

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2017

А. В. Панов<sup>1,2</sup>, Ю. В. Кочкина<sup>1,2</sup>, Е. И. Ярцев<sup>2</sup>, Д. В. Еремин<sup>1,2</sup>,  
Т. А. Яковлева<sup>2</sup>, С. А. Кедик<sup>1,2</sup>

## МОДИФИКАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ СОПОЛИМЕРОМ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА И 2-МЕТИЛ-5-ВИНИЛПИРИДИНА

<sup>1</sup> Московский технологический университет (МИТХТ), Россия, 119571, Москва, пр-т Вернадского, д. 86.

<sup>2</sup> ЗАО "Институт фармацевтических технологий", 121353, Москва, Сколковское ш., д. 21/32;  
e-mail: alpa602@mail.ru

Показано, что совместное введение сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина и цитостатических препаратов мышам с различными привитыми опухолями повышает эффективность терапии, способствуя увеличению продолжительности жизни. Обнаруженный эффект представляет интерес для дальнейшего изучения возможного использования сополимера в качестве иммуномодулятора при проведении химиотерапии.

**Ключевые слова:** N-винилпирролидон; 2-метил-5-винилпиридин; сополимер; цитостатик; противоопухолевый эффект; иммуномодулятор.

Сополимеры N-винилпирролидона (I) с 2-метил-5-винилпиридином (II) представляют собой значительный интерес для медицины [1 – 4]. Усовершенствованная методика синтеза таких сополимеров [5], а также разработанные способы их количественного определения в водных растворах [6] дают возможность рекомендовать их для применения в фармацевтических препаратах. Ранее показано, что сополимеры I и II успешно действуют в качестве активаторов фагоцитоза [7]. Однако не менее важной является способность данного сополимера проявлять иммуномодулирующие свойства при совместном применении с рядом цитостатических препаратов. Как известно, одним из лимитирующих факторов в химиотерапии опухолей является индуцируемое цитостатиками повреждение иммунной системы, которое снижает не только толерантность организма к инфекциям, но и чувствительность к последующим курсам лечения, а также длительность ремиссий [8]. Перспективным направлением в области противоопухолевой терапии можно считать включение в схемы комбинированного лечения различных модификаторов биологических реакций организма. К таким модификаторам относятся, в частности, иммуномодуляторы, увеличивающие реактивность к цитостатическому воздействию и т.п. [9].

Ранее показано [10, 11], что сополимер I и II в качестве противолучевого средства обладает способностью к коррекции иммунологических реакций, наряду со стимуляцией гемопоэза и индукцией восстановительных процессов в поврежденном облучением костном мозге. Данный комплекс свойств позволяет ожидать, что в комбинации с радиомиметиками указанный сополимер будет индуцировать улучшение переноси-

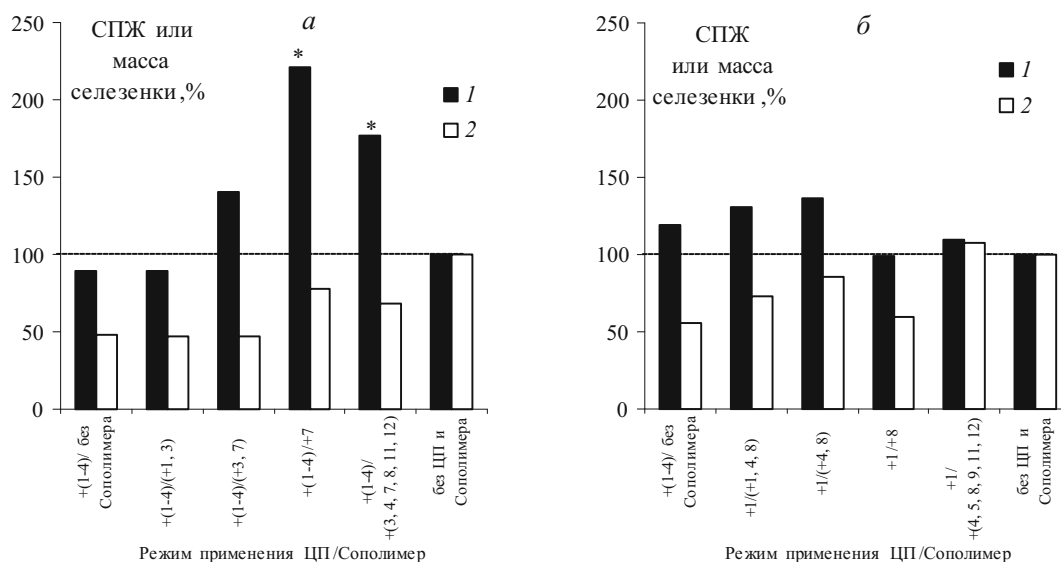
мости и повышение избирательности действия химиопрепаратов. Целью настоящей работы было определение возможности использования сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина для повышения противоопухолевой и противолучевой активности цитостатических препаратов с различным механизмом действия.

### *Экспериментальная часть*

Сополимер I и II (далее — Сополимер) с содержанием основного вещества более 95 % синтезировали радикальной сополимеризацией при постоянном соотношении мономеров в реакционной массе, обеспечиваемом подпиткой [5]. В качестве основного объекта исследования выбран водорастворимый образец сополимера [5, 6] с содержанием звеньев II 35 мол. % и средневискозиметрической молекулярной массой 35 кДа.

В работе использованы алкилирующие вещества циклофосфан (ЦФ, циклофосфамид) — порошок для приготовления раствора для внутривенного (в/в) введения производства ОАО "Биохимик" (Россия) и спиروبромин (диброспидия хлорид) в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций производства ОАО Фармакон (Россия), а также противоопухолевый препарат антрациклинового ряда эпирубицин (фарморубицин) в виде 2 мг/мл раствора производства компании Ebewe Pharma (Австрия).

Опыты проводили на мышах C57BL/6, BDF<sub>1</sub>, BaLB/C, DBA и белых беспородных мышах с исходной массой тела 18 – 20 г, а также белых беспородных крысах с исходной массой тела 120 – 130 г разного



**Рис. 1.** Влияние Сополимера в дозе 50 мг/кг на специфическую активность и токсичность фарморубидина в дозе 4 мг/кг (а) и спирибромидина в дозе 500 мг/кг (б) у мышей с лейкемией L1210 [12]. Пунктиром обозначено 100 % соответствие контрольной группе (без введения Сополимера и цитостатического препарата).  $N = 2$ . 1. Средняя продолжительность жизни (СПЖ), в % к контрольной группе. 2. Масса селезенки, в % к контрольной группе. \*  $p < 0,05$ .

пола. Всего использовано 800 мышей и 245 крыс. В работе использованы следующие штаммы экспериментальных опухолей: лимфолейкоз мыши линии L1210 (мыши ДВА<sub>2</sub>, ВДФ<sub>1</sub> — самцы), плазмоцитома МОРС-406, карцинома Эрлиха, карциносаркома Уокер (солидная опухоль) — беспородные крысы-самцы.

Солидные опухоли перевивали под кожу левой подмышечной впадины, вводя по 30 мг опухолевой взвеси

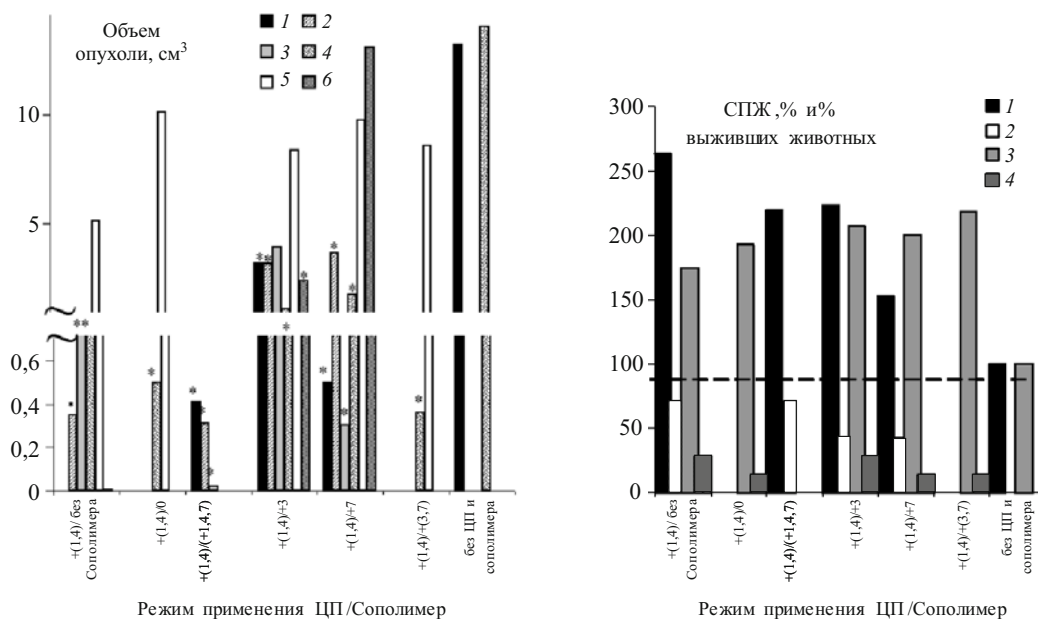
в 0,3 мл изотонического раствора хлорида натрия. Сополимер в виде 10 % водного раствора вводили внутривенно в дозах 50 – 600 мг/кг в различные сроки за 14 – 1 сут до, одновременно или через 1 – 12 сут после перевивки опухолевого материала. ЦФ и спирибромидин вводили однократно через 24 ч после инокуляции опухолевых клеток, фарморубидин — в течение 4 дней, начиная с 24 ч после инокуляции опухоли. Жи-

Таблица 1

**Влияние Сополимера на специфическую активность и токсичность при совместном приеме с ЦФ, изученное для разных штаммов перевитых опухолей у мышей *in vivo*.**

Режим применения ЦФ/сополимер	Доза ЦФ, мг/кг:					
	50			100		
	150			150		
	продолжительность жизни, сут			масса селезенки, мг		
<b>Лейкемия L1210</b>						
+ 1/без сополимера	13,1 ± 1,9*	17,5 ± 1,6*	22,5 ± 2,3*^	134,7 ± 6,8*	123,2 ± 14,4*	107,8 ± 30,2*
+ 1/- 7	12,5 ± 1,4*	10,8 ± 0,5*	13,5 ± 2,5*	112,6 ± 23,4*	150,0 ± 23,6*	108,0 ± 7,5*
+ 1/0	19,7 ± 2,3*^	21,5 ± 3,0*^	14,7 ± 1,5*	116,3 ± 18,7*	80,7 ± 4,9*	93,6 ± 5,4*
+ 1/+ 3	11,2 ± 0,7*	20,0 ± 2,1*^	23,2 ± 1,7*^	155,8 ± 19,5*	133,2 ± 34,0*	100,0 ± 21,5*
+ 1/+ 7	13,0 ± 1,4*	17,2 ± 1,8*	18,2 ± 2,3*	144,0 ± 21,7*	133,7 ± 19,6*	113,7 ± 30,8*
без ЦФ и сополимера		9,7 ± 0,4*			139,9 ± 11,6*	
<b>Опухоль Эрлиха</b>						
+ 1/без сополимера	12,0 ± 2,9**	12,6 ± 3,2**	12,0 ± 1,9**	111,6 ± 37,7**	140,2 ± 32,4**	71,8 ± 15,6**
	11,1 ± 1,4*	13,9 ± 1,9*	21,0 ± 4,1*	136,2 ± 29,0*	91,8 ± 24,2*	37,3 ± 6,1*
+ 1/- 4	11,7 ± 2,2*	15,3 ± 2,6*	13,4 ± 2,6*	77,5 ± 22,2*	89,3 ± 17,0*	83,8 ± 18,2*
+ 1/0	14,6 ± 2,3*	12,3 ± 1,2*	13,3 ± 3,0*	81,8 ± 10,0*	102,8 ± 26,8*	75,3 ± 17,3*
+ 1/+ 3	9,4 ± 2,4**	11,8 ± 2,0**	15,0 ± 3,9**	170,0 ± 57,2**	157,3 ± 41,3**	77,3 ± 20,5**
	8,8 ± 1,2*	13,3 ± 0,9*	14,3 ± 2,2*	73,5 ± 18,7*	95,5 ± 26,8*	101,2 ± 20,1*
+ 1/+ 7	12,0 ± 2,7**	11,3 ± 1,7**	15,8 ± 3,2**	79,8 ± 12,6**	118,0 ± 33,9**	96,0 ± 20,3**
	10,8 ± 2,3*	10,5 ± 1,2*	13,3 ± 1,0*	59,2 ± 11,4*	125,2 ± 20,0*	111,2 ± 18,0*
без ЦФ и сополимера	8,3 ± 1,2 для серии ** 10,4 ± 1,2 для серии *			76,5 ± 13,5 для серии ** 125,3 ± 27,4 для серии *		

Доза сополимера — 600(\*) и 300(\*\*) мг/кг [12].  $N = 3$   
^  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Противоопухолевая активность при комбинированном применении спирибромидина и Сополимера у крыс с карциномой Уокера. Влияние на объем опухоли (а) и среднюю продолжительность жизни погибших и долю выживших животных (б).  $N = 3$ . Доза спирибромидина 250 (1 – 3) или 50 (4 – 6) мг/кг; доза Сополимера 300 (1 – 3) или 100 (4 – 6) мг/кг [12]; объем опухоли измерен через 10 (1, 4), 18 (2, 5) или 36 (3, 6) сут. Пунктиром на рисунке (б) обозначено 100 %, соответствие контрольной группе без введения Сополимера и цитостатического препарата. \*  $p < 0,05$ .

вотных с солидными опухолями забивали на 14 сут после трансплантации опухолей и оценивали противоопухолевый эффект как процент торможения роста опухоли  $I_t$  по изменению массы опухоли в процессе лечения, по сравнению с контрольной:

$$I_t = \frac{M_k - M_0}{M_k} \cdot 100, \quad (1)$$

где  $M_k$  и  $M_0$  — масса опухоли в контроле и опыте соответственно, г.

Подробно схемы трансплантации опухолевых моделей и комбинированного применения препаратов указаны в табл. 1, 2 и на рис. 1 – 3.

Терапевтический эффект оценивали у мышей по изменению средней продолжительности жизни, а у крыс — по уменьшению объема и массы опухоли. О токсическом действии судили по гибели животных и изменению массы селезенки в сравнении с контролем.

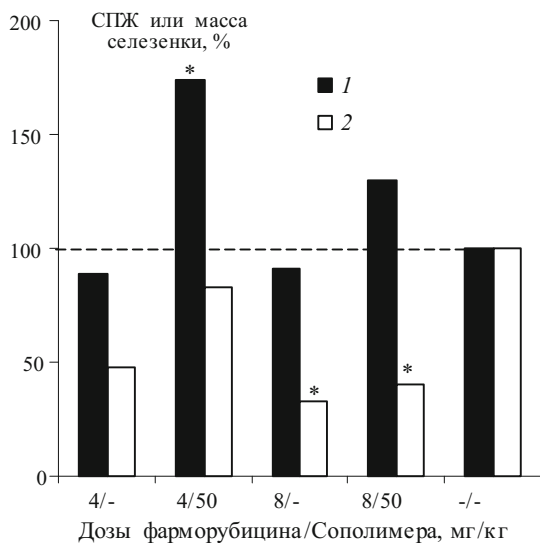
Статистическую обработку результатов проводили, используя критерии Стьюдента и Фишера.

### Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные при оценке возможности использования Сополимера для повышения противолейкозной активности цитостатических препаратов с различным механизмом действия, представлены в табл. 1, 2. Из приведенных данных следует, что только при однократном введении (в дозе 600 мг/кг) в день трансплантации лейкозных клеток (за 1 сут до введения цитостатика) Сополимер на 68 % увеличивает среднюю продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом L1210 субтерапевтической дозы ЦФ (50 мг/кг) и, в меньшей степени, (на 42 %) пролонги-

рует эффект терапевтической дозы (100 мг/кг). При комбинации с субтоксической дозой ЦФ (150 мг/кг) продолжительность жизни уменьшилась в случае введения модификатора за 7 сут, одновременно или через 7 сут после цитостатика или не отличалась (через 3 сут) от продолжительности, наблюдаемой при изолированном введении противоопухолевого препарата.

Аналогичные тенденции выявлены у мышей с опухолью Эрлиха (табл. 1). Продолжительность жизни в группах, получавших субтерапевтические дозы ЦФ, под влиянием Сополимера, введенного в дозе 600 мг/кг, одновременно с инокуляцией опухоли, была на 33 % больше, чем в группах, подвергнутых монотерапии, а у мышей, которым инъецировали субтоксические дозы цитостатика — уменьшалась. Анализ данных по действию на селезенку животных с опухолями Эрлиха субтерапевтических доз ЦФ и Сополимера показал, что при инъекции отмечается отсутствие специфического поражения селезенки лейкозным процессом и повышение терапевтического эффекта. Напротив, в условиях глубокого поражения кроветворной ткани, вызванного субтоксической дозой ЦФ, при одновременном применении Сополимера наблюдается увеличение массы селезенки без увеличения продолжительности жизни. Объяснение этому следует искать в сложности комплекса реакций, вызываемых Сополимером. Сополимер, как показано [4, 12], является противоопухолевым препаратом, активатором выработки интерлейкина-1альфа и интерлейкина-1бета. Таким образом, предполагается, что Сополимер опосредованно препятствует пролиферации раковых клеток, используя, в частности, механизм фагоцитоза. Кроме того, стимулируя темпы выхода элементов кроветворной системы в периферическую кровь и активацию



**Рис. 3.** Влияние Сополимера в дозе 50 мг/кг на активность и токсичность фарморубина при введении в одном шприце мышам с лейкемией L1210. Режим применения — 4 дня подряд с момента введения опухоли.  $N=2$ . Пунктиром обозначено 100 % соответствие контрольной группе без введения Сополимера и цитостатического препарата. 1. Средняя продолжительность жизни, % к контрольной группе. 2. Масса селезенки, % к контрольной группе. \*  $p < 0,05$ .

фагоцитоза, он увеличивает чувствительность к цитостатическому воздействию, индуцируя иммунологическую реактивность и восстановительные процессы в организме, снижая токсические последствия противоопухолевого препарата. В данном случае отсутствие благоприятного влияния на длительность жизни мышей, получающих субтоксическую дозу ЦФ и Сополимера в дозе 600 мг/кг, может быть следствием сложения токсических эффектов препаратов. В то же время введенный в дозе 300 мг/кг Сополимер (табл. 1) увеличивает терапевтический эффект ЦФ в дозе 150 мг/кг на 37 – 46 % в зависимости от схемы комбинации. При

этом положительные результаты наблюдаются при введении модификатора в более поздние сроки, что, возможно, создает более благоприятные условия для совпадения периода максимального проявления его стимуляторной активности с началом эндогенных и восстановительных процессов.

У мышей с плазмоцитомой МОРС-406, получающих комбинацию спиروبрома с Сополимером в дозе 300 мг/кг, введенным в те же сроки, также выявлена тенденция к увеличению продолжительности жизни (табл. 2). Свидетельством общего детоксицирующего влияния Сополимера могут служить показатели изменения массы селезенки подопытных животных. В то время как при монотерапии спиروبромом мышей с плазмоцитомой МОРС-406 прирост массы селезенки животных отставал на 14 % от контроля, значение массы селезенки животных, которым вводили цитостатик на фоне Сополимера, как правило, превышало контрольную величину (на 2 – 24 %) (табл. 2). Как показано в обширном исследовании иммунных структур селезенки у мышей после воздействия хронического радиационного фактора низкой интенсивности [13], этот орган может служить маркером негативного воздействия на весь организм. Селезеночный индекс является интегральным показателем, который отражает интенсивность гуморального звена иммунной системы и, кроме этого, характеризует уровень антигенпрезентации, так как селезенка — самый большой лимфоидный орган, в котором происходит кооперация лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками. Увеличение этого показателя может свидетельствовать об активной фазе гуморального звена противоопухолевого иммунитета животных.

Наилучший результат цитостатической химиотерапии наблюдался при использовании низкой дозы Сополимера (50 мг/кг) в качестве модификатора противолейкозного действия препарата антрациклинового ряда фарморубина (рис. 1, а). Однократное (через 7 сут после инокуляции), двукратное (через 3 и 7 сут) и многократное (через 3, 4, 7, 8, 11, 12 сут) введение Сополимера значительно улучшает толерантность организма к данному цитостатику. Так, если изолированное введение фарморубина в дозе 4 мг/кг (ежедневно в течение 4 сут) вызывает гибель животных с лимфолейкозом L1210 от токсичности и уменьшение продолжительности жизни до 89 % от контроля, то при комбинации с Сополимером длительность жизни животных с лимфолейкозом увеличивалась в 1,5 – 2 раза. При сокращении интервала между цитостатическим и модифицирующим воздействием положительный эффект комбинации отсутствует, что может свидетельствовать в пользу объяснения механизма действия Сополимера его влиянием на восстановительные процессы [14]. Аналогичные результаты наблюдались при комбинированном введении мышам с лимфолейкозом L1210 Сополимера в дозе 50 мг/кг и спиروبрома (рис. 1, б). При анализе данных, полученных при изучении влияния Сополимера на специфическую активность и токсичность спиروبрома у крыс с солид-

**Таблица 2**  
**Влияние Сополимера (300 мг/кг) на специфическую активность и токсичность спироброма (500 мг/кг) на штамм плазмоцитомы МОРС-406 в эксперименте на мышах [12].  $N=3$**

Режим применения (дни)/сополимер (дни)	Продолжительность жизни, сут	Масса селезенки, мг
+ 1/без сополимера	24,8 ± 4,4*	132,7 ± 33,2
+ 1/0	26,8 ± 3,2*	188,4 ± 52,1
+ 1/+ 1	25,6 ± 1,8*	186,0 ± 33,6
+ 1/+ 2	23,8 ± 2,8*	143,0 ± 33,2
+ 1/+ 3	27,4 ± 3,3*	150,3 ± 36,9
+ 1/+ 4	22,0 ± 3,4*	142,0 ± 21,0
+ 1/+ 5	28,4 ± 1,8*	150,6 ± 42,4
+ 1/+ 6	21,2 ± 1,7*	169,2 ± 38,5
+ 1/+ 7	25,8 ± 4,7*	186,0 ± 53,9
+ 1/+ 8	19,6 ± 4,0	130,0 ± 32,8
+ 1/+ 9	30,0 ± 3,1*	134,0 ± 53,0
без спироброма и сополимера	13,1 ± 0,4	133,1 ± 11,7

\*  $p < 0,05$ .

ной опухолью (карциносаркома Уокер) (рис. 2), также просматриваются тенденции к улучшению переносимости цитостатика, увеличению продолжительности жизни и пролонгации эффекта.

Водный раствор фарморубицина в дозе 4 и 8 мг/кг, вводимый 4 дня подряд, оказался токсичным и уменьшал среднюю продолжительность жизни животных с лимфолейкозом L1210 до 67–91 % от контроля (рис. 3). Однако в 1 % растворе с Сополимером фарморубицин в дозе 4 мг/кг увеличивал длительность жизни мышей до 145–175 %, а при увеличении концентрации цитостатика до токсических значений (8 мг/кг) — до 130 %.

Таким образом, совместное применение Сополимера и химиопрепаратов (цитостатиков) при оптимальных режимах комбинаций на различных моделях исследуемых опухолей повышает их противоопухолевый эффект. При лечении цитостатиками Сополимер способствует увеличению продолжительности жизни животных с опухолями, увеличению массы селезенки, снижению их токсичности, менее глубокому поражению кроветворной ткани цитостатиками. Сополимер вызывает в организме комплекс защитных физиологических реакций: стимуляцию гормонального и клеточного иммунитета, индукцию выброса в периферическую кровь клеточных элементов кроветворения, наличие дестабилизирующей активности [14] и др. Все это приводит к ожидаемому положительному эффекту действия цитостатиков при экспериментальных опу-

холях. В то же время очевидно, что практически столь значимый факт и механизмы, объясняющие его, будут интересны для дальнейшего исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Кедик, С. В. Ворожцова, Е. И. Ярцев и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **8**, 32–35 (2012).
2. Патент РФ № 2471491 (2011).
3. Патент РФ № 2430933 (2010).
4. Патент РФ № 2430932 (2010).
5. С. А. Кедик, А. В. Панов, И. В. Сакаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(8), 110–113 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(8), 478–481 (2012).
6. С. А. Кедик, А. В. Панов, И. В. Сакаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(10), 54–56 (2013); *Pharm. Chem. J.*, **47**(10), 569–571 (2013).
7. С. А. Кедик, Е. А. Ярцев, О. А. Бочарова, И. В. Сакаева, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **9**, 30–32 (2010).
8. Я. Колман, К.-Г. Рем, *Наглядная биохимия*, Мир, Москва (1998).
9. Ю. Б. Белоусов, В. Г. Кукуес, В. К. Лепехин, В. И. Петров (ред.), *Клиническая фармакология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2009).
10. В. С. Калистратова, А. А. Иванов, П. Г. Нисимов, *Радиационная биол. радиоэкол.*, **41**(1), 104–112 (2001).
11. Г. В. Калистратов, С. А. Кедик, В. И. Свергун, *Мед. радиол.*, **38**(10), 21–25 (1993).
12. Патент РФ 2459838 (2012).
13. Ю. В. Буклис, *Морфология*, **137**(4), 42 (2010).
14. А. В. Панов, О. С. Измestьева, Е. И. Селиванова и др., *Радиация и риск*, **1**, 65–75 (2016).

Поступила 17.11.15

## MODIFICATION OF THE ANTITUMOR EFFECT OF CYTOTOXIC DRUGS BY COPOLYMERS OF N-VINYLPYRROLIDONE AND 2-METHYL-5-VINYLPYRIDINE

A. V. Panov<sup>1,2\*</sup>, Yu. V. Kochkina<sup>1,2</sup>, E. I. Yartsev<sup>2</sup>, D. V. Eremin<sup>1,2</sup>, T. A. Yakovleva<sup>2</sup>, and S. A. Kedik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Moscow University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Technologies, Moscow, 121353 Russia

\* e-mail: alpa602@mail.ru

Combined administration of cytostatic drugs with a copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine improves the efficacy of treatment in mice with various implanted tumors. The copolymer administration leads to increase in both the mice survival *in vivo* and the effectiveness of cytostatic treatment. The result is of interest for further investigation of the possibility of using copolymers as an immunomodulator during chemotherapy.

**Keywords:** N-vinylpyrrolidone, 2-methyl-5-vinylpyridine; copolymer; cytostatic agent; antitumor effect; immunomodulator.