

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ДОЗОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИМЕРНОГО ПЕПТИДА MM-D37K ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ BALB/C NUDE С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ЧЕЛОВЕКА HCT-116

Е.М. Уханова¹, Т.М. Кулинич², Е.А. Кудинова², В.К. Боженко²,
С.М. Ситдикова¹, М.С. Калишьян¹, Е.М. Трещалина¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. В рамках конструирования молекул с патогенетической направленностью к опухолевой клетке создан ряд химерных пептидов, включающих функциональный фрагмент с аминокислотной последовательностью из группы SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 и транспортную последовательность. Эти пептиды при целевой доставке в клетку способны обнаруживать короткие функциональные домены в белках-регуляторах различных функций. Среди них MM-D37K, блокирующий фазу G1 и индуцирующий апоптоз в клетках опухолей человека, в том числе колоректального рака HCT-116. Этот пептид рассматривается как потенциальный противоопухолевый агент с соответствующими этапами изучения.

Цель исследования – изучение дозовых характеристик MM-D37K при парентеральном введении на подкожных (п/к) ксенографтах колоректального рака человека *in vivo*.

Задачи. 1. Изучение эффективности MM-D37K в диапазоне доз при многократном п/к или внутривенном (в/в) введении мышам Balb/c nude с п/к ксенографтами колоректального рака человека HCT-116. 2. Оценка переносимости MM-D37K при многократном парентеральном введении мышам с HCT-116.

Материалы и методы. Исследования химерного пептида MM-D37K (ингибитор циклинзависимых киназ 4/6) проведены на п/к ксенографтах колоректального рака человека HCT-116 у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при использовании стандартных критериев оценки эффективности и переносимости и адекватной статистической обработке результатов с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Показано, что MM-D37K в разовых дозах 5 или 10 мг/кг при п/к или в/в 5-кратном введении через 48 ч (суммарные дозы 25 или 50 мг/кг соответственно) значимо и достоверно ингибирует рост опухоли в течение 9 дней после окончания лечения на уровне T/C = 27–43 % ($p < 0,05$) (стандартный критерий T/C ≤ 42 %) при удовлетворительной переносимости. При обоих путях введения выявлена слабая дозовая зависимость как по T/C, так и по сроку достижения максимального эффекта при индивидуальной чувствительности к пептиду (вариабельность размеров опухолевых узлов при в/в введении большей дозы).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о достаточной широте терапевтического действия химерного пептида MM-D37K на модели колоректального рака человека HCT-116, позволяющей получить значимый достоверный противоопухолевый эффект при парентеральном многократном применении в 2-кратном диапазоне действующих доз.

Ключевые слова: химерный пептид MM-D37K, колоректальный рак человека, мыши Balb/c nude, эффективность, переносимость

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41

THERAPEUTIC DOSE CHARACTERISTICS OF THE CHIMERIC PEPTIDE OF MM-D37K AT PARENTERAL INTRODUCTION TO THE BALB/C NUDE MICE WITH HUMAN COLORECTAL CARCINOMA HCT-116

E.M. Uchanova¹, T.M. Kulich², E.A. Kudinova², V.K. Bozenko², S.M. Sitdikova¹, M.S. Kalishjan¹, H.M. Treshalina¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

²Russian Scientific Center of Roengenology and Radiology; 86 Profsoyuznaya Str., Moscow 117997, Russia

Introduction. Within constructed of molecules with a pathogenetic orientation to a tumor cell a row the chimeric of the peptides including the functional fragment with the amino-acid sequence from the SEQ ID NO group is created: 1 – SEQ ID NO: 17 and transport sequence. These peptides are capable at target delivery in the cells to find short functional domains in proteins regulators of various functions. Among them there is MM-D37K blocking G1 phase and inducing an apoptosis in the human tumor cells, including a colorectal cancer HCT-116. It is considered as the potential antineoplastic agent with the corresponding stages of studying.

Aim. The aim of the study was an investigation of the MM-D37K dose characteristics at the parenteral administration on the human subcutaneous (s. c.) colorectal cancer xenografts HCT-116.

Research problems. 1. Studying of the efficacy of MM-D37K in the dose range at multiple parenteral administration to the Balb/c nude mice with HCT-116. 2. Tolerance control of MM-D37K at multiple parenteral administration to the Balb/c nude mice with HCT-116.

Materials and methods. Researches of a chimeric peptide MM-D37K (an inhibitor the cyclin-dependent protein kinases 4/6) are conducted on hypodermic s. c. colorectal cancer xenografts HCT-116 at immunodeficient Balb/c nude mice when using reference criteria assessment of efficacy and tolerance under adequate statistical processing of the results with use of nonparametric Mann–Whitney U-test.

Results. It is shown that MM-D37K in single doses of 5 or 10 mg/kg at s. c. or intravenous (i. v.) 5-fold administration in 48 h (total doses 25 or 50 mg/kg) significantly and authentically inhibits the tumor growth within 9 days after the treatment on the level of T/C = 27–43 % ($p < 0.05$) (reference criterion of T/C ≤ 42 %) at a well tolerance. At both routes of administration was observed the dose dependence for efficacy as on T/C and on the maximal effect achievement. There was revealed big deviation of the tumor after the individual sensitivity to a peptide (variability of the tumor size at a larger dose by the i. v. administration).

Conclusion. The obtained data confirm the sufficient therapeutic range of a MM-D37K chimeric peptide in vivo on the model of a human colorectal cancer HCT-116 allowing to obtain significant reliable anticancer effect at parenteral multiple administrations in the double range of therapeutically doses.

Key words: chimeric peptide MM-D37K, human colorectal cancer, mice Balb/c nude, efficacy, tolerance

Введение

В конце XX – начале XXI вв. появились первые экспериментальные исследования ингибиторов циклинзависимых киназ (cyclin-dependent protein kinases – CDK), среди которых наибольший интерес в качестве перспективной мишени для онкологии вызвали специфичные ингибиторы CDK4/6, приводящие к восстановлению контроля клеточного цикла и блокаде пролиферации опухолевых клеток. Утрата контроля клеточного цикла, характерная для злокачественных новообразований, сопряжена с гиперактивацией CDK4/6, что влечет за собой потерю контроля над пролиферацией с инициацией клеточной прогрессии от фазы роста (G1) до фаз, связанных с репликацией ДНК (S) [1–4]. Практическая значимость этих исследований связана с большой частотой (40–60 %) мутаций или гиперметилирования промоторов генов-ингибиторов CDK при злокачественном росте. Дополнительным основанием для поиска технологий применения естественных белковых ингибиторов пролиферации стало открытие коротких последовательностей аминокислот ($n = 15–30$), способных выполнять векторные (транспортные) функции в отношении пептидных последовательностей и соединений другой химической природы (РНК, ДНК). Одним из путей создания ингибиторов CDK стало использование функциональных последовательностей из соответствующих внутриклеточных ингибиторов. Появилась технология пептидных векторов, обладающих способностью проникать в клетки, не повреждая плазматическую мембрану, весьма перспективная ввиду слабой иммуногенности и возможности переноса достаточно крупных молекул. Таким образом, соединение возможности целевой доставки пептидов в клетку и обнаружение коротких функциональных

доменов в белках-регуляторах различных клеточных функций создали предпосылки для конструирования молекул, имеющих патогенетическую направленность. Так были созданы химерные пептиды, включающие функциональный фрагмент с аминокислотной последовательностью из группы SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 и транспортную последовательность [5–10].

Первый препарат палбоциклиб (Ибранса), созданный на основе CDK4/6-специфического ингибитора, показал заметный противоопухолевый эффект в опытах на культурах клеток и исследованиях на животных, особенно по отношению к карциномам люминального типа (ER⁺/HER2⁻). В настоящее время на разных стадиях разработки и клинических испытаний находятся несколько экспериментальных ингибиторов CDK, например, абемациклиб и рибоциклиб. Поскольку спектр их потенциального применения широк, CDK представляются перспективной мишенью для онкологии [11].

В русле этого направления были созданы технологически адекватный оригинальный химерный пептид D37K со свойствами ингибиторов CDK4/6 и его модифицированный аналог MM-D37K, с 2014 г. проходящий клинические испытания у онкологических пациентов в РФ [12]. По данным *in vitro*, благодаря блокированию клеточного цикла в фазе G1 MM-D37K индуцирует апоптоз в клетках различных опухолей человека, в том числе колоректального рака HCT-116. Также показано, что химерные пептиды с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 усиливают цитотоксичность цитостатиков, в том числе паклитаксела (Таксола) [13–15].

Эти сведения послужили основанием для углубленного доклинического изучения MM-D37K *in vivo* на модели колоректального рака человека

НТС-116 с оценкой *in vitro* синергизма в комбинации с паклитакселом (Таксолом). Соответственно **цель** настоящего **исследования** состояла в изучении дозовых характеристик ММ-D37К при парентеральном введении на подкожных (п/к) ксенографтах колоректального рака человека *in vivo*.

Задачи: изучить эффективность ММ-D37К в диапазоне доз при многократном п/к или внутривенном (в/в) введении мышам Balb/c nude с п/к ксенографтами колоректального рака человека НТС-116, оценить переносимость ММ-D37К.

Материалы и методы

Животные

Исследование проводилось на 41 мыши Balb/c nude (самки в возрасте 8 нед с массой тела 20–22 г разведения ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России). Мышей содержали в специализированном однокоридорном кондиционированном отсеке на брикетированном стерильном корме (ООО «МЭСТ», Москва), стерильной воде и стерильной бумажной подстилке (марка E2) при нормированном температурно-влажностном режиме с соблюдением требований, предъявляемых к конвенциональным животным [16].

Опухолевый материал

Штамм колоректального рака человека НТС-116 получен из коллекции опухолевых штаммов человека ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [17]. Для получения стандартного прививочного материала штамм пассирован п/к 2 раза по 50 мг опухолевой взвеси в 0,5 мл питательной среды № 199. Для проведения эксперимента взят 3-й пассаж, который использован в качестве опухолевого материала для билатеральной трансплантации.

Агент

Субстанция химерного пептида ММ-D37К – белый кристаллический порошок во флаконе [14, 15].

Для введения мышам субстанцию растворяли в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида до нужных концентраций и использовали *ex tempore*.

Условия проведения экспериментов

В опыте 5 групп мышей: 1 группа использована для контроля роста опухоли (КРО) без лечения ($n = 5$, опухолей 10), 4 группы ($n = 9$, опухолей 18) получали лечение ММ-D37К. Агент вводили п/к или в/в в разовых дозах 5 или 10 мг/кг (суммарные дозы 25 или 50 мг/кг соответственно) 5-кратным курсом на 2, 4, 6, 8 и 10-е сутки после трансплантации опухоли.

Оценка противоопухолевого эффекта

Использовали стандартный показатель торможения роста опухоли – Т/С, % (treatment/control), критерий Т/С ≤ 42 %. Для расчета показателя 2 раза измеряли 3 взаимно перпендикулярных диаметра каждого опухолевого узла для расчета индивидуальных и средних объемов (V_{cp}) в течение 9 дней после окончания лечения [18].

Статистическая обработка данных

Для измерений использовали штангенциркуль (Mitutoyo, Япония), соединенный при помощи USB-порта со статистической программой Microsoft Office Excel (Windows 7) для расчета непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. В иллюстрациях приведены критические значения для уровня значимости, равного 0,05.

Оценка переносимости

О переносимости ММ-D37К судили по качеству жизни мышей с опухолью. В период наблюдения оценивали состояние и поведение мышей, следили за возможной гибелью от токсичности, павших и умерщвленных мышей подвергали аутопсии с оценкой наличия патологических изменений внутренних органов.

Завершение эксперимента

На 24-е сутки после перевивки опухоли и выполнения 6 измерений опухолей мыши были умерщвлены.

Таблица 1. Динамика роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека НТС-116 под действием ММ-D37К

Группа	Путь введения	Число опухолей, n^*	Доза, мг/кг		Средний объем опухоли (мм ³) на сутки после трансплантации		
			разовая	суммарная**	11	15	19
Контроль роста опухоли*	внутривенно	10	–		142 ± 100	398 ± 222	810 ± 735
ММ-D37К	подкожно	18	5	25	71 ± 63	190 ± 176	303 ± 254
			10	50	77***	133 ± 80	248 ± 229
	внутривенно	18	5	25	74 ± 71	173 ± 171	595***
			10	50	67***	130 ± 113	222***

Примечание. *Билатеральная трансплантация; **введение на 2–10-е сутки после перевивки; ***разброс больше средней.

Таблица 2. Ингибирование роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека НСТ-116 под действием ММ-D37К

Препарат	Путь введения	Доза, мг/кг		Т/С, % на сутки после окончания лечения		
		разовая	суммарная	1	5	9
ММ-D37К	подкожно	5	25	50	48	32*
		10	50	52	34*	31*
	внутривенно	5	25	52	44	41
		10	50	47	33	27

Примечание. * $p < 0,05$.

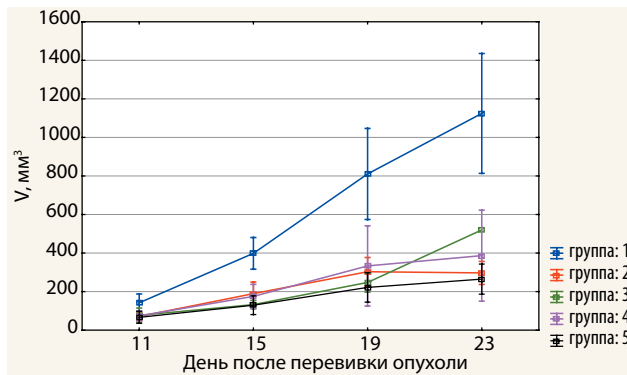


Рис. 1. Динамика среднего объема подкожных узлов колоректального рака человека НСТ-116 после 5-кратного курса введения ММ-D37К: группа 1 – группа контроля роста опухоли; группа 2 – ММ-D37К 25 мг/кг подкожно; группа 3 – ММ-D37К 50 мг/кг подкожно; группа 4 – ММ-D37К 25 мг/кг внутривенно; группа 5 – ММ-D37К 50 мг/кг внутривенно

ны с применением гуманных методов, разрешенных в РФ [19, 20].

Результаты исследования

Показано, что колоректальный рак человека НСТ-116 без лечения (группа КРО) отличается умеренной скоростью роста. В период с 11-го по 23-й день роста опухолевые узлы увеличились в 6,7 раза

от $V_{cp} = 142 \pm 100 \text{ мм}^3$ до $V_{cp} = 890 \pm 860 \text{ мм}^3$. Терапия ММ-D37К в суммарной дозе 50 мг/кг показала относительно лучший противоопухолевый эффект, $T/C_{min} = 27-31 \%$, наступавший при в/в введении на 4 дня раньше (5 суток против 9 суток). Большой разброс размеров опухоли при большой дозировке, особенно при в/в введении, может быть следствием индивидуальной чувствительности к пептиду (табл. 1, 2; рис. 1).

Независимо от этого статистическая обработка полученных данных показала значимую достоверность выявленных отличий от группы КРО (табл. 3, 4).

Анализ переносимости многократной парентеральной терапии ММ-D37К показал отсутствие каких-либо изменений в состоянии и поведении подопытных мышей в процессе и после введения ММ-D37К, а также патологических изменений при аутопсии умерщвленных животных независимо от пути введения и величины примененной дозы в изученном диапазоне.

Заключение

Проведенные исследования показали, что химерный пептид ММ-D37К, ингибитор CDK4/6, в разовых дозах 5 или 10 мг/кг при п/к или в/в 5-кратном через 48 ч введении (суммарные дозы

Таблица 3. Сравнение независимых переменных показателей динамики роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека НСТ-116 под действием ММ-D37К

А. Критерий Уилкоксона (обработка 2_17_11_10.sta)					Б. Критерий знаков (обработка 2_17_11_10.sta)				
Сравниваемые группы мышей	Число опухолей, n	T	Z	p^*	Сравниваемые группы мышей	Число опухолей, n	Процент	Z	p^*
Группа 1 и группа 2	17	4,0	3,309361	0,000935	Группа 1 и группа 2	16	12,5	2,75	0,00596
Группа 1 и группа 3	13	7,0	2,510287	0,012064	Группа 1 и группа 3	12	8,33333	2,598076	0,009375
Группа 1 и группа 4	17	5,0	3,257652	0,001123	Группа 1 и группа 4	16	6,25	3,25	0,001154
Группа 1 и группа 5	16	8,0	2,953402	0,003143	Группа 1 и группа 5	15	20,0	2,065591	0,038867

Примечание. *Выделенные критерии значимы на уровне $p < 0,05$.

Таблица 4. Сравнение морфометрических показателей эффективности в группах ММ–D37К и контроля роста опухоли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни

ММ-D37К 25 мг/кг подкожно							ММ-D37К 50 мг/кг подкожно, 19-й день роста опухоли								
Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n	Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n		
Группа 1	22,0	6,0	0,00	2,12132	0,033896	4	3	Группа 1	26,0	10,0	0,00	2,309401	0,020922	4	4
ММ-D37К 25 мг/кг внутривенно							ММ-D37К 50 мг/кг внутривенно								
Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n	Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n		
Группа 1	28,0	17,0	2,0	1,959592	0,050044	4	5	Группа 1	26,0	10,0	0,00	2,309401	0,020922	4	4

Примечание. *Выделенные критерии значимы на уровне $p < 0,05$.

25 или 50 мг/кг соответственно) значимо и достоверно ингибирует рост п/к ксенографтов колоректального рака человека НСТ-116 при удовлетворительной переносимости.

Ингибирующее действие регистрируется на уровне Т/С = 27–41 % ($p < 0,05$) (стандартный критерий Т/С ≤ 42 %). Выявлена слабая дозовая зависимость как по Т/С, так и по срокам достижения максимального эффекта после окончания курса (от 5 до 9 сут),

особенно при в/в введении при индивидуальной чувствительности к пептиду (вариабельность размеров опухолевых узлов в отдаленные сроки).

Полученные данные *in vivo* свидетельствуют о достаточной широте терапевтического действия химерного пептида ММ-D37К на модели колоректального рака человека НСТ-116, позволяющей получить значимый достоверный противоопухолевый эффект при 2-кратном диапазоне действующих доз.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hirama T., Koeffler H.P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995;86(3):841–54. PMID: 7620180.
- Aleem E., Kiyokawa H., Kaldis P. CDC2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):831–36. PMID: 16007079. DOI: 10.1038/ncb1284.
- Shapiro G.I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006;24(11):1770–83. PMID: 16603719. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.7689.
- Самусенко А.В. Нарушения клеточного цикла и старение клеток в ответ на повреждение ДНК. *Вопросы онкологии* 2009;55(5):521–7. PMID: 20020645.
- Derossi D., Joliot A., Chassaing G., Prochiantz A. The 3rd helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994;269(14):10444–50. PMID: 8144628.
- Morris M.C., Depollier J., Mery J. et al. A peptides carrier for the delivery of biologically active proteins in mammalian cells. *Nat Biotechnology* 2001;19(12):1173–6. PMID: 11731788. DOI: 10.1038/nbt1201-1173.
- Харченко В.П., Кулинич Т.М., Лунин В.Г. и др. Цитотоксические свойства химерных пептидов, содержащих активные центры ингибиторов циклиновых киназ. *Вопросы онкологии* 2007;53(4):448–52. PMID: 17969409.
- Finn R.S., Dering J., Conklin D. et al. PD 0332991, a selective cyclin-D-kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* 2009;11(5):R77. DOI: 10.1186/bcr2419.
- de Araujo C.B., Russo L.C., Castro L.M. et al. A novel intracellular peptide derived from G1/S cyclin D2 induces cell death. *J Biol Chem* 2014;289(24):16711–26. PMID 24764300.
- Bhattacharya S., Ray R.M., Johnson L.R. Cyclin-dependent kinases regulate apoptosis of intestinal epithelial cells. *Apoptosis* 2014;19(3):451–66. DOI: 10.1007/s10495-013-0942-3.
- Aleem E., Arceci R.J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:16. PMID: 25914884. DOI: 10.3389/fcell.2015.00016.
- Имянитов Е.Н. Эволюция системного лечения гормонозависимого рака молочной железы: от чередования препаратов к комбинированной терапии. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2016;12(2):46–51.
- Bozhenko V.K., Kulnich T.M., Kudinova E.A. et al. New targeted anti CDK4/6 peptide ММ-D37К. *J Clin Oncol* 2013;31:e13545.
- Патент РФ № 2435783. 2011 г. Боженко В.К. Химерный пептид и фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний.
- Патент РСТ/RU2014/000199 WO2014163535 A1. 2014 г. Боженко В.К. Химерный пептид и фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний.
- Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможно-

- сти использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010. С. 16.
17. Трещалина Е.М. Коллекция штаммов опухолей человека. Под ред. М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 88–90.
18. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС, Страсбург, 1985. Ланималогия 1993;1:29.
20. Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. Качественная клиническая практика 2002;9:1–15. PMID: 27296126.