следующие задачи:

1. Разработка лабораторной технологии получения лекарственного средства (Часть 2);
2. Разработка плана доклинических исследований (Часть 2);
3. Нарботка образцов лекарственного средства, проведение контроля качества образцов лекарственного средства (Часть 1);
4. Проведение доклинических исследований (Часть 1).

## **1. Обоснование выбора активных компонентов для разработки нового противоопухолевого средства**

В качестве первого активного компонента нового противоопухолевого средства был выбран ДМНСН, поскольку ранее было показано, что его аналог подавляет функции активатора РА700 (19S), входящего в состав 26S протеасом [1]. В свою очередь, в ходе выполнения работ по ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по теме: «Выявление перспективных мишеней среди множественных форм протеасом для разработки новых противоопухолевых лекарств» в качестве перспективной мишени для разработки нового противоопухолевого средства был выявлен активатор РА700 протеасом. При выборе ДМНСН в качестве активного компонента нового противоопухолевого средства немаловажную роль сыграл и тот факт, что это соединение, являясь активным компонентом лекарства Викасол, регулирует иммунные функции организма [3].

Кроме того, для усиления противоопухолевого эффекта в число активных компонентов нового противоопухолевого средства был введен бортезомиб, как известный ингибитор активности протеасом, входящий в состав противоопухолевого лекарства VELCADE® [2].

Учитывая высокую токсичность бортезомиба для организма [2], его содержание рассчитывали таким образом, чтобы оно было в несколько раз ниже, чем в составе лекарства VELCADE®.

Таким образом, было предложено 4 композиции (№1, №2, №3 и №4), содержащие ДМНСН в количестве 16,5 мг или 33 мг и бортезомиб - в количестве 0,35 мг или 0,9 мг из расчета на одну дозу лекарственного средства (Таблица 1). Для сравнения было предложено 2 контрольных препарата: препарат 0 (VELCADE®) и препарат К, содержащий такое же количество бортезомиба, как и VELCADE®, и 33 мг ДМНСН.

Таблица 1 – Активные компоненты и их содержание в различных композициях нового противоопухолевого средства

Шифр композиции	Соединение	Доза на 1 мл крови, мкг	Доза из расчета на кровотоки человека (5 л), мг
<b>0 (Vel)</b>	Бортезомиб	0,7	3,5
<b>К</b>	Бортезомиб	0,7	3,5
	ДМНСН	6,6	33
<b>№1</b>	Бортезомиб	0,18	0,9
	ДМНСН	6,6	33
<b>№2</b>	Бортезомиб	0,07	0,35
	ДМНСН	6,6	33
<b>№3</b>	Бортезомиб	0,18	0,9
	ДМНСН	3,3	16,5
<b>№4</b>	Бортезомиб	0,07	0,35
	ДМНСН	3,3	16,5

На отчетном этапе работы были выбраны две композиции из предложенного списка: композиция №1, с максимальным количеством обоих компонентов, входящих в ее состав (0,9 мг бортезомиба и 33 мг ДМНСН), и композиция №4, с минимальным количеством обоих компонентов, входящих в ее состав (0,35 мг бортезомиба и 16,5 мг ДМНСН).

## **2. Анализ эффективности двух вариантов композиций нового противоопухолевого средства в исследовании *in vitro***

На начальном этапе изучения свойств композиций №1 и №4 была поставлена задача оценить их цитотоксический эффект в культуре клеток (*in vitro*) и действие на активность протеасом (*in vitro*). Для этого была выбрана одна из наиболее часто используемых в лаборатории клеточных линий – НЕК 293Т, immortalized клеток эмбриональной почки человека.

### **2.1 Исследование цитотоксического эффекта композиций №1 и №4 в МТТ-тесте**

Цитотоксический эффект композиций №1 и №4 *in vitro* исследовали с помощью МТТ-теста. МТТ-тест стандартно используется для оценки цитотоксичности потенциальных противоопухолевых соединений в эксперименте. Тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток конвертировать бесцветный водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в голубые кристаллы формазана, растворимые в диметилсульфоксиде или других растворителях.

В работе анализировали растворы смесей №1 и №4, в качестве положительного контроля был использован коммерческий препарат VELCADE® (bortezomib) (Vel). Препараты добавляли в культуральную жидкость трансформированных клеток и оценивали эффект действия соединений на клетки, высаженные в количествах 25000, 12500, 6250 в лунку 96 луночного планшета. При анализе определяли цитотоксический эффект, вызываемый веществами в концентрациях 7,7мкг/мл и 1,5мкг/мл. Опыт повторяли через 3 и 7 дней после разведения препаратов для оценки стабильности компонентов смесей при стандартном хранении (+4°C).

Клетки НЕК 293 Т культивировали в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PanEco, Russia), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Hi clone, USA), 2мМ L-Глютамина (PanEco, Russia) и антибиотики (Пенициллин/стрептомицин) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки пассировали 1:3, 1:5, 1:8 каждый раз, когда они образовывали монослой. Клетки культивировали в 25 см<sup>2</sup> и 75 см<sup>2</sup> флаконах (Nunc, Danemark). Перед началом эксперимента клетки рассевали на 96 луночный планшет в количествах 25000, 12500, 6250 в лунку в объеме 200 мкл. Через 24 часа культуральную жидкость клеток заменяли на среду с исследуемыми веществами №1, №4, Vel (препараты анализировали в концентрациях 7,7мкг/мл и 1,5мкг/мл). Опыт ставился в трипликатах.

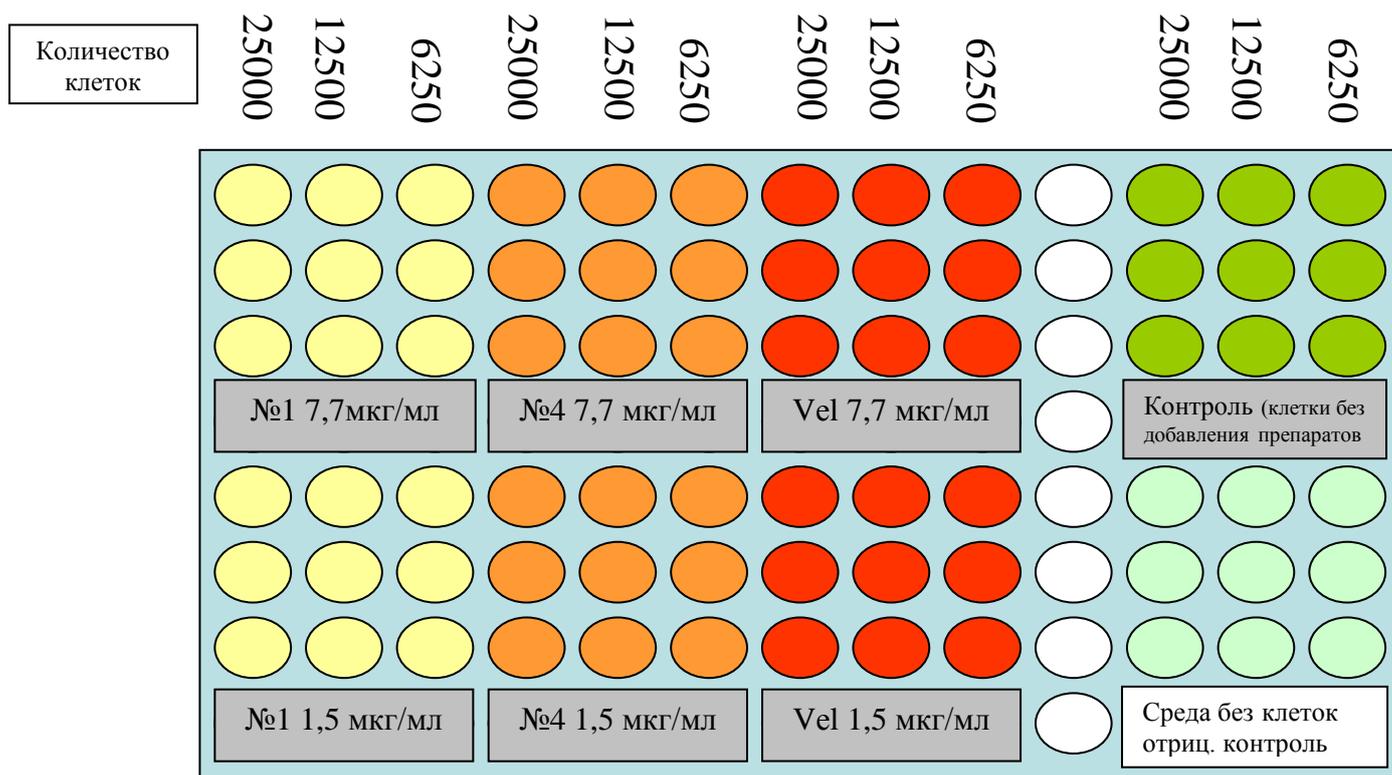


Рисунок 1 - Схематическое изображение 96 луночного планшета с порядком расположения исследуемых образцов

Еще через 24 часа в лунки добавляли по 20мкл МТТ (Sigma, Germany) (конц. 5мг/мл). После чего инкубировали 4ч. в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37<sup>0</sup>С. Затем отбирали среду и добавляли 100мкл изопропанола в каждую лунку. Инкубировали 5 мин при комнатной температуре и, используя микропланшетный фотометр Anthos 2020 (Biochrom, UK), измеряли оптическую плотность при 550 нм и рефренсной длине волны 620нм.

Результатом проведения МТТ-теста является получение значения оптической плотности раствора фармазана в лунках с исследуемыми препаратами и контролями. Это значение позволяет оценить цитотоксический эффект, вызываемый в культуре клеток фармакологическими соединениями. В работе относительное среднее значение (по трем точкам) оптической плотности образца высчитывали по формуле ( $X = o.d.550nm \text{ образца} - o.d.620nm \text{ образца} - \text{среднее значение оптической плотности отрицательного контроля}$ ). Затем для удобства подсчитывали, насколько в процентном отношении относительное среднее значение оптической плотности образца меньше чем относительное среднее значение оптической плотности контроля (клетки без добавления препаратов). Это позволило оценить процент погибших клеток. Полученные данные представлены в таблицах 2 и 3 и на рисунке 2.

Таблица 2 - Результаты МТТ-теста при концентрации препаратов 7,7мкг/мл

<b>25000 клеток/лунку</b>			
Вещество	№1	№4	Vel
Среднее уменьшение значения относительной оптической плотности в процентах относительно контроля (процент погибших клеток)			
День 1	44	35	25
День 3	45	35	46
День 7	49	45	44
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>46</b>	<b>38,33</b>	<b>38,33</b>
<b>12500 клеток/лунку</b>			
День 1	88,5	16	34
День 3	73	16	42
День 7	71	58	49
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>77,5</b>	<b>30</b>	<b>41,67</b>
<b>6250 клеток/лунку</b>			
День 1	100	53	55
День 3	100	14	18
День 7	81	59	46
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>93,67</b>	<b>42</b>	<b>39,67</b>
<b>Эффект препаратов</b>			
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам			
<b>25000 клеток/лунку</b>	<b>46</b>	<b>38,33</b>	<b>38,33</b>
<b>12500 клеток/лунку</b>	<b>77,5</b>	<b>30</b>	<b>41,67</b>
<b>6250 клеток/лунку</b>	<b>93,67</b>	<b>42</b>	<b>39,67</b>
<b>Среднее значение</b>	<b>72,39</b>	<b>36,78</b>	<b>39,89</b>

Таблица 3 - Результаты МТТ-теста при концентрации препаратов 1,5 мкг/мл

<b>25000 клеток/лунку</b>			
Вещество	№1	№4	Vel
Среднее уменьшение значения относительной оптической плотности в процентах относительно контроля (процент погибших клеток)			
День 1	22	30	11
День 3	26	26	17
День 7	31	30	38
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>26,33</b>	<b>28,67</b>	<b>22</b>

<b>12500 клеток/лунку</b>			
День 1	8	9	5
День 3	16	11	13
День 7	30	28	47
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>21,67</b>
<b>6250 клеток/лунку</b>			
День 1	29	23	31
День 3	0	0	36
День 7	37	24	50
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам	<b>22</b>	<b>15,66667</b>	<b>39</b>
<b>Эффект препаратов</b>			
Среднее снижение относительной оптической плотности по трем точкам			
<b>25000 клеток/лунку</b>	<b>26,33</b>	<b>28,67</b>	<b>22</b>
<b>12500 клеток/лунку</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>21,67</b>
<b>6250 клеток/лунку</b>	<b>22</b>	<b>15,67</b>	<b>39</b>
<b>Среднее значение</b>	<b>22,11</b>	<b>20,11</b>	<b>27,56</b>

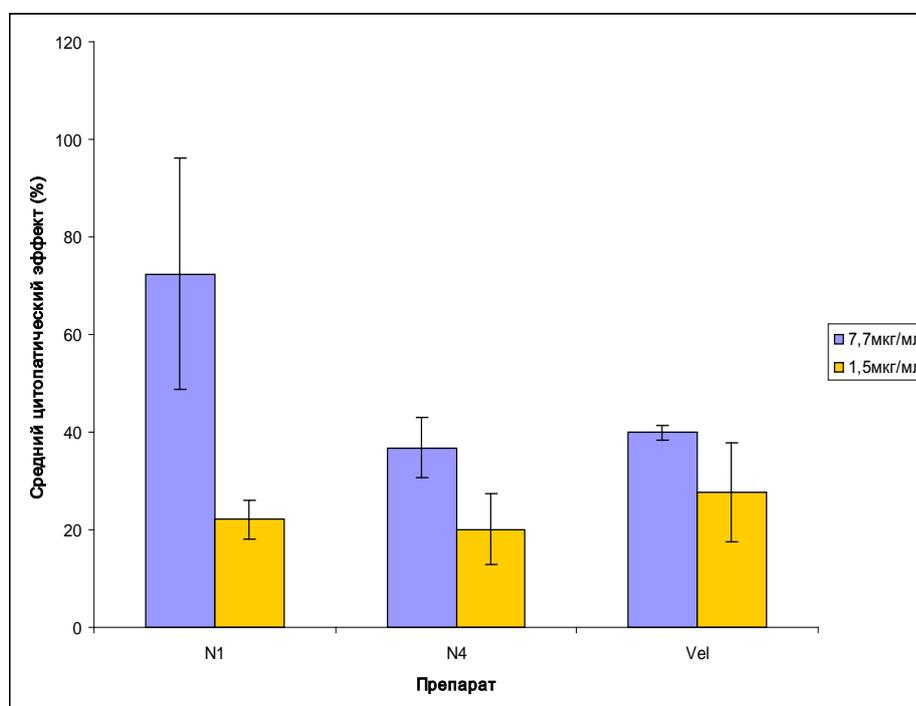


Рисунок 2 - Результаты МТТ-теста. Указан средний цитотоксический эффект препаратов №1, №4 и VELCADE® (bortezomib). Эффект рассчитывался в зависимости от концентрации вещества (7,7 и 1,5 мкг/мл) и усреднялся по трем дням и по действию на разное количество клеток. Показано среднееквадратическое отклонение.

Результаты проведенного исследования (МТТ-тест) указывают на то, что при использовании композиции №1 (концентрация 7,7мкг/мл) наблюдается цитотоксический эффект, превосходящий по силе действие аналогичной концентрации VELCADE® (bortezomib) практически в два раза. При концентрации 1,5мкг/мл эффекты, вызываемые композициями №1, №4 и VELCADE® (bortezomib), оказались сопоставимыми. Цитотоксический эффект, индуцируемый VELCADE® и, в частности, его действующим компонентом bortezomib, связан с ингибированием протеасом в клетках и направлением их в апоптоз [4]. Учитывая выраженное цитотоксическое действие, вызываемое композициями №1 и №4, и существенное уменьшение количества bortezomib в их составе по сравнению с VELCADE®, представлялось важным оценить эффект ингибирования активности протеасом препаратами №1 и №4.

## **2.2 Оценка эффективности подавления активности протеасом композициями №1 и №4**

Протеасома - мультисубъединичный белковый комплекс, играющий принципиальную роль в процессе деградации внутриклеточных белков. В протеасоме осуществляется прямой гидролиз белковых субстратов. Протеасома обладает тремя протеолитическими активностями: химотрипсинподобной, трипсинподобной и постглутамилгидролазной (каспазаподобной). В ходе изучения механизма действия композиций №1, №4 в сравнении с VELCADE® определяли химотрипсинподобную протеолитическую активность протеасом, поскольку действие бортезомиба, входящего в состав всех трех лекарственных средств, более специфично по отношению именно к этой активности.

Для изучения химотрипсинподобной активности протеасом была использована клеточная линия НЕК 293 Т, на которой предварительно был показан цитотоксический эффект композиций №1, №4. Клетки культивировали в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PanEco, Russia), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Hi clone, USA), 2мМ L-Глютамина (PanEco, Russia) и антибиотики (Пенициллин/стрептомицин) при 37<sup>0</sup>С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки пассировали 1:3, 1:5, 1:8 каждый раз, когда они образовывали монослой. Клетки культивировали в 25 см<sup>2</sup> и 75 см<sup>2</sup> флаконах (Nunc, Danemark). После того, как клетки образовывали монослой, культуральную жидкость удаляли, затем клетки промывали фосфатным буфером (ФБ) (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.0115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) и с помощью резинового скребка снимали с подложки. Клетки собирали в стерильные пробирки, центрифугировали в течение 2 мин при 300g, после чего удаляли надосадочную жидкость.

Затем получали осветленные гомогенаты по методу, разработанному ранее [5]. После чего осветленный гомогенат, содержащий протеасомы инкубировали с композициями №1, №4 и VELCADE® и определяли химотрипсинподобную активность протеасом по гидролизу коммерческого флуорогенного субстрата N-succinyl-leu-leu-val-tyr-AMC (Sigma, USA) с использованием специфического ингибитора активных центров протеасом, MG132 (Sigma, USA), и выражали в единицах шкалы флуориметра [6]. Основываясь на результатах МТТ-теста, в первую очередь были исследованы препараты №1, №4 и VELCADE® в концентрации 7,7 мкг/мл. Было показано, что препарат VELCADE® в концентрации 7,7 мкг/мл приводит к 97% ингибированию химотрипсинподобной активности протеасом, в то же время композиция №1 подавляет активность протеасом на 94,5%, а №4 – на 88% (Рисунок 3).

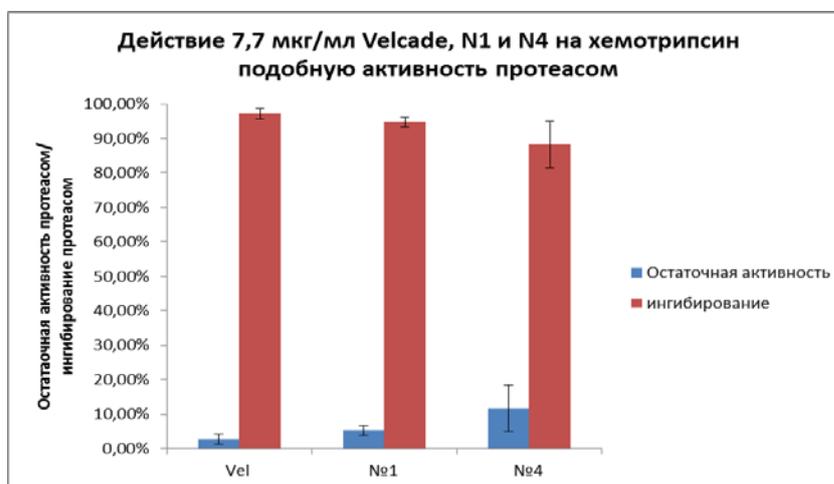


Рисунок 3 - Влияние композиций №1, №4 и VELCADE® на химотрипсинподобную активность протеасом

На следующем этапе работы проводились эксперименты по выявлению вклада вещества bortezomib в составе композиций №1 и №4 в наблюдаемый эффект ингибирования химотрипсинподобной активности протеасом. Для этого, препарат VELCADE® разводили так, чтобы концентрация bortezomib в нем соответствовала концентрации bortezomib в исследуемых композициях. Кроме того, было оценено влияние на активность протеасом дополнительного компонента композиций №1 и №4 вещества ДМНСН (Рисунок 4).

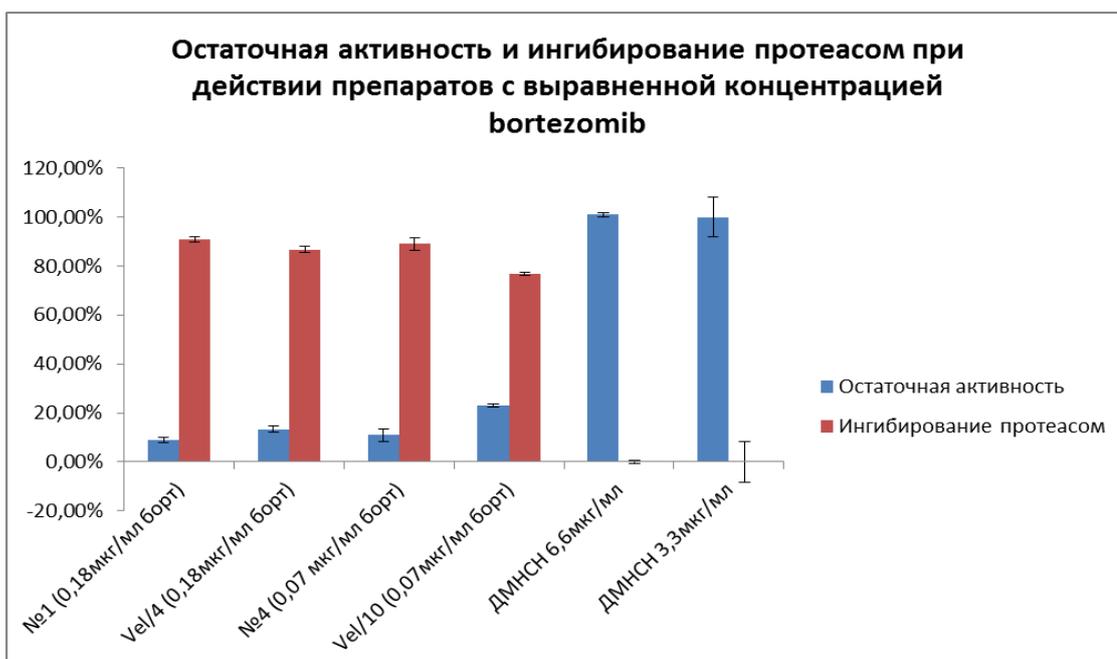


Рисунок 4 - Влияние препаратов №1, №4, вещества ДМНСН и VELCADE® с выравненной концентрацией действующего вещества bortezomib на химотрипсинподобную активность протеасом

Было выявлено, что при одинаковых концентрациях bortezomib в композициях №1, №4 и VELCADE® композиции №1 и №4 эффективнее подавляют химотрипсинподобную протеолитическую активность протеасом, чем VELCADE®. Так, при инкубации протеасом с препаратом №1 (концентрация bortezomib 0,18 мкг/мл) подавление активности составляло 91%, при разведении препарата VELCADE® до такой же концентрации действующего вещества, наблюдалось подавление химотрипсинподобной активности на 87%. При использовании композиции №4 (концентрация bortezomib 0,07 мкг/мл) протеолитическая активность протеасом снижалась на 89%, в то время как использование разведенного препарата VELCADE® приводило к подавлению активности на 77%. Важно отметить, что в отдельности ДМНСН на химотрипсинподобную активность протеасом влияния не оказывал (Рисунок 4). Существенно более значимыми были различия в эффективности подавления активности протеасом препаратами №1, №4 и VELCADE® при разведении смесей до концентрации действующего вещества bortezomib 0,023 мкг/мл. Так, применение препарата VELCADE® обеспечивало снижение химотрипсинподобной активности в среднем на 57%, в то время как композиции №1 и №4 – на 79,5% и 79% соответственно (Рисунок 5).

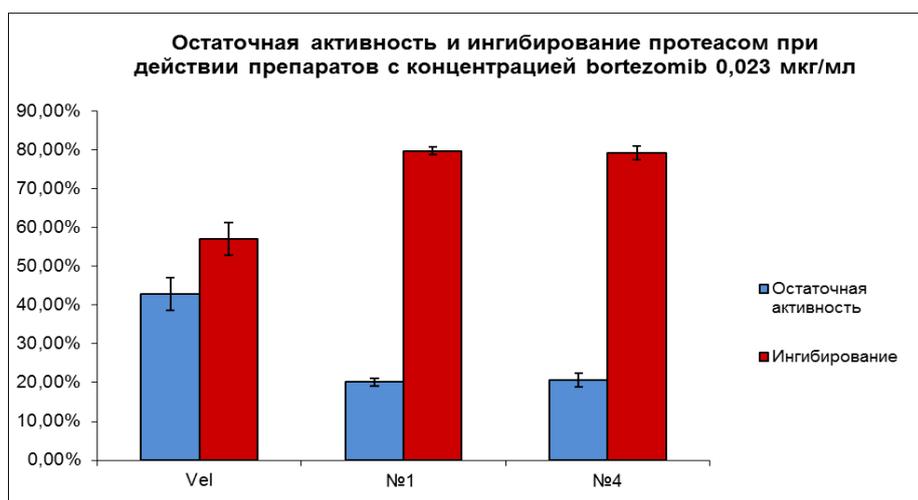


Рисунок 5 - Влияние препаратов №1, №4 и VELCADE® с выравненной концентрацией действующего вещества bortezomib (конц. 0,023мкг/мл) на химотрипсинподобную активность протеасом

На основе полученных экспериментальных данных были построены кривые зависимости эффективности ингибирования протеасом от концентрации действующего вещества bortezomib в композициях (Рисунок 6).

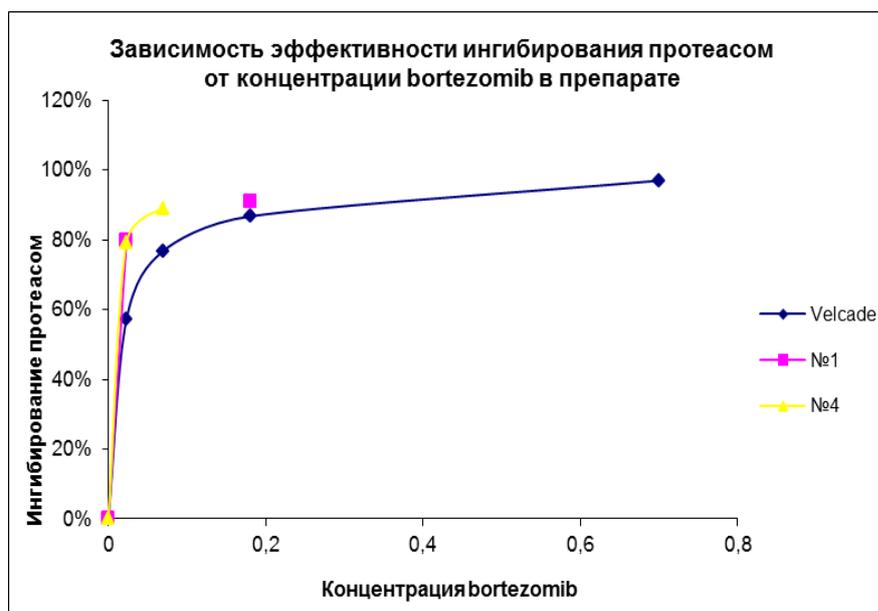


Рисунок 6 - Зависимости эффективности ингибирования протеасом от концентрации действующего вещества bortezomib в композициях

Кроме того, на основании экспериментальных данных был рассчитан условный «Коэффициент эффективности препаратов». Коэффициент эффективности определяли по показателям ингибирования и остаточной активности протеасом. Вычисленный коэффициент отражал, насколько эффективно действуют композиции №1 или №4 по

сравнению с коммерческим VELCADE<sup>®</sup>, поэтому значение коэффициента эффективности для VELCADE<sup>®</sup> было принято за единицу.

Коэффициент эффективности, рассчитанный по ингибированию протеасом, вычисляли как среднее значение (по 2 точкам) частного процентного значения ингибирования протеасом после действия (№1 или №4) и процентного значения ингибирования протеасом после инкубации с VELCADE<sup>®</sup>. Концентрации bortezomib в препаратах VELCADE<sup>®</sup>, №1 или №4 выравняли. Сравнения проводили между VELCADE<sup>®</sup> и №1, при концентрации bortezomib 0,18 и 0,023 мкг/мл, а также VELCADE<sup>®</sup> и №4, при концентрации bortezomib 0,07 и 0,023 мкг/мл (Рисунок 7).

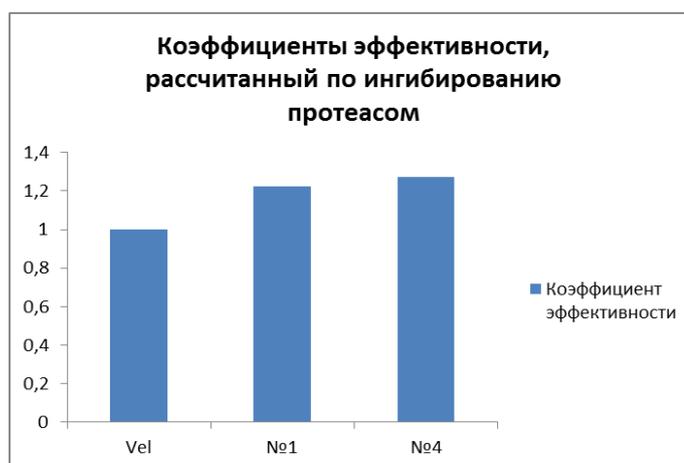


Рисунок 7 - Коэффициенты эффективности, рассчитанные по эффективности ингибирования протеасом исследуемыми препаратами

Коэффициент эффективности, рассчитанный по показателям остаточной активности, вычисляли как среднее значение (по 2 точкам) частного процентного значения остаточной активности протеасом после действия VELCADE<sup>®</sup> и процентного значения остаточной активности протеасом после инкубации с композициями (№1 или №4). Концентрации bortezomib в препаратах VELCADE<sup>®</sup>, №1 или №4 выравняли. Сравнения проводили между VELCADE<sup>®</sup> и №1, при концентрации bortezomib 0,18 и 0,023 мкг/мл, а также VELCADE<sup>®</sup> и №4, при концентрации bortezomib 0,07 и 0,023 мкг/мл в препарате (Рисунок 8).

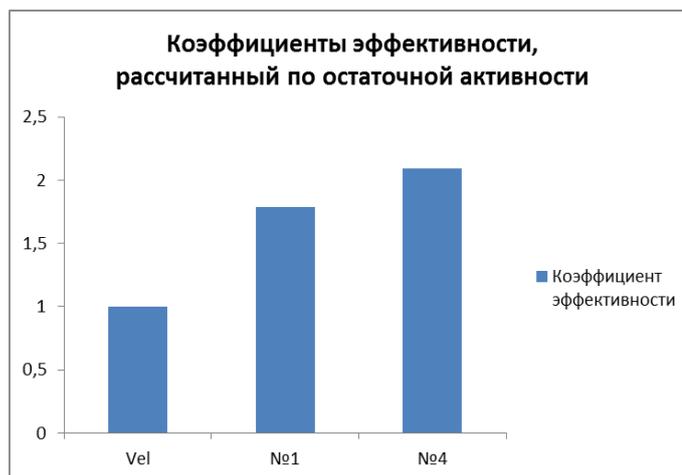


Рисунок 8 - Коэффициент эффективности препаратов №1 и №4, рассчитанные по остаточной активности протеасом

Изучение свойств композиций №1 или №4 *in vitro* выявило синергетическое действие bortezomib и вещества ДМНСН - основных компонентов смесей. Было показано, что исследуемые препараты эффективно подавляют химотрипсинподобную протеолитическую активность протеасом. Более того, эффект 80% подавления активности протеасом композициями №1 и №4 достигался при концентрациях действующего вещества bortezomib меньших в 4 и 10 раз соответственно, по сравнению с VELCADE®.

Таким образом, более выраженный противоопухолевый эффект *in vitro* композиции №1 по сравнению с VELCADE® и сравнимый с VELCADE® противоопухолевый эффект композиции №4, при более низком содержании бортезомиба в обеих композициях по сравнению с VELCADE®, можно объяснить синергетическим действием бортезомиба и ДМНСН на химотрипсинподобную активность протеасом.

### 3. Обоснование выбора перевиваемых штаммов злокачественных опухолей для исследования противоопухолевых эффектов композиций *in vivo*

#### 3.1. Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в Российской Федерации

В соответствии со статистикой Минздрава РФ, наиболее значимыми в РФ по показателю увеличения числа больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования с 1992 г. по 2011 г. являются опухоли молочной железы (увеличение числа больных на 66%), опухоли прямой кишки (увеличение числа больных на 55%), опухоли лимфатической и кроветворной ткани (увеличение числа больных на 43%) при общем увеличении числа больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования на 35%. При этом наиболее часто встречающимся онкологическим заболеванием с 1995 г. является рак молочной железы (Таблица 4).

Таблица 4 - Злокачественные новообразования в Российской Федерации («Социально значимые заболевания населения России в 2011 году», статистические материалы, Министерство здравоохранения Российской Федерации)

Годы	Число больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования					
	Абсолютные числа	На 100 000 населения				
		Всего	в том числе опухоли:			
			пищевода	желудка	прямой кишки	трахеи, бронхов, легкого
1992	402899	271.6	6.4	38.4	11.6	47.0
1993	409312	276.0	6.2	37.2	12.2	47.3
1994	411848	279.3	6.0	36.2	12.3	46.8
1995	412460	279.1	5.6	35.5	12.5	44.7
1996	422050	288.0	5.7	35.4	12.9	44.8
1997	430635	294.7	5.6	35.0	13.3	44.9
1998	440721	302.0	5.5	34.7	13.9	44.4
1999	441438	304.1	5.4	33.6	14.3	43.5
2000	447816	309.9	5.2	33.3	14.8	43.6
2001	451299	313.9	5.2	32.6	14.9	43.1
2002	453256	317.2	5.0	32.4	15.7	42.2
2003	455375	317.4	5.2	31.4	15.7	41.0
2004	468029	328.0	5.1	31.0	16.0	41.4
2005	469195	330.5	5.0	30.6	16.6	40.6
2006	475432	333.7	4.6	29.4	16.6	40.1
2007	485387	341.5	5.0	29.5	16.8	40.2
2008	490734	345.7	5.0	28.6	16.9	40.0
2009	504975	355.8	5.0	28.4	17.6	40.2
2010	516874	363.0	5.2	27.9	17.9	40.0
2011	522410	365.7	5.2	26.8	18.0	39.2

(продолжение)

Годы	Число больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования (на 100 000 населения)			Число больных, состоящих под диспансерным наблюдением на конец отчетного года – всего		Индекс накопления (соотношение состоящих на учете на конец отчетного года к числу взятых на учет в отчетном году)
	в том числе опухоли:			абсолютные числа	на 100 000 населения	
	молочной железы у женщин <sup>1)</sup>	шейки матки <sup>1)</sup>	Лимфатической и кроветворной			
1992	45.3	15.2	11.9	1738183	1172.0	4.5
1993	45.8	14.9	11.8	1788944	1206.3	4.5
1994	47.2	15.2	12.2	1822739	1236.0	4.6
1995	48.0	15.1	12.3	1869957	1266.8	4.6
1996	50.0	15.1	12.9	1913858	1307.9	4.7
1997	52.0	15.2	12.9	1969787	1349.7	4.8
1998	55.1	15.4	13.1	2005743	1378.1	4.7
1999	57.7	15.8	13.3	2039762	1408.8	4.8
2000	58.3	16.0	13.7	2097805	1454.7	4.9
2001	59.0	15.9	13.7	2164770	1501.1	5.0
2002	60.2	16.1	14.4	2212869	1553.2	5.1
2003	60.3	16.0	14.5	2262278	1581.5	5.2
2004	64.4	16.6	15.3	2319740	1629.8	5.2
2005	65.1	17.0	15.5	2386766	1685.7	5.4
2006	65.7	17.3	15.7	2466276	1734.1	5.5
2007	67.9	17.6	16.1	2535114	1785.2	5.6
2008	68.8	18.1	16.6	2607223	1837.3	5.7
2009	71.2	18.8	17.2	2691985	1897.0	5.7
2010	74.8	19.2	17.2	2794189	1955.8	5.8
2011	75.3	19.3	17.0	2900629	2030.3	6.0

1) Показатель рассчитан на женское население

### 3.2 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в Великобритании

По данным статистики Общества онкологов Великобритании, в этой стране так же, как и в России, наиболее часто встречающимся среди онкологических заболеваний является рак молочной железы (<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/incidence/commoncancers/>). По увеличению числа случаев заболевания в период 2008-2010 г.г. по сравнению с периодом 1999-2001 г.г. среди мужской части населения Великобритании первое место занимает меланома кожи и второе место – рак печени (гепатоклеточная карцинома). Эти онкологические заболевания по данному показателю занимают второе и третье место, соответственно, среди женской части населения Великобритании.

### 3.3 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в США

По данным статистического анализа онкологических заболеваний в США, наиболее часто встречающимися заболеваниями является рак кожи и рак молочной

железы (Cancer Facts & Figures 2013). Скорость роста числа заболеваний раком молочной железы в США составляет 2,8% в год с 2005 г. по 2009 г. Таким же значением характеризуется скорость роста числа заболеваний меланомой кожи среди белого населения США. Еще большей скоростью роста числа заболеваний в США с 2005 г. по 2009 г. характеризуется рак печени (гепатоклеточная карцинома) – 3,7% в год среди мужской части населения и 3,0% в год среди женской части населения.

### **3.4 Заболеваемость злокачественными новообразованиями у населения в различных регионах мира**

На рисунке 9 приведена информация по различным онкологическим заболеваниям, наиболее часто фиксированным в 2008 г. среди населения всех регионов мира. Как видно из рисунка, все указанные выше онкологические заболевания, быстро распространяющиеся в России, Великобритании или США, входят в четверку наиболее часто встречающихся в том или ином регионе мира. Так, рак молочной железы входит в этот список во всех регионах мира, кроме региона Восточной Азии. В список четырех наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний в регионе Восточной Азии, а также в регионах Юго-Восточной Азии, Центральной Африки, Западной Африки входит рак печени. Меланома входит в этот список, составленный для Австралии и Новой Зеландии. Рак толстой и прямой кишки входит в список четырех наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний в Северной Америке, Карибском регионе, Южной Америке, во всех регионах Европы, Западной, Восточной и Юго-Восточной Азии, Австралии и Новой Зеландии. Онкологические заболевания лимфатической кровеносной ткани наиболее распространены в регионе Северной Африки.

# Cancer Incidence Worldwide

Breakdown of the estimated 12.7 million new cases, World-age standardised incidence rates and the most commonly diagnosed cancers by the different regions of the world, 2008.

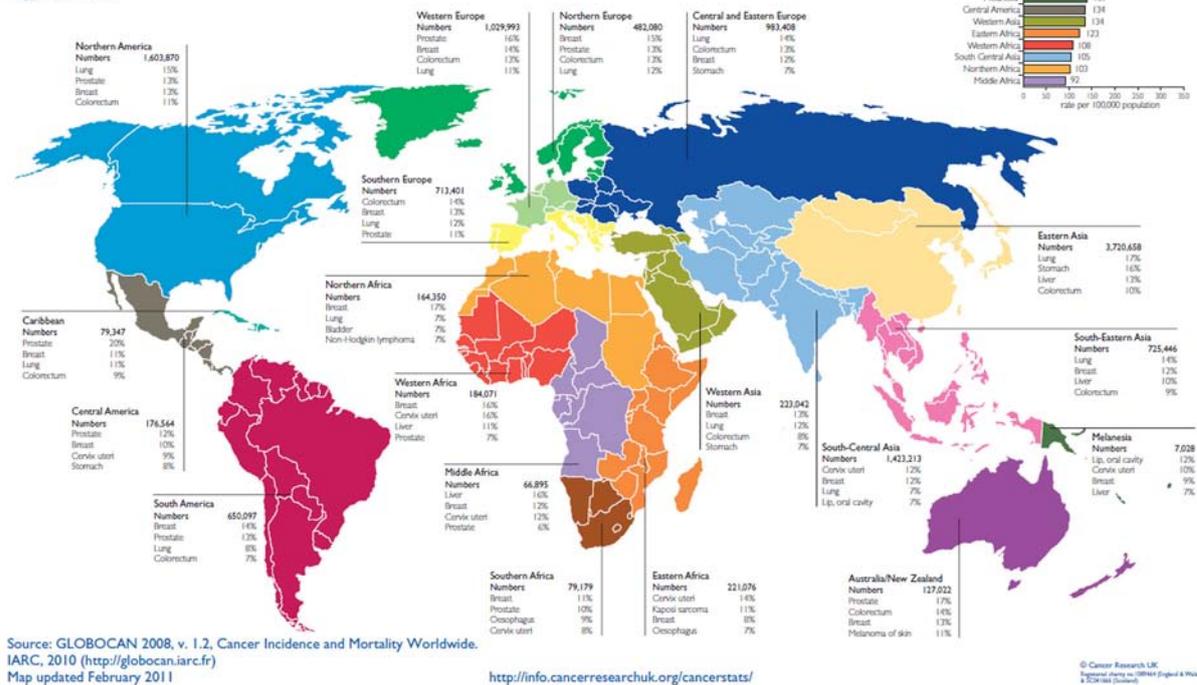


Рисунок 9 - Схема распространения онкологических заболеваний в мире в 2008 году

### 3.5 Разработка плана исследований композиций *in vivo*

Итак, к числу наиболее распространенных и/или быстро развивающихся злокачественных опухолей в России и других регионах мира относится рак молочной железы, меланома кожи, рак печени, рак лимфатической и кроветворной ткани, рак толстой и прямой кишки.

В связи с этой информацией запланировано проверить эффективность двух композиций нового препарата для лечения наиболее распространенных и/или быстро развивающихся злокачественных опухолей: рака молочной железы, меланомы кожи, рака печени, рака лимфатической и кроветворной ткани, рака толстой и прямой кишки.

Для решения этой задачи были выбраны клеточные линии, доступные для анализа, с целью создания моделей *in vivo*:

- 1) аденокарцинома молочной железы 755 (Ca 755) (рак молочной железы);
- 2) меланома В-16 (меланома кожи);
- 3) гепатоклеточная карцинома Нера 1-6 (рак печени);
- 4) гомоцитобластоз La (рак лимфатической и кроветворной ткани);
- 5) лимфоидная лейкемия L1210, лимфоцитарная лейкемия P-388 ((рак лимфатической и кроветворной ткани);

6) плазмоцитома МОРС-406 (рак лимфатической и кроветворной ткани);

7) аденокарцинома толстого кишечника АКАТОЛ (рак толстой кишки).

На отчетном этапе выполнения работ по Госконтракту запланированы доклинические испытания новых лекарственных композиций противоопухолевого действия при использовании первых четырех штаммов из приведенного списка.

### **3.5.1 Модели перевиваемых штаммов гомецитобластога La, Ca 755, меланомы B-16**

Штаммы трех перевиваемых опухолей, аденокарциномы молочной железы 755 (Ca 755), меланомы B-16, гомецитобластога La, получены из Онкологического научного центра им. Н.И. Блохина (ФГБУ «РОНЦ им. Н.И. Блохина РАМН НИИ ЭД и ТО»; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24).

Работа с этими штаммами стандартна и заключается в прививке опухолей мышам линии C<sub>57</sub>Bl/6 по следующим схемам:

- введение самцам  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  клеток опухоли гомецитобластоз La внутривентриально, начало лечения через 24 часа после прививки опухоли;

- введение самкам мышей 0,3 мл суспензии клеток опухоли Ca 755, приготовленной на среде «Игла» или среде 199 (клетки, полученные после гомогенизирования 1 г опухоли в 10 мл среды), подкожно; начало лечения через 48 часов после прививки опухоли;

- введение самцам мышей 0,3 мл суспензии клеток опухоли меланомы B-16, приготовленной на среде «Игла» или среде 199 (клетки, полученные после гомогенизирования 1 г опухоли в 10 мл среды), подкожно; начало лечения через 48 часов после прививки опухоли.

Вместе с тем, в России не было модели перевиваемой гепатоцеллюлярной карциномы. Поэтому в число задач входило получение модели перевиваемой гепатоцеллюлярной карциномы, пригодной для исследования эффектов противоопухолевых препаратов.

### **3.5.2 Получение модели перевиваемой гепатоцеллюлярной (гепатоклеточной) карциномы**

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) - наиболее распространенная первичная злокачественная опухоль печени. ГЦК образуется из гепатоцитов, может расти в виде одиночного или множественных узлов, а также быть инфильтративной и метастазировать в другие органы, например, в легкие. Количество новых диагностируемых случаев ГЦК непрерывно растет, как среди мужчин, так и среди женщин [7]. На данный момент

ежегодно выявляется порядка 523000 новых случаев ГЦК у мужчин (5-ое место по частоте развития среди других форм рака), у женщин - 226000 (7-ое место по частоте развития среди других форм рака) [8]. ГЦК занимает 3 место в списке основных причин смерти от онкозаболеваний [9]. Смертность от ГЦК в мире достигает 662000 человек в год [10]. Таким образом, ГЦК является одной из самых агрессивных опухолей. К современным методам лечения ГЦК относятся: резекция, трансплантация печени, трансартериальная химиоэмболизация, гормональная терапия, криохирургия. К сожалению, ни один из вышеупомянутых методов не является достаточно эффективным, особенно на поздних стадиях заболевания. В этой связи, выявление новых подходов для лечения больных остается крайне актуальным.

Важно отметить, что создаваемые препараты перед испытаниями на людях необходимо изучить на животных моделях. Нами впервые в России разработана подходящая животная модель развития ГЦК.

Для создания мышинной модели развития ГЦК была использована клеточная линия Нера 1-6 - эпителиальных клеток гепатомы мыши (Рис. 10). Клетки культивировали в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (PanEco, Russia), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Hi clone, USA), 2мМ Л-Глютамина (PanEco, Russia) и антибиотики (Пенициллин/стрептомицин) при 37<sup>0</sup>С, 5% СО<sub>2</sub> и 95% влажности. Клетки пассировали 1:3, 1:5, 1:8 каждый раз, когда они образовывали монослой. Клетки культивировали в 25 см<sup>2</sup> и 75 см<sup>2</sup> флаконах (Nunc, Danemark).

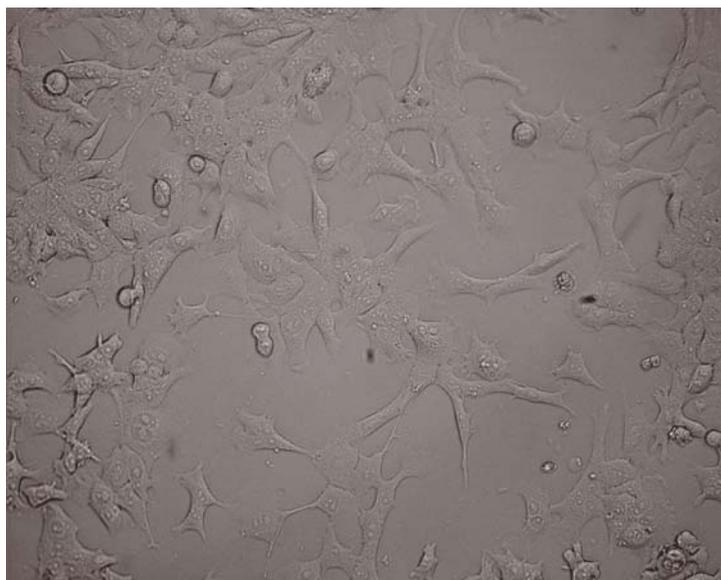


Рисунок 10 - Клетки Нера1-6 при 20-кратном увеличении.

Перед тем как вводить клетки животным все использованные растворы, а также клетки разных пассажей тестировали на наличие различных видов микоплазм.

Для выявления бактериальной контаминации использовали метод, предложенный R. Harasawa [11]. Суть которого сводится к постановке вложенной ПЦР используя набор олигонуклеотидов:

**F1** 5'ACACCATGGGAG(CT)TGGTAAT3'

**R1** 5'CTTC(AT)TCGACTT(CT)CAGACCCAAGGCAT3'

**F2** 5'(GTG(C/G)GG(A/C)TGGATCACCTCCT)3'

**R2** 5'GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)CTT3'

В результате ПЦР анализа контаминация образцов выявлена не была (Рис. 11)

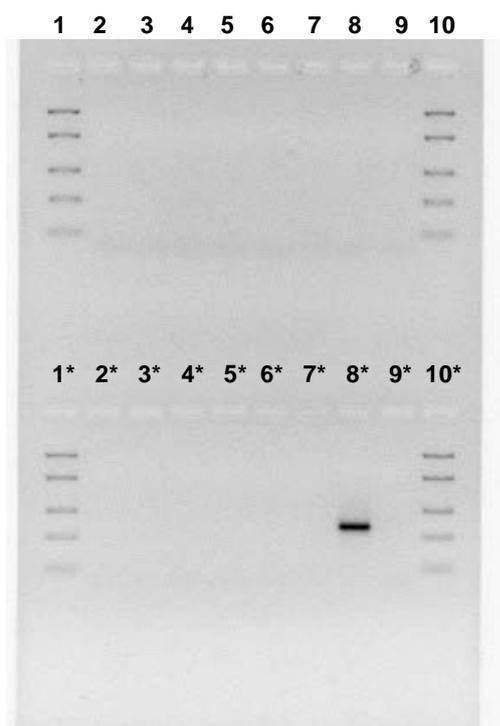


Рисунок 11 - ПЦР анализ контаминации образцов реактивов и клеток различными видами микоплазм. После окончания двух раундов ПЦР анализ результатов проводили в 2% агарозном геле. Дорожки: 1,10 – Low Range DNA Ladder Fermentas, 2,8,9 – отрицательные и положительные контроли, 3 – среда DMEM без сыворотки, 4 - среда DMEM с сывороткой, 5 – термоинактивированный раствор трипсина/ЭДТА, 6 - культуральная жидкость клеток Нера 1-6 пассаж 14, культуральная жидкость клеток Нера 1-6 пассаж 10. \*-указывает на второй раунд вложенной ПЦР.

На следующем этапе в клетках Нера 1-6 различных пассажей методом Вестерн блоттинга оценивали накопление маркерного белка гепатокарциномы – Альфа-фетопротеина (АФП).

Для этого сначала, через 48 часов после пересева клетки Нера1-6 отмывали 3 раза фосфатным буфером (ФБ) (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.0115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5). Затем клетки снимали с помощью одноразового резинового скрепера (Falcon, USA), переносили в стерильную пластиковую пробирку и дополнительно отмывали еще 2 раза ФБ. Клетки лизировали 10 мин на льду лизирующим буфером (50

мМ Трис-НСl, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 5мМ ЭДТА), содержащим ингибитор протеолиза Complete (Roche, Germany), после чего пробирки центрифугировали 10000 об/мин 10 мин, собирали супернатанты. Лизаты хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . После чего лизаты клеток анализировали в денатурирующем градиентном 4–20% Трис-глицин полиакриламидном геле (ДСН ПААГ) Invitrogen Novex Tris-Glycine Gel (Invitrogen, USA), используя Tris-Glycine Sample Buffer (Invitrogen, USA) и Tris-Glycine Running Buffer (Invitrogen, USA) согласно протоколу производителя. В каждую лунку наносили по 30мкг тотального белка.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, USA) осуществляли методом жидкого переноса используя Tris-Glycine Transfer Buffer (Invitrogen, USA) содержащий 20% метанола. Эффективность переноса была оценена с помощью окраски мембраны 0.1% раствором Ponceau Rouge (Sigma-Aldrich, Germany). Мембраны инкубировали с поликлональными антителами кролика против АФП (Abcam, USA) в течение 1 час 30 мин. Затем мембраны отмывали, после чего инкубировали с антителами козы против IgG кролика, конъюгированными пероксидазой хрена (Dako, Denmark). Блоты проявляли с помощью набора ECL (GE Healthcare, UK). В результате была показан эффективный синтез АФП клетками Нера 1-6 различных пассажей (Рис.12).

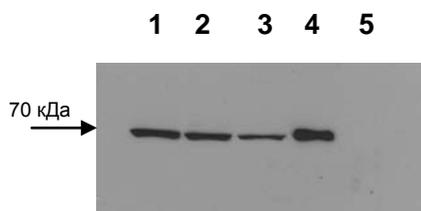


Рисунок 12 - Вестерн блот анализ экспрессии АФП клетками Нера 1-6 разных пассажей. Дорожки 1: лизат клеток Нера 1-6 пассаж 1, 2 – пассаж 11, 3 – пассаж 15, 4- положительный контроль (лизат клеток НЕК293Т, трансфицированных вектором экспрессирующим АФП), 5 – отрицательный контроль(лизат клеток НЕК293Т). Мембрана окрашена антителами кролика против АФП и вторичными антителами козы против IgG кролика меченными пероксидазой хрена. Нормировка проводилась перед нанесением образцов в ПААГ.

На следующем этапе для получения опухолей у мышей клетки Нера 1-6 перед введением животным снимали со дна флакона с помощью раствора трипсина/ЭДТА, а затем отмывали 4 раза фосфатным буфером (ФБ) (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.0115%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7.5). После заключительной отмывки к клеткам добавляли ФБ, затем суспензию, содержащую клетки, вводили мышам линии C57Bl/6 подкожно в область холки по 100мкл/в животное.

В ходе создания перевиваемой модели опухоли, был поставлен ряд оптимизирующих экспериментов.

*Определение оптимального количества клеток Нера 1-6, вводимых мышам*

На основе литературных данных для инъекции животным были выбраны три различные концентрации клеток:  $2 \cdot 10^4$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $4 \cdot 10^6$  [12-14]. В эксперименте были использованы 12 самцов линии С57В1/6. Животные были разделены на три группы по 4 особи в каждой. Мышам каждой группы вводили подкожно в область холки  $2 \cdot 10^4$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $4 \cdot 10^6$  клеток Нера 1-6 соответственно. На 35 день после перевивки клеток мышей осматривали. Результаты эксперимента сведены в табл. 5. Из таблицы видно, что в группе  $2 \cdot 10^4$  опухоль не развилась ни у одной из четырех мышей; в группе  $2 \cdot 10^5$  – у трех из четырех мышей; в группе  $4 \cdot 10^6$  – у двух из четырех мышей. Таким образом, наиболее эффективной концентрацией для инъекции является  $2 \cdot 10^5$  и, в последующих экспериментах для перевивки животным использовали именно такое количество клеток.

Таблица 5 - Результаты эксперимента по перевивке различного количества клеток Нера 1-6 мышам.

Перевивка клеток Нера 1-6			
Кол-во клеток	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$
Количество мышей с опухолью на 35 день после перевивки	0/4	<b>3/4</b>	2/4

*Влияние пола животного на подверженность развитию опухоли после перевивки клеток Нера 1-6 и опухолевой ткани*

Для определения того, самцы или самки более склонны к развитию опухолей после перевивки клеток были созданы 4 группы мышей: две группы по пять самок и две группы по пять самцов. Пяти самцам и пяти самкам вводили  $2 \cdot 10^5$  клеток Нера 1-6, а оставшимся животным из обеих групп, вводили  $\sim 2 \cdot 10^5$  опухолевых клеток, полученных после гомогенизации уже образовавшейся (после предварительного введения клеток Нера 1-6) опухоли, взятой у другой мыши.



Рисунок 13 - Внешний вид мыши линии C57Bl/6 с перевитой опухолью.

На 35 день после введения клеток опухоли у одного из пяти самцов, проколотых клетками Нера 1-6, а также у пяти из пяти самцов, которым перевивали гомогенат, были выявлены опухоли (пример, рис.13); только у двух самок из пяти, которым перевивали гомогенат, была обнаружена опухоль; при этом все самки, которым прививались клетки, были совершенно здоровы (табл. 6).

Таблица 6 - Результаты экспериментов по перевивке опухолевых клеток и ткани мышам различного пола.

Пол	♂		♀	
	Клетки	Ткань	Клетки	Ткань
Перевивка $2 \cdot 10^5$				
Количество мышей с опухолью на 35 день после перевивки	1/5	<b>5/5</b>	0/5	2/5

После завершения предварительных оптимизирующих экспериментов была получена модель развития гепатомы у мышей линии C57Bl/6. Было показано, что наиболее эффективно рост ГЦК вызывается прививанием самцам гомогената опухоли другой мыши, выросшей после введения животному клеток Нера1-6 в количестве  $\sim 2 \cdot 10^5$ . Вместе с тем, возможна прививка опухоли и самкам, но с меньшей эффективностью.

На основании проделанной работы предложена следующая схема прививки клеток опухоли Нера 1-6 мышам линии C57Bl/6, самцам или самкам, подкожно: введение 0,2 мл

суспензии опухолевых клеток, приготовленной на физиологическом растворе, среде Игла или среде 199 (клетки, полученные после гомогенизирования 1 г опухоли в 10 мл среды). Начало лечения после достижения размеров опухоли не менее 400 мм<sup>3</sup>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные на данном этапе работы позволили

1) наработать образцы нового лекарственного средства противоопухолевого действия: композиции №1 и композиции №4;

2) осуществить оптимальный выбор штаммов наиболее распространенных и/или быстро развивающихся опухолей в России и других странах мира и провести доклинические испытания действия двух новых противоопухолевых композиций, №1 и №4, на выбранные опухоли, привитые мышам линии С57Bl/6: аденокарциному молочной железы 755 (Ca 755), меланому В-16, гемоцитобластоз La, гепатоклеточную карциному Нера 1-6.

### Важнейшие результаты:

1) Показано уменьшение токсичности новых композиций №1 и №4 по отношению к организму по сравнению с аналогом VELCADE®:

- значения ЛД50 препаратов по готовой лекарственной форме для мышей и для крыс обоего пола в возрастающем ряду располагаются следующим образом: препарат сравнения VELCADE® < композиция №1 < композиция №4;

- значения максимальных доз новых противоопухолевых композиций, не вызывающих во время курса введения гибели как интактных мышей, так и мышей с привитой опухолью, в возрастающем ряду располагаются следующим образом: препарат сравнения VELCADE® < композиция №1 < композиция №4.

2) Выявлено, что новые противоопухолевые композиции №1 и №4 проявляют эффект по отношению к привитым опухолям (аденокарциноме молочной железы 755 (Ca 755), меланоме В-16, гемоцитобластозу La, гепатоклеточной карциноме Нера 1-6), либо соизмеримый с препаратом сравнения VELCADE®, либо превосходящий его в 1,5-2 раза.

Проделанная работа и полученные результаты позволяют сделать заключение о перспективности использования композиции №1 и композиции №4 для клинических испытаний в качестве противоопухолевых препаратов для лечения онкологических заболеваний молочной железы, печени, меланомы кожи и, возможно, других онкологических заболеваний.

## Литература

1. Шарова Н.П., Строева О.Г., Ерохов П.А., Дмитриева С.Б., Усова Т.А. Изменение активности протеасом *in vivo* под влиянием окислительного стресса и пара-аминобензойной кислоты у зародышей вьюна // Докл. РАН. 2007. Т. 415. № 4. С. 562-565.
2. Orłowski RZ and Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade // Clin Cancer Res. 2008. V. 14. № 6. P. 1649-57.
3. Iijima H, Shinzaki S, Takehara T. The importance of vitamins D and K for the bone health and immune function in inflammatory bowel disease // Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2012. V. 15. № 6. P. 635-40.
4. Bonvini P, Zorzi E, Basso G, Rosolen A. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma // Leukemia. 2007 V. 21. № 4. P. 838-42.
5. L.A. Zakharova, I.I. Khagai, N.P. Sharova, et al. Pattern of MHC class I and immune proteasome expression in Walker 256 tumor during growth and regression in Brattleboro rats with the hereditary defect of arginine-vasopressin synthesis // Cell. Immunol. 2011. V. 271. P. 385-391.
6. Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Ya.D., et al. Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development // Cent. Eur. J. Biol. 2011. V.6. P. 486-496.
7. Data were provided by the UK Office for National Statistics on request, June 2012. Similar data can be found here: <http://www.ons.gov.uk/ons/rel/vsob1/cancer-statistics-registrations--england--series-mb1-/index.html>
8. GLOBOCAN 2008 database (version 1.2) <http://globocan.iarc.fr>
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000 // Int J Cancer 2001 V. 94. P.153-156.
10. "Cancer". World Health Organization. February (2006).
11. Harasawa R. PCR: application of nested PCR to detection of Mycoplasmas // Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. 1996 V. 2, pp. 75-79. Edited by S. Razin & J. G. Tully, New York: Academic Press.
12. Tian G., Yi J., Xiong P. Specific cellular immunity and antitumor responses in C57BL/6 mice induced by DNA vaccine encoding murine AFP // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 2004. V. 3. P. 440-443.
13. Lan Y., Li Y., Liang Z., et al. A DNA vaccine against chimeric AFP enhanced by HSP70 suppresses growth of hepatocellular carcinoma // Cancer Immunol. Immunother. 2007. V. 56. P. 1009-1016.

14. Морозов А.В., Морозов В.А., Астахова Т.М. и др. ДНК-вакцина, кодирующая альфа-фетопроtein и деградационный сигнал орнитин декарбоксилазы, существенно замедляет рост перевиваемой гепатоцеллюлярной карциномы у мышей // Мол. Биол. 2012. Т. 46. С. 434-451.