

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

СОСТАВИТЕЛИ: д.м.н. Е.М. Трещалина, к.б.н. О.С. Жукова, проф., д.м.н. Г.К. Герасимова, к.м.н. Н.В. Андропова, проф., д.м.н. А.М. Гарин.

1. Введение

Несмотря на существование в клинической практике более 100 противоопухолевых препаратов [10], эффективность большинства из них недостаточна и спектр онкологических заболеваний, чувствительных к химиотерапии, ограничен. Поэтому остается актуальным вопрос о разработке новых более активных препаратов, а также поиск веществ, эффективных при опухолях с первичной и приобретенной резистентностью к лекарственной терапии. В связи с этим решение о продвижении нового вещества с противоопухолевой активностью на клинические испытания принимается на основании одного из следующих критериев:

- новый механизм действия
- избирательная цитотоксичность в отношении определенных культур опухолевых клеток *in vitro* и ксенографтов опухолей человека
- высокая противоопухолевая активность *in vivo*
- способность преодолевать лекарственную устойчивость
- отсутствие перекрестной устойчивости с известными веществами

В настоящее время общепринята методика определения противоопухолевого действия, ориентированная на оценку скорости роста опухоли. В этом случае в качестве модели используются перевиваемые *in vivo* опухолевые системы с генерализованным и солидным характером роста. При этом эксперименты на сверхчувствительных (высокоиммунногенных) опухолях не дают возможности адекватно оценить эффективность вещества. Поэтому на всех этапах разработки противоопухолевых препаратов ведущую роль должны играть неиммунногенные и высокометастазирующие опухолевые модели или опухоли с приобретенной резистентностью к химиотерапии, что обеспечивает их достаточную прогностическую ценность. Большое значение также придается данным, полученным на моделях, свойства которых наиболее приближены к свойствам отдельных опухолей человека – на клеточных линиях или на ксенографтах (гетеротрансплантатах) опухолей человека, растущих у иммунодефицитных мышей и обладающих различными биологическими и биохимическими свойствами, в том числе, лекарственной устойчивостью.

В последние годы в результате интенсивного развития молекулярной биологии и генетики выявлены новые молекулярные мишени для противоопухолевой химиотерапии, в том числе специфичные для опухолевой клетки. В результате стало возможным создавать противоопухолевые препараты, направленные на специфичные для данного вида опухолей молекулярные мишени («таргетная» или адресная терапия).

Для выявления и изучения веществ «таргетного» механизма действия необходимо использовать опухолевые модели (культуры клеток, опухоли мышей

и/или человека) с высокой экспрессией мишеней, на которые направлено действие препарата.

Особое место в онкологии занимает экссудативный опухолевый плеврит метастатической природы (ОП), частота развития которого при лимфомах и солидных опухолях достигает 45%, а при мезотелиоме плевры имеет первичную природу и встречается у большинства больных. Обычный способ применения химиотерапии недостаточно результативен [3, 13]. Современные подходы к терапии ОП ориентированы на использование полихимиотерапии и плевросклерозирующих средств (ПСС). Недостатком внутривнутриплевральной терапии ОП с применением ПСС является невысокая эффективность, недостаточное склерозирование плевральной полости и сильная болевая реакция [1]. Вследствие этого поиск новых ПСС актуален, поэтому требования к их доклинической оценке включены в настоящие методические рекомендации.

Данные Рекомендации не касаются изучения веществ, предназначенных для лечения гормонозависимых опухолей, а также антиметастатических средств, при разработке которых следует руководствоваться специальными методическими рекомендациями [8]. Также не следует применять данные Рекомендации для выявления и изучения препаратов сопровождения различных видов противоопухолевой терапии, направленных на оптимизацию лечения (снижение опухолевой интоксикации или уменьшение побочных эффектов терапии): 1) модификаторов биологических реакций (МБР), 2) симптоматических средств. Для препаратов сопровождения изучение на моделях опухолевого роста направлено на выявление опасности уменьшения эффективности специфических противоопухолевых средств и стимуляции роста новообразований или диссеминации процесса. Выяснение характера модифицирующего действия препаратов сопровождения следует выполнять по специально разработанным Программам, руководствуясь конкретным объектом и механизмом модификации и рекомендуемой терапевтической схемой его применения у онкологического пациента. Для влияния на опухолевый рост следует использовать высокоинформативные и краткосрочные тесты (например, панели опухолевых штаммов для МБР природного происхождения) [6].

При выполнении доклинических исследований необходимым требованием является качество тестируемого агента, удовлетворяющее соответствующим требованиям [5].

2. Изучение специфической активности *in vivo*

Для клинических испытаний могут быть предложены оригинальные вещества новых классов, аналоги известных лекарственных средств и воспроизведенные (*generic*) вещества. В зависимости от этого различаются требования, предъявляемые к таким препаратам при передаче их на клиническое изучение, критерии оценки эффективности и методы изучения.

2.1. Оригинальные вещества нового класса

Критерии эффективности

Соединение нового класса, рекомендуемое для клинического изучения, должно соответствовать одному или более из следующих критериев эффективности:

- торможение роста хотя бы одной солидной опухоли из обязательного к изучению спектра на 90% и более, сохраняющееся не менее 7 суток после отмены вещества;

- торможение роста не менее трех солидных опухолей или подкожно перевитых лейкозов, упомянутых в обязательном перечне, на 70% и более с сохранением значимого эффекта не менее 7 суток;

- увеличение продолжительности жизни животных с лейкозом на 75% и более;

- продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 50% и более;

- полная ремиссия у 50% животных (отсутствие признаков опухоли/лейкоза в течение 60 дней)

- излечение 50% животных (отсутствие признаков опухоли/лейкоза в течение 90 дней)

- высокая избирательная цитотоксичность *in vitro*;

- новый, ранее неизвестный механизм действия (при наличии существенной противоопухолевой активности).

Обязательные исследования:

- изучение спектра противоопухолевой активности, включая ксенографты опухолей человека

- определение диапазона терапевтических доз с доказательством наличия избирательности терапевтического действия (терапевтический индекс)

- изучение действия на развившуюся опухоль

- выбор оптимального пути введения в организм

- выбор оптимальной схемы применения

- сравнительное изучение эффективности субстанции и лекарственной формы

- изучение механизма противоопухолевого действия, ориентированного на определенные клеточные мишени

Дополнительные исследования:

- изучение эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами

- изучение действия на опухоль с приобретенной лекарственной резистентностью

- изучение способности ингибировать процесс метастазирования злокачественных опухолей (см. соответствующие Рекомендации [8, 11])

- изучение элементов фармакокинетики на животных с опухолью

2.2. Аналоги известных противоопухолевых препаратов

Помимо создания препаратов с ранее неизвестной структурой или механизмом действия перспективной задачей является поиск новых вариантов соединений, уже применяемых в химиотерапии опухолей.

В данном случае необходимо показать существенные преимущества предлагаемого на клинические испытания аналога перед лучшими, наиболее близкими по структуре препаратами того же класса, доказательством чего должно быть наличие хотя бы одного из следующих признаков:

- увеличение эффективности не менее чем в 2 раза по любому из критериев

- появление более значимого эффекта, например, излечение всех животных при применении препарата хотя бы в одной дозе

- отсутствие или снижение токсических эффектов, наблюдаемых у препаратов сравнения (например, гематотоксичности, нефротоксичности, кардиотоксичности, гастроинтестинальной токсичности, аллопеции и пр.)

- существенный антиметастатический эффект при отсутствии такового у препарата сравнения или увеличение антиметастатического эффекта не менее чем в 2 раза

- возможность использования более удобных и/или безопасных путей введения препарата

- существенные отличия в спектре противоопухолевой активности, в том числе в отношении опухолей, резистентных к препарату сравнения

- отличия в механизме действия и/или фармакокинетике

Обязательные исследования:

Все исследования проводятся параллельно с препаратом сравнения (прототипом), который должен быть лучшим из данного класса, в следующем объеме:

- изучение спектра противоопухолевой активности, включая ксенографты опухолей человека

- изучение противоопухолевой активности на любых резистентных к прототипу опухолях или культурах клеток

- определение диапазона терапевтических доз и схемы применения

- изучение иного пути введения (при наличии показаний) на любой чувствительной к прототипу модели

- сравнительное изучение антиметастатической активности (при наличии показаний)

- сравнительное изучение токсичности (при наличии преимуществ перед прототипом)

- сравнительное изучение эффективности и токсичности субстанции и лекарственной формы (проводится без прототипа)

- доказательства иного механизма действия, если это является основанием для передачи вещества на клинические испытания

- сравнительное изучение элементов фармакокинетики (особенно для препаратов пролонгированного действия или иммобилизованных на носителе, а также для пролекарств («*prodrugs*»), проходящих обязательную активацию в организме)

Дополнительные исследования:

- изучение эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами.

2.3. Воспроизведенные зарубежные препараты

В результате экспериментального изучения воспроизведенного препарата должны быть получены данные, подтверждающие его идентичность с воспроизводимым по противоопухолевому и другим биологическим эффектам. При сравнительном изучении в качестве объекта сравнения предпочтительно

берется препарат, выпущенный фирмой-создателем, а при недоступности последнего – один из известных препаратов, зарегистрированный в РФ и применяемый в клинике.

Обязательные исследования:

- изучение противоопухолевой активности на 1-2 наиболее чувствительных к прототипу опухолях
- подтверждение диапазона терапевтических доз и схемы применения
- сравнительное изучение эффективности субстанции и лекарственной формы (если создана новая лекарственная форма, исследование проводится по рекомендуемому для аналогов плану).
- доказательство идентичности фармакокинетических параметров

3. Модели и методы *in vivo*

3.1. Изучение спектра противоопухолевой активности

3.1.1. Для препаратов, ориентированных на применение в при гемобластозах

В опытах используются 2-20 генерации перевиваемых лейкозов [8, 11]. Путь введения вещества и путь прививки опухоли не должны совпадать. Для изучения спектра противоопухолевой активности используют не менее двух терапевтических доз вещества, при этом уменьшение массы тела животных должно быть $\leq 20\%$. Исследование проводится с субстанцией или лекарственной формой вещества, рекомендованной для доклинического изучения.

Перевиваемые лейкозы мышей

Обязательные:

- *Лимфолейкоз P388*. Прививается внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно суспензией клеток, полученных из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 10^6 клеток. Штамм поддерживается на мышах линии DBA₂. Для опыта используются мыши линии DBA₂ или гибриды BDF₁ [DBA₂xC₅₇BL/6j] обоего пола с массой тела 18-20 г. (масса тела во всех случаях одинакова).
- *Лимфолейкоз L1210*. Прививается внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно суспензией клеток, полученных из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 10^5 клеток. Штамм поддерживается на мышах DBA₂. Для опыта используются мыши линии DBA₂ или гибриды BDF₁ обоего пола.

Дополнительные:

- *Опухолевый плеврит лимфолейкоза P388 (ОП/P388)* [9]. Штамм поддерживается на мышах DBA₂. Для опыта используются мыши линии DBA₂ или гибриды BDF₁ обоего пола. Лейкоз прививают суспензией асцитных клеток в разведении питательной средой, прививочная доза – $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ кл/мышь в объеме 0,2-0,3 мл. Мышь фиксируют, кожу в области грудной клетки справа обрабатывают спиртовым раствором йода. По правой средней аксиллярной линии на 1 см выше края реберной дуги делают кожный разрез 1,0 см и обнажают операционное поле. На иглу на расстоянии 1,5-2 мм от среза надевают ограничитель для предотвращения перфорации легкого. Иглу вводят в межреберье в точке пересечения средней аксиллярной линии и границы нижнего края легкого на выдохе и быстро производят инъекцию. Модель используют для веществ, предназначенных для лечения опухолевых плевритов.

- *Лимфаденоз Фишера L5178Y*. Перевивается внутрибрюшинно суспензией клеток из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 10⁶ клеток. Штамм поддерживается на мышах DBA2. Для опыта используются мыши линии DBA2 или гибриды BDF1 обоего пола. Начало лечения через 24 часа после прививки. Модель используют, в основном, при изучении аналогов L-аспарагиназы (иммобилизованные формы и пр.).

3.1.2. Для препаратов (цитостатиков), ориентированных на применение в клинике солидных новообразований.

Обязательные

- *Культуры клеток опухолей человека*. Адаптированные к росту *in vivo* и дающие подкожные ксенографты у иммунодефицитных мышей [8, 11, 12].

Подкожные ксенографты опухолей человека. Перевиваемые опухоли прививаются подкожно, прививочная доза соответственно Протоколу. Для уменьшения прививочной дозы клеток используются носители (Матригель и т.п.). Начало лечения соответственно расчетной массе опухоли или задаче эксперимента. Наблюдение за мышами в течение 21-30 дней после окончания лечения. В опыте используется 2 генерация перевиваемой опухоли на иммунодефицитных мышах (*nude*, *SCID*). В отдельных случаях используется внутривенная или внутрибрюшинная трансплантация. При подкожной трансплантации лечение начинают в разные сроки, определяя по диаметру опухоли ее массу: при массе 34 мг лечение считается ранним, при массе 68 мг лечение считается поздним или отсроченным. При других путях трансплантации возможно лечение в иные сроки. Возможно использование развившихся опухолей больших размеров, но следует учитывать их существенное меньшую лекарственную чувствительность.

Для исследований можно использовать штаммы опухолей из различных коллекций и хранений [7, 11], в том числе штаммы, находящиеся на хранении в Банках ведущих онкологических учреждений страны, например в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Наиболее прогностически значимы результаты, полученные на ксенографтах рака легкого A-549, Lung H125, рака толстой кишки Colon 116 и рака предстательной железы Ln/Car. При ортотопической трансплантации Colon 116 в стенку толстой кишки мыши существует высокая корреляция с чувствительностью рака толстой кишки человека [12, 13].

Путь введения вещества и путь прививки опухоли не должны совпадать. Для изучения спектра противоопухолевой активности используют не менее двух терапевтических доз вещества, при этом уменьшение массы тела животных должно быть $\leq 10\%$. Исследование проводится с лекарственной формой вещества, рекомендованной для доклинического изучения. Оценку эффективности проводят только по динамике размеров опухолевых узлов, продолжительность жизни иммунодефицитных мышей не входит в число критериев эффективности из-за непрогнозируемой гибели животных от неспецифических инфекционных причин. В этой связи следует также исходно увеличивать численность подопытных групп на 25-30%.

- *Меланома B16*. Неиммуногенная, метастазирует в легкие. Прививается подкожно или внутрибрюшинно взвесью опухолевых клеток по 30-60 мг в 0,3-0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах C₅₇BL/6j.

Для опыта используются мыши $C_{57}BL/6j$ и гибриды BDF_1 или F_1 [$CBA \times C_{57}BL/6j$] обоего пола. Для оценки эффекта используются специальные Рекомендации [8].

- *Эпидермоидная карцинома легкого Lewis (LLC, 3LL)*. Неиммуногенная, метастазирует в легкие. Прививается подкожно взвесью опухолевых клеток по 30-60 мг в 0,3-0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах-самцах $C_{57}BL/6j$. Для опыта используются мыши-самцы $C_{57}BL/6j$ и гибриды BDF_1 или F_1 . Для оценки эффекта используются специальные рекомендации.

Дополнительные

- *Рак шейки матки PШМ5*. (плоскоклеточный ороговевающий, метастазирует лимфогенно). Прививается подкожно взвесью опухолевых клеток по 30-60 мг в 0,3-0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах CBA. Для опыта используются мыши линии CBA обоего пола.

3.1.3. Для «таргетных» препаратов

Для изучения таргетных агентов используется опухолевый материал с высокой экспрессией маркера. Например, рак молочной железы человека $BT-474$ $R\Theta^+$ и $SKBR3$ $R\Theta^-$ или рак яичников $SKOV3$ $R\Theta^-$ с высокой экспрессией $Her-2/neu$, рака предстательной железы $PC-3$ $PCSA^-$, в том числе с высокой экспрессией $NF/\kappa B$, $LNCap$ $PCSA^+$, эритробластоз $K562$ с экспрессией bcr/abl , различные варианты меланомы с высокой экспрессией $VEGF$ и других маркеров неоангиогенеза пр. Эксперименты выполняются в системах *in vitro* и/или *in vivo*:

- *Клеточные линии опухолей человека;*
- *Перевиваемые опухоли человека у иммунодефицитных мышей;*
- *Перевиваемые опухоли обычных инбредных мышей.*

Оценка эффекта проводится по стандартным критериям, описанным в соответствующих разделах.

Условия проведения экспериментов

Лейкозы, привитые внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно.

Начало лечения через 24 часа после прививки. Наблюдение за мышами до гибели. Оценка эффективности терапии по увеличению продолжительности жизни, числу полных ремиссий или излечению.

Солидные опухоли, привитые внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно.

Начало лечения через 48 часов после прививки или после достижения искомого размера опухоли. Наблюдение за мышами в течение 21-30 дней для оценки эффекта по торможению роста опухоли. Наблюдение только за изогенными мышами до гибели для оценки эффекта по увеличению продолжительности жизни, числу полных ремиссий и излечению. Для препаратов с опосредованным (цитостатическим) действием целесообразно определять скорость роста опухоли по соотношению размеров растущего узла к исходному отдельно в каждой группе мышей.

3.2. Современные доклинические критерии для противоопухолевых агентов, направленных на лечение солидных опухолей человека [11]

Избирательная цитотоксичность	Лейкозы L1210, P388 нормальные клетки. Критерий – индекс цитотоксичности, определенный при широком диапазоне концентраций (желательно 6-7 порядков)
-------------------------------	---

Активность против одной или более опухолей, T/C<42%	Мыши <i>nude</i> или <i>SCID</i> , билатеральная трансплантация фрагментами по 30-60 мг опухоли; Лечение в/в (водорастворимые), р/о (нерастворимые); Панель опухолей: <i>Lung H125, Colon 116, Prostata LNCap</i>
Нетоксичный дозовый уровень	<p><i>Отсутствие снижения или уменьшение <20% массы тела животного при ЛД₁₀ тестируемого агента.</i></p> <p>Агент должен убивать не менее 2,0 \log_{10} опухолевых клеток на 2-х опухолевых моделях при одном курсе введения (≤ 10 дней).</p> <p>Агент испытывается при разных путях введения на неиммуногенной опухолевой модели, что необходимо для преодоления разных физиологических барьеров.</p> <p>Для выявления возможного иммуномодулирующего действия агента проводят повторную трансплантацию фрагмента 60 мг чувствительной к нему опухоли. При отсутствии иммуногенности опухоль растет без изменения времени удвоения Td или не отвечает на IL-2.</p> <p>Панель из 5-ти опухолей, в том числе с МЛУ: чувствительные <i>Colon38</i> и <i>51</i>, РМЖ-16/C, аденокарцинома протока поджелудочной железы-02 и 03, МЛУ-опухоли молочной железы 16/C-Adr (не р-гликопротеиновый механизм), 17/Adr (с р-гликопротеином), а также другие опухоли: недифференцированный <i>Colon-26</i>, меланома <i>B16</i>, аденокарцинома кишечника 09.</p> <p>Методы оценки эффекта подтверждаются гибелью опухолевых клеток.</p>
Определение максимальной терапевтической дозы	Изучение эффективности при двух уровнях нетоксичных доз (ранг 0,62) на 3-х опухолевых моделях при разных путях введения, критерий эффективности T/C<42%, построение кривой доза-эффект (исключение агентов, эффективных только в МПД).
Изучение отсроченной токсичности на мышцах без опухоли	В случае отсутствия гибели в течение 15 дней после введения МПД наблюдение продолжается в течение 30-150 дней (максимальное время восстановления функций). В течение 12-ти дней должна восстановиться масса тела мышцей без дальнейшей потери массы и уменьшения размеров скелета.
Выбор оптимальной структуры среди аналогов (если их не менее 3-4)	Для водорастворимых агентов достаточно 3 варианта структуры; если водонерастворимый агент активен при р/о введении, желательно получить растворимый в воде аналог, т.к. для него существует меньше физиологических барьеров и лучше терапевтический индекс; Неактивные нерастворимые агенты можно испытать повторно, если возможно повысить биодоступность любым современным способом.

Хорошая устойчивость тестируемого вещества в растворе	В растворе в течение 30 минут может распадаться не более половины вещества; чем больше устойчивость, тем лучше.
Максимальная терапевтическая доза не должна превышать 1100 мг/кг. Агент должен быть доступен по стоимости и в необходимом количестве	Доступность и достаточность вещества – необходимое условие успешного изучения.
Агент должен быть патентоспособен	Организация, которая берет на себя финансирование всех или части исследований, должна иметь возможность создавать коммерческий продукт и компенсировать затраты.

3.3. Выбор оптимального пути введения в организм

Исследование проводится на высокочувствительной к изучаемому веществу опухолевой модели. Оптимальным считается путь введения, при котором достигается наибольшая эффективность по всем критериям эффективности.

Водорастворимые вещества

Вводят парентерально – внутривенно, подкожно, внутримышечно или (при наличии показаний) внутривенно. При наличии местно-раздражающего действия вещество вводят только внутривенно. В качестве растворителя для парентерального введения субстанции допустимо использование любого физиологически адекватного растворителя, не вызывающего местного раздражающего действия. Внутривенные инъекции производят в хвостовую вену (≤ 10 мл) или в супраорбитальный синус ($\leq 0,3$ мл). Внутривенные инъекции (≤ 10 мл) производят в нижнюю треть брюшной полости. Подкожные инъекции ($\leq 0,3$ мл) производят в складку кожи на боку или спине животного. Внутримышечные инъекции ($\leq 0,1$ мл) производят в медиальную группу мышц бедра. Внутривенные инъекции осуществляют по методике, описанной в п. 3.1.

Нерастворимые в воде вещества

Вводят в желудок с помощью зонда или парентерально в специально разработанных лекарственных формах. В качестве растворителя используют физиологически адекватные наполнители и растворители, такие как 1%-ный крахмальный клейстер, растительное масло, поливинилпирролидон (ПВП) и пр.

3.4. Определение диапазона терапевтических доз

Исследование проводят при оптимальном пути введения вещества в организм в диапазоне доз от неэффективной до максимально переносимой (МПД). Целесообразно использовать не менее шести однократных или курсовых доз (при

любой длительности курса). Для каждой дозы определяется максимальный противоопухолевый эффект по одному из возможных критериев.

С помощью построения графика «доза-эффект» определяется эффективная доза («*effective dose*») ED_{20} , ED_{50} и ED_{90} – расчетные дозы, вызывающие торможение роста опухоли (ТРО) на 20%, 50% и 90%, соответственно. Затем рассчитываются терапевтические индексы (TI_{20} , TI_{50} или TI_{90}) как соотношение соответствующей летальной и эффективной доз [4]. TI является единственным показателем избирательности противоопухолевого действия, рекомендуемое значение $TI_{50} \geq 2$. Наиболее часто определяют TI_{50} по формуле:

$$TI_{50} = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$$

где LD_{50} – доза, вызывающая гибель 50% здоровых животных.

3.5. Выбор оптимальной схемы применения

Оптимальная схема применения зависит от биодоступности вещества, а также наличия кумуляции и обратимости противоопухолевого и токсического действия и определяется эмпирически в рамках серии опытов, проведенных на высокочувствительной опухолевой модели. Эмпирически найденная оптимальная схема (диапазон доз, количество введений, интервалы между введениями, путь введения), а также данные фармакокинетики вещества являются обоснованием для терапевтической схемы при проведении клинических испытаний.

3.6. Изучение действия на развившуюся опухоль

Опыты проводятся на наиболее чувствительной опухоли при среднем объеме ($V_{ср}$) к началу лечения не менее 500 мм^3 и колебании $V_{ср}$ в группе не более 10%. Учитывая большие размеры опухоли, целесообразно повысить величину суммарной дозы вещества. Оценка противоопухолевого эффекта производится по торможению роста опухоли в динамике через более короткие интервалы, чем при обычной схеме лечения.

3.7. Изучение действия на опухоли с приобретенной лекарственной устойчивостью

Используются любые доступные опухолевые штаммы, например, лейкозы:

- Лимфолейкоз Р388, резистентный к цисплатину (Р388/ДДП)
- Лимфолейкоз Р388, резистентный к адриамицину (Р388/Адр)
- Лимфолейкоз L1210, резистентный к циклофосфану (L1210/ЦФ)

Резистентные штаммы лейкоза Р388, полученные для большинства полициклических противоопухолевых препаратов (например, Р388/АСТ-D, Р388/VP-16 и Р388/VCR) не имеют общей резистентности с алкилирующими агентами или антиметаболитами [11].

Может также быть использован любой иной опухолевый штамм с приобретенной лекарственной устойчивостью. Клетки указанных опухолевых штаммов прививаются, как указано в п. 4.1. Штаммы ведутся на мышах линии DBA₂ при поддерживающей терапии веществом, к которому наработана резистентность. Лейкозные штаммы прививаются внутрибрюшинно. Для опыта используются мыши той линии, на которой индуцирована резистентность. Начало лечения через 24 часа после перевивки. Наблюдение за мышами продолжается до их гибели. Оценка противоопухолевого эффекта проводится по увеличению

продолжительности жизни мышей. Сравнение эффекта нового тестируемого вещества проводится с эффектом взятого в оптимальной терапевтической дозе препарата, к которому индуцирована резистентность.

3.8. Оценка плевросклерозирующей активности

Исследование проводится на здоровых мышах обоего пола линейных или гибридных массой тела 20-25 г.

Индукция плевродеза

При индукции плевродеза используется методика внутривнеплевральных инъекций. В плевральную полость здоровых мышей ($n \geq 6$) однократно вводят тестируемое вещество в диапазоне доз в объеме от 0,05 до 0,5 мл. В зависимости от степени местно-раздражающего действия (МРД) агента мыши переносят введение по-разному. При хорошей переносимости их можно сразу перенести в клетку. При ограничении подвижности и увеличении глубины легочных экскурсий (чрезмерное МРД) может наступить гибель от плевропульмонального шока. В этом случае следует снизить величину вводимой дозы вещества за счет уменьшения объема или концентрации раствора. В течение 4-5 дней после введения мыши малоподвижны, глубина дыхательных экскурсий увеличена. Эта симптоматика прямо связана с дозой и концентрацией склерозирующего агента. В случае применения переносимых доз и концентраций, в последующие 2-3 недели состояние мышей нормализуется. В случае развития острого неспецифического серозного плеврита (чрезмерное МРД) в этот период может наступить гибель мышей. При вскрытии погибших мышей в плевральной полости обнаруживается трансудат до 1,0 мл. На 18-21 сутки после введения тестируемого агента всех мышей усыпляют эфирным наркозом, после чего подвергают аутопсии, при которой визуально изучают состояние грудной полости.

Шкала оценки плевросклерозирующего действия

Баллы	Симптоматика
1	Утолщение перикарда и легочной связки
2	То же + сращение перикарда с окружающими тканями вплоть до разделения единой плевральной полости мышей на две
3	То же + спайки между париетальной и висцеральной плеврой, занимающие до 1/3 поверхности плевры
4	То же + спайки между париетальной и висцеральной плеврой, занимающие до 1/2 поверхности плевры
5	Облитерация полости (плевродез)

Примечания: эталонный ПСС – 3% раствор тетрациклина.

Расчет терапевтического индекса (ТИ)

Первоначально экспериментально определяется доза, вызывающая максимальное склерозирование без гибели мышей (МСД). Затем на здоровых мышах изучается острая токсичность агента при внутривнеплевральном введении и по общепринятому методу Литчфилда-Уилкоксона рассчитывается величина дозы, близкой к максимально переносимой (МПД, ЛД₅). После чего ТИ рассчитывается по формуле:

$$TI = \frac{LD_5}{MSD}$$

где ТИ – терапевтический индекс

LD₅ – доза, близкая к максимально переносимой

MSD – максимальная склерозирующая доза

Для 3% тетрациклина в опыте на мышах-самках линии BALB/c массой тела 20-25 грамм при введении LD₅=186,2 мг/кг, максимальная склерозирующая доза MSD=150 мг/кг, ТИ тетрациклина=1,24. Эти цифры характеризуют тетрациклин как препарат с невысокой избирательностью терапевтического действия, поскольку для достижения полного склерозирования необходимо применение дозы, близкой к токсической. Полученные данные согласуются с клиническим опытом применения тетрациклина [14]. Совпадение экспериментальных и клинических данных говорит об адекватности модели тетрациклинового плевродеза на мышах для оценки склерозирующего действия препаратов.

Заключение об эффективности ПСС

Эффект тестируемого вещества оценивается по 5-ти бальной шкале в сравнении с 3% тетрациклином (эталон). Критерий отбора – 4-5 баллов (склерозирование более 2/3 поверхности плевральной полости, плевродез).

О перспективности вещества для клинической апробации судят по терапевтическому индексу ТИ>1,24 (тетрациклин) при однократном внутривнутриплевральном введении.

3.9. Оценка эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами

Изучаемое вещество вводят в комбинации с доступными наиболее эффективными и широко используемыми в клинической онкологии препаратами (циклофосфаном, доксорубицином, цисплатином, метотрексатом, таксолом, гемзаром и пр.). Целесообразно использовать чувствительную и резистентную к известному препарату опухоли и вводить комбинанты в дозах, составляющих половину от МПД и максимальной эффективной дозы, если таковые не совпадают. В качестве положительного контроля вещество и препарат вводят в полных или удвоенных дозах, что позволяет при равном противоопухолевом эффекте в сравниваемых группах оценить терапевтический эффект комбинации (ЭК):

- *Аддитивный эффект* – ЭК меньше суммы эффектов комбинантов, но больше эффекта более активного комбинанта: $A + B > ЭK_{AB} > Эmax (A \text{ или } B)$
- *Синергический эффект* – ЭК меньше суммарного эффекта равных по эффекту комбинантов, но больше, чем при введении одного из них: $A \text{ или } B < ЭK_{AB} < Э\Sigma (A + B)$
- *Суммационный эффект* – ЭК равен суммарному эффекту комбинантов: $ЭK_{AB} = Э\Sigma (A + B)$
- *Потенцирующий эффект* – ЭК больше суммарного эффекта комбинантов: $ЭK_{AB} > Э\Sigma (A + B)$
- *Снижение эффекта* – ЭК меньше эффекта более активного комбинанта: $ЭK_{AB} < Эmax (A \text{ или } B)$
- *Отсутствие эффекта* – ЭК меньше минимального критерия эффективности: $ЭK_{AB} < Эmin$

3.10. Сравнительное изучение субстанции и лекарственной формы

Исследование проводится в прямом параллельном сравнении на 1-2 наиболее чувствительных опухолях при оптимальной схеме применения вещества в двух дозах.

4. Оценка эффективности противоопухолевого действия

4.1. Оценка противоопухолевого эффекта по торможению роста опухоли

Проводится определение 2-3 размеров опухоли у каждого животного в группе, после чего вычисляется объем (V мм³) опухоли по формулам:

$$V = a \cdot b \cdot c \quad \text{или} \quad V = \frac{(a \cdot b^2)}{2}$$

где: а, b и с – длина, ширина и высота опухолевого узла. Затем вычисляется средний объем опухоли в группе $V_{\text{ср}}$.

Степень торможения роста опухоли определяется по показателям ТРО и Т/С [4, 8, 9], вычисляемым по формулам:

$$TPO\% = \frac{V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}}{V_{\text{контроля}}} * 100 \quad T/C\% = \frac{V_{\text{опыта}}}{V_{\text{контроля}}} * 100$$

где: V – средний объем опухоли (мм³) в подопытной и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок; Т – леченая группа;

С – контрольная группа, Т/С – величина, обратная ТРО, используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли.

Допустимо определять ТРО и Т/С, используя в качестве показателя среднюю массу опухоли у погибших и забитых в различные сроки опыта животных. ТРО и Т/С рассчитываются на 1, 7 и 14 сутки после окончания лечения. Значимый противоопухолевый эффект должен сохраняться не менее 7 суток.

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на опухолях животных

ТРО<20%	0
ТРО<20-50%	±
ТРО<51-80%	+
ТРО<81-90%	++
ТРО<91-100%+<50% ПР/излечения	+++
ТРО<91-100%+>50% ПР/излечения	++++

Количественные критерии оценки активности на ксенографтах опухолей

человека

Т/С=51-100%	0
Т/С=36-50%	+
Т/С=21-35%	++
Т/С=6-20%	+++
Т/С<5%	++++

Минимальные значения для трех обязательных для изучения чувствительных к препарату солидных опухолей или подкожно привитых лейкозов:

$$TPO \geq 70\%, \quad T/C \leq 30\%$$

Минимальные значения для единственной чувствительной к препарату опухоли из всего спектра обязательных для изучения опухолей:

$$TPO \geq 90\%, \quad T/C \leq 10\%$$

4.2. Оценка ингибирующего роста опухоли эффекта по логарифму погибших клеток

Дополнительно может быть рассчитано количество погибших клеток в подкожно привитых опухолях. Для этого в контрольной (t контроля) и леченной (t опыта) группах определяется среднее время удвоения объема опухоли или достижения определенной величины. Разница между показателями «t контроля» и «t опыта» (время задержки роста опухоли в подопытной группе) находится в прямой связи с величиной пула погибших клеток к данному сроку. Рассчитывается lg числа погибших клеток (lg n) по формуле [8]:

$$\lg n = \frac{tk - to}{3,32 Td}$$

где: tk – to – время задержки роста опухоли в опыте; Td – время удвоения размеров опухоли, рассчитанное по экспоненциальной кривой роста опухоли в контроле; 3,32 – число удвоений, необходимое для увеличения lg n на один порядок.

Критерий активности

Лечение должно сопровождаться увеличением lg погибших клеток не менее чем в 2-4 раза.

4.3. Оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни

Проводится по окончании опыта и гибели всех животных. Определяется средняя продолжительность жизни (СПЖ, дни) в группе и вычисляются показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ%) (УПЖ=T/C-100) и T/C по формулам:

$$УПЖ\% = \frac{СПЖ_{опыта} - СПЖ_{контроля}}{СПЖ_{контроля}} * 100 \quad T/C\% = \frac{СПЖ_{опыта}}{СПЖ_{контроля}} * 100$$

Количественные критерии активности [8]:

T/C	<125%	0
	125-160%	±
	161-200%	+
	201-300% или 161-200% при однократном введении	++
	>200+ПР<50% или 201-300% при однократном введении	+++
	>300%+ПР>50% или <50% при однократном введении	++++

Минимальные значения Т/С для животных:

- с лейкозами: Т/С \geq 175%, УПЖ \geq 75%
- с асцитными и солидными опухолями: Т/С \geq 150%, УПЖ \geq 50%
- с опухолевыми плевритами (ОП): Т/С \geq 150%, УПЖ \geq 50%

4.4. Оценка противоопухолевого эффекта по числу полных ремиссий и излечению от опухоли

Подсчет числа полных ремиссий производится не ранее, чем через 30 дней (лейкозы) или 60 дней (солидные опухоли, развивающиеся в брюшной полости гемобластозы), а подсчет числа излеченных животных производится не ранее, чем через 90 дней после окончания курса терапии. Отсутствие признаков опухолевого поражения определяют при патологоанатомическом вскрытии.

4.5. Статистический анализ результатов изучения *in vivo*

Результаты, полученные при проведении экспериментов, подвергаются статистической обработке с целью установления степени variability вычисленных показателей и достоверности выявленных различий.

При статистической обработке результатов опытов, проведенных на опухолях, характер роста которых подчиняется законам нормального распределения, возможно применение параметрических методов статистики (метод Стьюдента-Фишера, критерий Т, доверительный интервал). Для опухолей, рост которых не подчиняется законам нормального распределения, используется любой из непараметрических методов статистической обработки результатов биологического эксперимента (критерий U, критерий Вилкоксона и т.п.). Различия можно считать достоверными при $p < 0,05$.

5. Исследование цитотоксического эффекта *in vitro*

Основной целью исследований *in vitro* является оценка прямого цитотоксического эффекта потенциальных противоопухолевых препаратов и выявление возможной дифференциальной чувствительности опухолевых клеток человека различного генеза к изучаемым соединениям. Исследование может проводиться на всех стадиях разработки новых препаратов.

5.1. Методы изучения

Система отбора и изучения соединений с потенциальной противоопухолевой активностью *in vitro* основана на определении степени подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента, которое вычисляется по формуле:

$$N\% = (1 - \text{Опыт/Контроль}) \times 100.$$

При этом используются следующие методы оценки:

- метод подсчета клеток (преимущественно для лейкоза MOLT-4)
- МТТ-тест
- ^3H – тимидиновый тест

Перечисленные методы предусматривают ведение клеточных культур в условиях, указанных далее по тексту. При всех методах изучаемое соединение тестируют в трех параллельных измерениях при 4-х концентрациях – 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М и 10^{-4} М, для аналогов сахаров – до 10^{-3} М. Затем по кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации соединения определяют ИК₅₀ и ИК₉₀, то есть концентрации препарата, вызывающие торможение роста клеток на 50% и 90%.

После определения $ИК_{50}$ проводится дополнительное тестирование при 4-5 концентрациях, близких к $ИК_{50}$.

5.2. Критерии оценки цитотоксического эффекта

Соединение нового класса считается цитотоксически активным при $ИК_{50} \leq 10^{-4}M$, аналог известного противоопухолевого препарата оценивается как цитотоксичный, если его $ИК_{50} \leq ИК_{50}$ препарата сравнения [2, 8, 15].

Метод подсчета клеток (лейкоз MOLT-4)

Соединение полностью растворяют в питательной среде RPMI-1640 без сыворотки в двукратной концентрации по отношению к конечной и стерилизуют через мембранный фильтр с $d=0,22 \mu$. Если для растворения требуется специальный растворитель, он добавляется в эквивалентных концентрациях в контрольные образцы. В остальных случаях в качестве контроля используют среду RPMI-1640, содержащую 20 мМ буфера HEPES.

Суспензию разбавляют до концентрации 1×10^5 кл/мл средой RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка и 20 мМ буфера HEPES, и распределяют в пробирки для клеточных культур из боросиликатного стекла. В каждую пробирку помещают 1 мл среды, содержащей культуру, и 1 мл среды, содержащей исследуемое вещество в определенной концентрации. В итоге конечное разведение клеток составляет 5×10^4 кл/мл в общем объеме среды 2 мл. Закрытые пробками пробирки инкубируют в вертикальном положении в течение 48 часов при $37^{\circ}C$. По окончании инкубации содержание клеток в пробах (число клеток в мл среды) измеряют с помощью автоматического счетчика клеток. Для каждой концентрации испытуемого соединения вычисляют среднее значение из трех параллельных измерений и рассчитывают отношение к контрольному (без соединения) росту в процентах.

МТТ-тест для линий опухолевых клеток человека

МТТ-тест основан на ферментном восстановлении неокрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана.

Клетки в концентрации $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ в 100 мкл среды RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка и 20 мМ буфера HEPES, помещают в лунки 96-луночных микролитровых пластин с объемом лунки 200 мкл и инкубируют 24 часа при $37^{\circ}C$. Затем добавляют исследуемое соединение в различных концентрациях в объеме 100 мкл и инкубируют в течение 48 часов при тех же условиях. После этого содержащую препарат среду удаляют, в лунки добавляют 200 мкл среды без сыворотки, вносят 10 мкл готового раствора МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатном буфере) и дополнительно инкубируют в течение 4-х часов. По окончании инкубации удаляют среду из лунок и добавляют по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения образовавшихся в результате реакции синих кристаллов формазана. Оптическую плотность растворенного в ДМСО формазана измеряют колориметрически на оптическом счетчике для многолуночных планшетов при $\lambda=570$ нМ. Вычисляют величины $ИК_{50}$ и $ИК_{90}$ способом, указанным в п.5.1.

³Н-тимидиновый тест

³Н-тимидиновый тест может выполняться с использованием дисков для определения ³Нтимидина, включившегося в клетки, или с помощью измерения

радиоактивности кислотных гидролизатов кислотонерастворимой фракции клеток (РКГКФ).

С использованием дисков

Исследуемое соединение растворяют в среде RPMI-1640, содержащей 20 мМ буфера Нерес, в концентрации, превышающей конечную в 4 раза. Полученный раствор стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр с $d=0,22$ мк и делают серийные разведения в той же среде. Суспензию опухолевых клеток разбавляют средой RPMI-1640 (+20 мМ Нерес) до $3,2 \times 10^5$ кл/мл, распределяют по лункам в равных объемах по 50 мкл и инкубируют в течение 24 часов при 37°C . После этого в лунки вносят растворы соединения по 50 мкл из расчета 4 измерения на одну исследуемую концентрацию и продолжают инкубацию в течение 48 часов при 37°C . За 1 час до окончания инкубации в лунки вносят ^3H -тимидин аликвотами по 100 мкл до конечной концентрации 0,2 мкСи/мл. После инкубации клетки собирают на диски из фильтровальной бумаги и промывают 10 раз изотоническим раствором хлорида натрия на автоматическом сборщике клеток. Высушенные диски помещают в сцинтилляционные флаконы, содержащие 3 мл сцинтиллятора, и с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика подсчитывают радиоактивность в распадах в минуту на пробу. Среднее значение для четырех измерений уровня радиоактивности при каждой исследуемой концентрации выражают в % от контроля и вычисляют ИК_{50} и ИК_{90} .

С измерением РКГКФ

Опухолевые клетки в количестве $1,0-2,0 \times 10^5$ кл/мл в 2 мл среды RPMI-1640 помещают в стеклянные флаконы с $d=2$ см и инкубируют в течение 24 часов при 37°C . Затем в инкубационную среду вносят исследуемое соединение, растворенное в минимальном объеме среды (100 мкл), и инкубируют в течение 48 часов в тех же условиях. За 1 час до окончания инкубации в образцы вводят специфический предшественник ДНК ^3H -тимидин аликвотами по 100 мкл до конечной концентрации 1 мкСи/мл. По окончании инкубации клетки промывают раствором Хенкса и 2,5% HClO_4 и гидролизуют в 5% HClO_4 в течение 20 мин. при 80°C . Образцы гидролизатов в объеме по 0.1 мл помещают в сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Уровень радиоактивности проб (расп/мин) измеряют на жидкостном сцинтилляционном счетчике, выражают в % к контролю и вычисляют значения ИК_{50} и ИК_{90} .

6. Литература

1. Бычков М. Б.-Опухолевые плевриты (дифференциальная диагностика и лечение)//Русский медицинский журнал.-1999.-т.7-№10.-стр.458-461.- www.rmj.ru/rmj/t7/n10/3.htm.
2. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В. и соавт. Влияние L-лизин- α -оксидазы на кинетику клеточного цикла культивируемых клеток лимфомы Беркита//Экспериментальная онкология.-1985.-т.7.-№6.-стр. 42-44.
3. Лайт Р.У.-Болезни плевры//М.-1986.
4. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей//М.-изд. «Медицинская литература».-1962 г.-стр. 98.
5. Правила производства и контроля качества лекарственных средств//Технический регламент РФ. Москва.-2003 г.
6. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения//Трещалина Е.М., изд. «Практическая медицина», М., 2006 г., С.299.
7. Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П). Составители Г.Г. Полянская, Г.А. Сакута, М.Ю. Еропкин и соавт.; Коллекция ATCC CCL 185; ECACC 86012804//НИИ вирусологии РАМН; НИИ гриппа РАМН; ИНЦ РАН.-J.Natl.Cancer Inst.-1973.-v.51; Int. J. Cancer 1976.-v.17; Tissue Antigens.-1978.-v.11.
8. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М.//Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ.- В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У.Хабриева.-2 изд., перераб. и доп.-М.: ОАО изд. «Медицина», 2005 г.-832 С.-стр. 637-651.
9. Трещалина Е.М., Андропова Н.В. -Новые модели, созданные в ОНЦ для целей экспериментальной химиотерапии//Официальный сайт отделения химиотерапии НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.-www.oncomed.ru/text/new_models.html.
10. Энциклопедия лекарств, РЛС, 2006 г., вып.14, RLSNET.RU., С. 1391.
11. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second edt.//edt. by B.A.Teicher and P.A.Andrews.-Humana Press.-Totowa.-New Jersey.-2004.-p.450.
12. Bujlamwini J.K. – Novel anticancer drug discovery.- Current opinion in chemical biology, 1999, 3, p. 500-509
13. Jones D.A., Fitzpatric F.A.//Genopmics and the discovery of new drug target.- Current opinion in chemical biology.-1999.-№3.-p. 71-76.
14. Shan S.A.-Malignant pleural effusion//Clin. Chest Med.-1985.-v.6.-p.113–125.
15. Survey of antitumor and toxicity test systems//EORTC.-Screening and Pharmacology Group.-October.-1989.-p. 23-25.