

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ 4-АМИНОПИПЕРИДИНА, НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ HSP70, НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ

В. Н. Алдобаев¹✉, Л. В. Михина¹, М. А. Презент²¹ Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Серпухов, Россия² Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского, Москва, Россия

Применение низкомолекулярных агентов, мишенью которых являются молекулярные шапероны Hsp90 и Hsp70, стало основой для целого направления в терапии новообразований. В 2020 г. была проведена сравнительная оценка противоопухолевой активности на моделях *in vivo* трех производных 4-аминопиперидина ингибиторов Hsp70: N-(2-хлорбензил)-N-этил-1-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-амин (№ 1); 4-((метил(1-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил)амино)метил) бензонитрила (№ 2); N-(2,6-дихлорбензил)-1-(1-(2-(этилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил)-N-метилметанамина (№ 3). Целью работы было провести сравнительные испытания эффективности производных 4-аминопиперидина *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей. Противоопухолевую активность исследуемых веществ изучали на моделях лимфоидной лейкемии L1210 и меланомы B16. Субстанции № 2 и 3 продемонстрировали высокую статистически значимую ($p = 0,05$) активность в случае комбинированной терапии с циклофосфамидом для лейкоза L1210 (увеличение продолжительности жизни — 80–82%) и для меланомы B16 (торможение роста опухоли — 98–99,7%). В случае L1210 вещества № 2 и 3 в комбинации с цитостатиком попали в низшую категорию перспективности «+» для модельных лейкозов животных. В случае B16 вещества № 1–3 в комбинации с цитостатиком попадали либо в низшую категорию перспективности «+», либо в категорию «++» для модельных солидных опухолей животных. Испытанные дозировки субстанций продемонстрировали обещающие результаты лечения в комбинации с циклофосфамидом на перевиваемых опухолях лимфоидной лейкемии L1210 и меланомы B16 мышей. Полученные эффекты подтверждают перспективность применения низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 в составе комбинированной химиотерапии в онкологии.

Ключевые слова: белки теплового шока, ингибиторы Hsp70, перевиваемая опухоль, лейкемия L1210, меланома B16**Финансирование:** государственное задание ФМБА № 22.001.18.800.**Вклад авторов:** В. Н. Алдобаев — написание статьи, обобщение результатов, общее планирование работ; Л. В. Михина — обеспечение экспериментов на животных-опухоленосителях, отработка моделей; М. А. Презент — синтез субстанций для сравнительных испытаний.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИЦ ТБП (ветеринарный протокол № 695 от 12 ноября 2019 г.); условия содержания и уход за животными соответствовали нормативам СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», а также условиям, приведенным в руководстве «Guide for Care and Use of Laboratory Animals» (ILAR publication, 1996, National Academy Press, USA).✉ **Для корреспонденции:** Владимир Николаевич Алдобаев
ул. Ленина, д. 102А, пос. Большевик, Московская область, 142283; aldobae@toxicbio.ru**Статья получена:** 13.02.2021 **Статья принята к печати:** 12.03.2021 **Опубликована онлайн:** 21.03.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.009

EVALUATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF SOME 4-AMINOPIPERIDINE DERIVATIVES — LOW MOLECULAR WEIGHT HSP70 INHIBITORS — ON TRANSPLANTABLE MOUSE TUMORS

Aldobaev VN¹✉, Mikhina LV¹, Present MA²¹ Research Centre for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations of FMBA, Serpukhov, Russia² Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Low molecular weight compounds targeting chaperone proteins Hsp90 and Hsp70 have opened up a new avenue in the therapy of neoplasms. In 2020, we tested 3 Hsp70 inhibitors from the class of 4-aminopiperidine derivatives for their antitumor activity on *in vivo* models. The list of the tested compounds included N-(2-chlorobenzyl)-N-ethyl-1-(2-(methylthio)pyrimidin-4-yl)piperidin-4-amine (compound 1), 4-((methyl(1-(2-(methylthio)pyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl)amino)methyl) benzonitrile (compound 2) and N-(2,6-dichlorobenzyl)-1-(1-(2-(ethylthio)pyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl)-N-methylmethanamine (compound 3). The aim of this study was to compare the efficacy of 4-aminopiperidine derivatives *in vivo* using the models of transplantable murine L1210 lymphocytic leukemia and B16 melanoma. Compounds 2 and 3 used in combination with cyclophosphamide exhibited high cytotoxic activity ($p = 0.05$) against L1210 leukemia (an 80–82% increase in survival time) and B16 melanoma (98–99.7% tumor growth delay). For L1210 lymphocytic leukemia, compounds 2 and 3 used in combination with cyclophosphamide fell into the low (+) therapeutic potential category. For B16 melanoma, compounds 1, 2 and 3 used in combination with cyclophosphamide fell into either low (+) or moderate (++) therapeutic potential categories. On the whole, the tested doses of the compounds used in combination with cyclophosphamide hold promise for the therapy of L1210 leukemia and B16 melanoma in mouse models. Our findings confirm the potential of low molecular weight Hsp70 inhibitors for combination chemotherapy against cancer.

Keywords: heat shock proteins, Hsp70 inhibitors, transplantable tumor, L1210 leukemia, B16 melanoma**Funding:** the study was carried out under the State Assignment for FMBA № 22.001.18.800.**Author contribution:** Aldobaev VN planned the experiment, summarized its results and wrote this manuscript; Mikhina LV carried out the experiment in animal models; Present MA synthesized the tested compounds.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations (Protocol № 695 dated November 12, 2019). Housing conditions met the requirements of Sanitary Regulations 2.2.1.3218-14 (*Sanitary and Epidemiological Requirements for Design, Equipment and Maintenance of Vivarium Facilities*) and the guidelines provided in the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR publication, 1996, National Academy Press, USA).✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir N. Aldobaev
Lenina, 102A, pos. Bolshevik, Moscow oblast, 142283; aldobae@toxicbio.ru**Received:** 13.02.2021 **Accepted:** 12.03.2021 **Published online:** 21.03.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.009

Применение различных агентов, преимущественно низкомолекулярных, мишенью которых являются молекулярные шапероны, в особенности Hsp90 и Hsp70, стало в последние годы основой для целого направления в терапии новообразований. Экспрессия белков теплового шока Hsp90 и Hsp70 повышена во многих опухолях, с чем напрямую связана селективность накопления ингибиторов Hsp90 в опухолевой ткани [1]. Подавление экспрессии и/или снижение функциональной активности белков теплового шока сопровождается накоплением в клетке поврежденных, частично денатурированных белков с измененными биологическими функциями. Предполагается, что ингибиторы белков Hsp90 и Hsp70 как противоопухолевые средства могут быть наиболее эффективны в комбинации с традиционными цитостатиками для усиления их эффекта или преодоления лекарственной резистентности. В ряде недавних публикаций [2–4] обсуждается синтез различных ингибиторов белка теплового шока Hsp70, представляющих собой небольшие молекулы, структуры которых были получены с применением молекулярного докинга. В частности, описаны условия синтеза 67-ми производных 4-аминопиперидина — потенциальных ингибиторов Hsp70 [4]. В статье представлены результаты скрининга этих веществ на моделях культур клеток *in vitro*, а также оценки констант комплексообразования с Hsp70, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, и показатели ингибирования АТФ-азной активности Hsp70. В работе [5] описан альтернативный способ синтеза части производных 4-аминопиперидина из [4], а именно 1-(2-алкилтиопиримидин-4-ил)пиперидин-4-N-алкил, N-гетарил/арил аминов. Предложенный способ позволил существенно расширить возможности комбинаторики в синтезе целевых структур для проведения последующего скрининга на культурах клеток и дальнейшей разработки оптимальных кандидатов в качестве цитостатиков.

В 2018–2019 гг. была синтезирована коллекция производных 4-аминопиперидина, пересекающаяся с коллекцией [4], и проведен скрининг веществ по показателю цитостатической активности на культурах клеток *in vitro*. В результате скрининга было отобрано три производных 4-аминопиперидина для дальнейшего тестирования на моделях опухолей животных *in vivo*. Противоопухолевую активность исследуемых веществ изучали на перевиваемых опухолях мышей — лимфоидной лейкемии L1210 и меланоме B16 (солидной). Для лечения опухолей в качестве положительного контроля использовали циклофосфамид на основании рекомендаций [8] и как составляющую моделей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Для поддержания перевиваемых опухолей использовали самок мышей линии C₅₇Bl/6 и самок мышей линии DBA/2. Оценку специфической активности исследуемых препаратов *in vivo* проводили на опухолях, привитых самкам мышей гибридов BDF1 (C₅₇Bl/6 × DBA/2). Все животные к началу исследования имели вес 20–30 г. Животных приобретали в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА (филиал «Столбовая»; Московская область). Животных содержали в помещениях конвенциональной зоны вивария, животные других видов в этой комнате отсутствовали.

Животные были размещены в поликарбонатных клетках (Tecniplast, Италия, размером 26 × 17 × 12 см³), не

более шести особей в клетке. Клетки были оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток. Клетки размещали на стеллажах из нержавеющей стали (Tecniplast; Италия).

В качестве подстилки использовали древесную стружку («Лабораторкорм»; Россия). Толщина слоя подстилки в клетке достигала 5–10 мм.

Для кормления животных применяли стандартный гранулированный корм «Комбикорм ПК-120 для содержания лабораторных крыс, мышей и хомяков» («Лабораторкорм»; Россия). Корм для свободного неограниченного доступа помещали в кормовое углубление на крышке клетки.

Животные получали воду, соответствующую СанПиН 2.1.4.1074-01 (с изменениями от 2 апреля 2018 г.). Подготовленную фильтрованную водопроводную воду для свободного неограниченного доступа давали в стандартных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками. Подготовка воды обеспечивала отсутствие контаминации, способной повлиять на результаты исследования.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–26 °С и относительной влажности воздуха 30–70%. Температуру и влажность в экспериментальной комнате постоянно контролировали с помощью автоматической системы мониторинга климата. В комнате содержания животных поддерживали искусственное освещение в режиме: 12 ч — день / 12 ч — ночь. Кратность воздухообмена составляла 15 объемов/ч. Животные проходили карантин 14 суток.

Поддержание опухолевых линий

Противоопухолевую активность исследуемых веществ изучали *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей — лимфоидная лейкемия L1210 и меланоме B16 (солидная).

Клетки перевиваемых опухолей были получены из НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина (Россия), где их хранили в жидком азоте в криоконсерванте в ампулах по 1 мл. Транспортировку осуществляли в жидком азоте в металлическом термосе с двойными стенками. Восстановление после криоконсервации проводили по одинаковой схеме для обеих опухолей. После извлечения из жидкого азота ампулы с клетками опухоли помещали в термостат при 37 °С на 30 мин, после этого вводили по 0,5 мл клеточной суспензии мышам требуемой линии. Лимфоидную лейкемию L1210 поддерживали на мышах линии DBA/2, меланому B16 — на мышах линии C₅₇Bl/6. Опухоли сохраняли в жизнеспособном состоянии, перевивая интактным мышам через 5–6 дней (L1210) или через 16–20 дней (меланоме B16): асцит L1210 разводили в соотношении 1 : 60 физиологическим раствором, вводили внутривенно по 0,3 мл; 1 г опухоли меланомы B16 гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора, вводили подкожно по 0,5 мл.

Лечение исследуемых опухолей

Для лечения клетки опухоли прививали самкам мышей гибридов BDF1 (C₅₇Bl/6 × DBA/2), так же как при поддержании опухоли. Для прививки использовали опухолевые клетки, прошедшие после восстановления из жидкого азота не менее двух пассажей на мышах. Лечение лимфоидной лейкемии L1210 начинали через 24 ч после прививки опухоли, меланомы B16 — через

48 ч после прививки опухоли [6]. В отработку моделей входили определение эффективных доз и схем лечения мышей с опухолью противоопухолевым препаратом циклофосфамидом (Cyclophosphamide), в модели лейкемии L1210 выбор циклофосфамида в качестве положительного контроля был определен результатами ранее опубликованной работы [7], в модели меланомы B16 — практическими наработками. В случае мышей с лимфоидной лейкемией L1210 циклофосфамид вводили внутримышечно двукратно через сутки и трое суток после прививки опухоли в дозе 50 мг/кг. Данная схема лечения позволяла увеличить среднюю продолжительность жизни на 31–43% по сравнению с группой животных отрицательного контроля (ОК). Продолжительность жизни животных после прививки опухоли в рамках этой модели составляла 2–3 недели.

В случае мышей с меланомой B16 циклофосфамид вводили внутримышечно трехкратно через 2-е суток, 5 суток и 9 суток после прививки опухоли в дозе 80 мг/кг. При данной схеме лечения происходило торможение роста опухоли на 62–100% внутри месячного периода наблюдения и увеличение средней продолжительности жизни на 10–23% по сравнению с группой животных ОК. Продолжительность жизни животных после прививки опухоли в рамках этой модели составляла 4–5 недель.

Производные 4-аминопиперидина испытывали в водорастворимой форме гидрохлоридов. При лечении мышей с лимфоидной лейкемией L1210 вещества вводили внутривенно ежедневно в течение 7 дней, первая инъекция — на следующий день после прививки опухоли. При лечении мышей с меланомой B16 вещества вводили внутривенно ежедневно в течение 10 дней, первая инъекция — через 48 ч после прививки опухоли. Рецептуры для введения готовили в условиях ламинарного шкафа на стерильном физиологическом растворе (аптечная форма).

Статистическая обработка данных

Эффективность лечения оценивали относительно группы ОК (мыши с привитой опухолью, без лечения), по двум основным показателям: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) и торможение роста опухоли (ТРО), а также связанным показателям Т/С [6]. Для определения основных показателей вычисляли средние арифметические по группам животных для таких исходных показателей, как объем опухоли на определенный момент времени после прививки опухоли и продолжительность жизни в пределах одного эксперимента для модели меланомы B16, а также продолжительность жизни в пределах одного эксперимента для модели лимфоидной лейкемии L1210. Для установления статистически достоверных различий между основными показателями в пределах одного эксперимента использовали подход с привлечением аппарата функций нескольких случайных величин [7]. Вычисляли среднеквадратические отклонения (СКО) по группам животных для таких исходных показателей, как объем опухоли на определенный момент времени после прививки опухоли и продолжительность жизни в пределах одного эксперимента для модели меланомы B16, а также продолжительность жизни в пределах одного эксперимента для модели лимфоидной лейкемии L1210. На основании выборочных средних, СКО исходных показателей, а также объемов выборок (число животных в группах) с использованием специального программного модуля, написанного в Mathematica 9 [7], производили

расчеты математических ожиданий (МО) и границ 95%-х доверительных интервалов (ДИ) для основных показателей ТРО и УПЖ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффективности производных 4-аминопиперидина на модели лейкоза L1210

Для сравнительного тестирования противоопухолевой эффективности соединений N-(2-хлорбензил)-N-этил-1-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-амин (№ 1); 4-((метил(1-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил)амино)метил) бензонитрила (№ 2) и N-(2,6-дихлорбензил)-1-(1-(2-(этилтио)пиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил)-N-метилметанамина (№ 3) (далее по тексту вещества обозначены цифрами) предварительными экспериментами были определены их максимальные переносимые дозы (МПД) при однократном внутривенном введении мышам BDF1 (C57Bl/6 × DBA/2). После однократного введения проводили клинические наблюдения за состоянием животных и ежедневное определение веса в течение 7 суток. На основании клинических наблюдений и динамики веса были установлены следующие МПД: 250 мг/кг — для № 1, 200 мг/кг — для № 2, 300 мг/кг — для № 3. После введения указанных доз у большинства животных наблюдали повышенное сердцебиение, учащенное дыхание, клонические и тонические судороги. В течение 10–15 мин после инъекции указанные признаки исчезли, первые 2–3 суток у половины животных наблюдали снижение веса в пределах 2–8%, к окончанию периода наблюдений все животные набирали вес.

С учетом полученных данных по МПД и на основании рекомендаций для первичных испытаний противоопухолевой активности на модели лейкоза L1210 [8] были выбраны следующие дозы для курсового введения: № 1 — 200 мг/кг, для № 2 — 150 мг/кг, для № 3 — 250 мг/кг. Вещества вводили внутривенно ежедневно в течение 7 дней, первую инъекцию — через 24 ч после прививки опухоли. В эксперименте участвовало 8 групп животных, по 6 животных в группе, в группе ОК — 8 особей. В группе ОК животные не получали никакого лечения. В группе положительного контроля (ПК) животных лечили циклофосфамидом (табл. 1).

В табл. 2 представлены результаты серии из двух экспериментов представленного формата. В качестве оценки воспроизводимости в серии в таблице приведены размахи показателей УПЖ, Т/С и средние этих показателей.

По данным табл. 2 испытанные дозы субстанций № 1, 2 и 3 продемонстрировали относительно высокую активность по показателю УПЖ только в случае комбинированной терапии с циклофосфамидом.

Вещества № 2 и 3 в комбинации с цитостатиком попадают в низшую категорию перспективности «+» (Т/С ≥ 175%) для модельных лейкозов животных [6].

В комбинации с циклофосфамидом субстанции № 1, 2 и 3 продемонстрировали потенцирующий эффект.

Для сопоставления основных показателей эффективности лечения лимфоидной лейкемии L1210 в табл. 3 представлены математические ожидания показателей УПЖ и их 95%-е доверительные интервалы.

По данным табл. 3 с учетом границ доверительных интервалов были достигнуты статистически значимые ($p = 0,05$) различия величин показателей УПЖ для групп № 2 и 5; № 2 и 7 во II эксперименте.

Таблица 1. Первичные испытания противоопухолевой активности на модели лейкоза L1210

№ группы	Число животных в группе	Лечение	Дозы, мг/кг	Число инъекций на курс
1	6	Без лечения (ОК)	–	–
2	6	Циклофосфамид (ПК)	50	2
3	6	№ 1 Циклофосфамид	200 50	7 2
4	6	№ 1	200	7
5	6	№ 2 Циклофосфамид	150 50	7 2
6	6	№ 2	150	7
7	6	№ 3 Циклофосфамид	250 50	7
8	6	№ 3	250	7

Примечание: ОК — отрицательный контроль; ПК — положительный контроль.

Оценка эффективности производных 4-аминопиперидина на модели меланомы В-16

На основании результатов первичных испытаний противоопухолевой активности на модели лейкоза L1210 были проведены эксперименты с разовыми дозами: для вещества № 1 — 200 мг/кг; № 2 — 150 мг/кг; № 3 — 250 мг/кг на модели меланомы В16. Вещества вводили внутривенно ежедневно в течение 10 дней, первую инъекцию — через 48 ч после прививки опухоли. В эксперименте участвовало 8 групп животных, по 6 животных в группе, в группе ОК — 8 особей. В группе ОК животные не получали никакого лечения. В группе ПК животных лечили циклофосфамидом (табл. 4).

В табл. 5 показаны результаты серии из двух экспериментов представленного формата. В качестве оценки воспроизводимости в серии в таблице приведены размахи показателей ТРО, УПЖ и средние показателей ТРО.

По данным табл. 5 испытанные дозы субстанций № 1, 2 и 3 продемонстрировали относительно высокую активность по показателю ТРО только в случае комбинированной терапии с циклофосфамидом.

Вещества № 1, 2 и 3 в комбинации с цитостатиком попадают либо в низшую категорию перспективности «+» (ТРО < 51–80%), либо в категорию «++» (ТРО < 81–90%)

для модельных солидных опухолей животных на 13-е, 21-е и 28-е сутки с момента прививки опухоли [6].

В комбинации с циклофосфамидом потенцирующий эффект по показателю ТРО продемонстрировали субстанции № 2 и 3 на 13-е сутки; субстанции № 1, 2 и 3 — на 21-е сутки; субстанция № 3 — на 33-е сутки; аддитивный эффект продемонстрировали субстанция № 1 на 33-е сутки; субстанция № 2 — на 28-е и 33-е сутки; субстанция № 3 — на 28-е сутки наблюдения.

Заметное увеличение средней продолжительности жизни было выявлено только в группах, получавших лечение циклофосфамидом и субстанцией № 2 в комбинации с циклофосфамидом.

Последнее обстоятельство наряду с сопоставимой с веществами № 1 и 3 эффективностью, продемонстрированной на модели меланомы В16 (см. табл. 4) и на модели лейкоза L1210 (см. табл. 2), позволило выделить вещество № 2 как наиболее перспективное среди остальных для дальнейшей отработки дозировок и схем лечения с применением этой субстанции.

Для сопоставления основных показателей эффективности лечения меланомы В16 представлены математические ожидания показателей ТРО и УПЖ и их 95%-е доверительные интервалы (табл. 6).

Таблица 2. Первичные испытания противоопухолевой активности трех субстанций на модели лейкоза L1210 при курсовом внутривенном введении

№ группы	Лечение	УПЖ, %		Т/С	
		I*	II	I	II
1	Без лечения (ОК)	–		–	
2	ЦФА** (ПК)	31	43	131	143
		37 ***		137	
3	№ 1 + ЦФА	60	71	160	171
		65,5		166	
4	№ 1	10	17	110	117
		13,5		114	
5	№ 2 + ЦФА	63	80	163	180
		71,5		172	
6	№ 2	5	11	105	111
		8,0		108	
7	№ 3 + ЦФА	72	82	172	182
		77,0		177	
8	№ 3	0	5	100	105
		2,5		103	

Примечание: * — номер эксперимента; ** — циклофосфамид; *** — среднее значение.

Таблица 3. Математические ожидания (МО) показателей УПЖ и их 95%-е доверительные интервалы (ДИ)

№ группы	Лечение	I* МО УПЖ, % [ДИ] %	II МО УПЖ, % [ДИ] %
1	Без лечения (ОК)	–	–
2	ЦФА** (ПК)	32 [6; 66]	43 [29; 60]
3	№ 1 + ЦФА	62 [23; 110]	71 [48; 98]
4	№ 1	11 [–17; 46]	17 [–4; 40]
5	№ 2 + ЦФА	64 [34; 104]	80 [62; 100]
6	№ 2	6 [–21; 40]	11 [–7; 30]
7	№ 3 + ЦФА	74 [37; 121]	82 [61; 106]
8	№ 3	5 [–25; 41]	11 [–16; 40]

Примечание: * — номер эксперимента; ** — циклофосфамид.

По данным табл. 6 с учетом границ доверительных интервалов были достигнуты статистически значимые ($p = 0,05$) различия величин показателей ТРО для групп № 2 и 5; № 2 и 7 на 13-е сутки и для групп № 2 и 5 на 21-е сутки во II эксперименте. В остальных случаях комбинированного лечения увеличение показателей ТРО отмечено преимущественно на уровне тенденций.

В совокупности на основании данных по статистически значимым увеличениям показателей ТРО и УПЖ в случаях комбинированного лечения по сравнению с монотерапией циклофосфамидом (см. табл. 3 и 6) вещество № 2 было выделено как наиболее перспективное среди остальных для дальнейших исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ингибиторы Hsp70 принято классифицировать по механизму действия и по структурному принципу. Как правило, механизмы действия основаны на присоединении ингибиторов к нуклеотидсвязывающему домену и препятствовании функциональному взаимодействию с нуклеотидсвязывающим и субстратсвязывающим доменами Hsp70 [9–11], а также на ингибировании АТФ-азной активности Hsp70 в целом без уточнения механизмов [12–15], избирательной супрессии GRP78 [16–18], взаимодействия с EEVD-доменом Hsp70 [19], нарушении Hsp70/BAG3 взаимодействия [20–22] и др. В то же время ингибиторы разделяют на следующие основные

группы согласно их химической структуре: аналоги АТФ (Ver-155008) [9, 23], дигидропиримидины (MAL3-101, DMT3132, NSC 630668-R/1) [14, 15, 24], флавоноиды (эпигаллокатехин-3-галлат, кверцетин) [25, 26], имидазолы (Апоптозол, Az-TRP-O3) [27, 28], фенилметилсульфонамиды (Пифитрин-μ) [29, 30], родоцианины и их производные (YM-1, MKT-077, JG-98) [21, 31, 32], метиленовый синий [33] и еще несколько отдельных соединений.

Вещества, описанные в нашей работе, относятся к категории ингибиторов АТФ-азной активности Hsp70, но по своей химической природе образуют новое структурное направление низкомолекулярных неспецифичных ингибиторов семейства Hsp70. Данное исследование является логическим продолжением опубликованной ранее многоплановой работы [4], в которой был впервые проведен подбор *in silico* химических структур, обладающих сродством к сайту связывания АТФ белка Hsp70, предложены условия синтеза производных 4-аминопиперидина — потенциальных ингибиторов Hsp70, дана оценка константы комплексообразования веществ коллекции с белком Hsp70 методом поверхностного плазмонного резонанса и продемонстрировано ингибирование АТФ-азной активности Hsp70 с помощью адаптированного колориметрического теста. Там же были проведены скрининговые испытания оригинальной коллекции веществ на 16 линиях опухолевых клеток и двух линиях клеток фибробластов человека; для наиболее активных веществ величины LC_{50} находились в интервале 0,7–2,0 мкМ,

Таблица 4. Первичные испытания противоопухолевой активности на модели меланомы B16

№ группы	Число животных в группе	Лечение	Дозы, мг/кг	Число инъекций на курс
1	8	Без лечения (ОК)	–	–
2	6	Циклофосфамид (ПК)	80	3
3	6	№ 1 Циклофосфамид	200 80	10 3
4	6	№ 1	200	10
5	6	№ 2 Циклофосфамид	150 80	10 3
6	6	№ 2	150	10
7	6	№ 3 Циклофосфамид	250 80	10 3
8	6	№ 3	250	10

Таблица 5. Результаты двух экспериментов первичных испытаний противоопухолевой активности трех субстанций на модели меланомы В16 при курсовом внутривенном введении

№ группы	Лечение	ТРО, %								УПЖ, %	
		13 сут.		21 сут.		28 сут.		33 сут.			
		I*	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	Без лечения (ОК)	–		–		–		–		–	
2	ЦФА* (ПК)	77	87	62	83	62	78	31	65	18	23
		82***		72,5		70		48			
3	№ 1 + ЦФА	71	93	67	86	52	76	40	66	–	
		82		76,5		64		53			
4	№ 1	–		–		2	11	5	12	–	
		–		–		8,5		8,5			
5	№ 2 + ЦФА	89	100	75	98	69	82	46	55	24	30
		94,5		86,5		75,5		50,5			
6	№ 2	–		–		17	22	8	17	–	
		–		–		19,5		12,5			
7	№ 3 + ЦФА	82	100	67	94	56	86	47	89	–	
		91		80,5		71		68			
8	№ 3	13	21	–		15	28	12	18	–	
		17		–		21,5		15			

Примечание: * — номер эксперимента; ** — циклофосфамид.

Таблица 6. Результаты двух экспериментов первичных испытаний противоопухолевой активности трех субстанций на модели меланомы В16 при курсовом внутривенном введении

№ группы	Лечение	МО ТРО, % [ДИ] %					МО УПЖ, % [ДИ] %
		13 сут.		21 сут.	28 сут.	33 сут.	
1	Без лечения (ОК)	–		–	–	–	–
2	ЦФА** (ПК)	I*	82 [23; 99]	57 [–51; 115]	59 [16; 83]	24 [–51; 70]	22 [–24; 86]
		II	85 [55; 95]	80 [47; 94]	76 [50; 91]	63 [29; 82]	29 [–23; 112]
3	№ 1 + ЦФА	I	78 [–41; 148]	62 [–14; 92]	49 [–12; 83]	35 [–46; 88]	–
		II	92 [75; 96]	84 [53; 99]	72 [38; 98]	64 [–23; 89]	–
4	№ 1	I	–	–	–5 [–157; 96]	–3 [–122; 72]	–
		II	–	–	–3 [–97; 58]	5 [–82; 54]	–
5	№ 2 + ЦФА	I	92 [68; 95]	71 [6; 104]	67 [16; 102]	40 [–19; 77]	28 [–13; 89]
		II	99 [95; 104]	98 [94; 99]	79 [57; 95]	51 [–3; 88]	19 [–10; 115]
6	№ 2	I	–	–	11 [–108; 87]	0 [–110; 68]	–
		II	–	–	9 [–75; 65]	10 [–77; 63]	–
7	№ 3 + ЦФА	I	86 [43; 96]	62 [–20;99]	55 [4; 84]	42 [–17; 77]	–
		II	99,7 [95; 104]	93 [82;97]	84 [67; 96]	88 [78; 94]	–
8	№ 3	I	32 [–189; 95]	–	9 [–113; 86]	4 [–98; 66]	–
		II	7 [–183; 83]	–	16 [–72; 78]	11 [–66; 54]	–

Примечание: * — номер эксперимента; ** — циклофосфамид.

а для одного из веществ ЛД₅₀ достигала 870 мг/кг на модели мышей в остром эксперименте при пероральном введении.

В данной работе была поставлена цель пойти дальше и оценить потенциал производных 4-аминопиперидина как ингибиторов Hsp70 на моделях животных-опухоленосителей. Что и было сделано на мышах с перевиваемыми опухолями лимфоидная лейкемия L1210 и меланома В16 (солидная).

ВЫВОДЫ

В ходе предварительных испытаний, как ожидалось, высокие дозировки субстанций продемонстрировали обещающие эффекты лечения в комбинации с цитостатиком циклофосфамидом.

В ряде экспериментов для веществ № 2 и № 3 были достигнуты статистически значимые различия ($p = 0,05$)

величин основных показателей эффективности лечения для групп животных, получавших комбинированную терапию и монотерапию циклофосфамидом, а именно: по показателю УПЖ на модели лейкемии L1210 и по показателю ТРО на модели меланомы B16 на 13-е и 21-е сутки с момента прививки опухоли.

На основании совокупности данных по величинам противоопухолевого эффекта на моделях лейкемии L1210 и меланомы B16 из трех веществ было выбрано одно —

наиболее активное производное 4-аминопиперидина: 4-((метил(1-(2-(метилтио) пиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил)амино)метил) бензонитрил в форме гидрохлорида для дальнейшей отработки способов и схем введения.

Величины полученных эффектов подтверждают перспективность применения представленных низкомолекулярных ингибиторов белков теплового шока, в частности Hsp70, в составе комбинированной химиотерапии в онкологии.

Литература

1. Kitano H. Cancer robustness: tumour tactics. *Nature*. 2003; 426: 125.
2. Taldone T, Kang Y, Patel H, Patel M, Patel P. Heat Shock Protein 70 Inhibitors. 2,5'-Thiodipyrimidines, 5-(Phenylthio)pyrimidines, 2-(Pyridin-3-ylthio)pyrimidines, and 3-(Phenylthio)pyridines as Reversible Binders to an Allosteric Site on Heat Shock Protein 70. *J Med Chem*. 2014; 57: 1208–24.
3. Kang Y, Taldone T, Patel H, Patel P. Heat Shock Protein 70 Inhibitors. 2,5'-Thiodipyrimidine and 5-(Phenylthio)pyrimidine Acrylamides as Irreversible Binders to an Allosteric Site on Heat Shock Protein 70. *J Med Chem*. 2014; 57: 1188–207.
4. Zeng Y, Cao R, Zhang T, Li S, Zhong W. Design and synthesis of piperidine derivatives as novel human heat shock protein 70 inhibitors for the treatment of drug-resistant tumors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 97: 19–31.
5. Алдобаев В. Н., Президент М. А., Заварзин И. В. Синтез N,N-диалкил-1-(2-алкилтиопиримидин-4-ил)пиперидин-4-аминов — потенциальных ингибиторов белков теплового шока. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2018; 11: 1–4.
6. Миронов А. Н., редакторы. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая. М.: ФГБУ «НЦЭМСП» Минздравсоцразвития России, 2012; с. 640–69.
7. Алдобаев В. Н., Масликов А. А., Еременко Л. А., Мазанова А. А. Расчет критических характеристик распределений общепринятых показателей противоопухолевой терапии ТРО и УПЖ и оценка их значимости на основе моделирования функций плотности распределения. *Токсикологический вестник*. 2017; 3 (144): 2–7.
8. Софьина З. П., редактор. Первичный отбор противоопухолевых препаратов: методические рекомендации. М.: МЗ СССР, 1980; с. 11–23.
9. Wen W, Liu W, Shao Y, Chen L. VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP70 with potent anti-cancer activity on lung cancer cell lines. *Exp Biol Med*. 2014; 239 (5): 638–45.
10. Yu B, Yang H, Zhang X, Li H. Visualizing and quantifying the effect of the inhibition of HSP70 on breast cancer cells based on laser scanning microscopy. *Technol Cancer Res Treat*. 2018; 17: 1–7.
11. Tian Y, Xu H, Farooq AA, Nie B, Chen X, et al. Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. *Phytother Res*. 2018; 23 (7): 1320–31.
12. Howe MK, Bodoor K, Carlson DA, et al. Identification of an allosteric small-molecule inhibitor selective for the inducible form of heat shock protein 70. *Chem Biol*. 2014; 21 (12): 1648–59.
13. Wisén S, Bertelsen EB, Thompson AD, et al. Binding of a small molecule at a protein–protein interface regulates the chaperone activity of hsp70–hsp40. *ACS Chem Biol*. 2010; 5 (6): 611–22.
14. Adam C, Baeurle A, Brodsky JL, et al. The HSP70 modulator MAL3-101 inhibits Merkel cell carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e92041.
15. Wright CM, Chovatiya RJ, Jameson NE, et al. Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16 (6): 3291–301.
16. Hwang JH, Kim JY, Cha MR, et al. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator. *J Cell Physiol*. 2008; 215 (1): 243–50.
17. Park HR, Ryoo IJ, Choo SJ, et al. Glucose-deprived HT-29 human colon carcinoma cells are sensitive to verrucosidin as a GRP78 down-regulator. *Toxicology*. 2007; 229 (3): 253–61.
18. Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, Ahn SG. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2010; 10 (1): 276.
19. Ramya T, Surolia N, Surolia A. 15-Deoxyspergualin inhibits eukaryotic protein synthesis through eIF2α phosphorylation. *Biochem J*. 2007; 401 (2): 411–20.
20. Koren J, Miyata Y, Kiray J, O'Leary JC, Nguyen L, et al. Rhodacyanine derivative selectively targets cancer cells and overcomes tamoxifen resistance. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e35566.
21. Colvin TA, Gabai VL, Gong J, et al. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res*. 2014; 74 (17): 4731–40.
22. Li X, Colvin T, Rauch JN, et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14 (3): 642–8.
23. Tang X, Tan L, Shi K, et al. Gold nanorods together with HSP inhibitor-VER-155008 micelles for colon cancer mild-temperature photothermal therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018; 8 (4): 587–601.
24. Fewell SW, Smith CM, Lyon MA, et al. Small molecule modulators of endogenous and co-chaperone-stimulated Hsp70 ATPase activity. *J Biol Chem*. 2004; 279 (49): 51131–40.
25. Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, et al. (–) Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res*. 2006; 66 (18): 9260–69.
26. Z-p Y, L-j C, L-y F, Tang M-h, G-l Y, et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (10): 3193–99.
27. Ko S-K, Kim J, Na DC, et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol*. 2015; 22 (3): 391–403.
28. Park S-H, Baek K-H, Shin I. Subcellular Hsp70 inhibitors promote cancer cell death via different mechanisms. *Cell Chem Biol*. 2018; 25 (10): 1242–54.
29. Leu J-J, Pimkina J, Pandey P, Murphy ME, George DL. HSP70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethynylsulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells. *Mol Cancer Res*. 2011; 9 (7): 936–47.
30. Zhou Y, Ma J, Zhang J, He L, Gong J, Long C. Pifithrin-μ is efficacious against non-small cell lung cancer via inhibition of heat shock protein 70. *Oncol Rep*. 2017; 37 (1): 313–22.
31. Wadhwa R, Sugihara T, Yoshida A, et al. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res*. 2000; 60 (24): 6818–21.
32. Yaglom JA, Wang Y, Li A, et al. Cancer cell responses to Hsp70 inhibitor JG-98: Comparison with Hsp90 inhibitors and finding synergistic drug combinations. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 3010.
33. Wang AM, Morishima Y, Clapp KM, et al. Inhibition of hsp70 by methylene blue affects signaling protein function and ubiquitination and modulates polyglutamine protein degradation. *J Biol Chem*. 2010; 285 (21): 15714–23.

References

1. Kitano H. Cancer robustness: tumour tactics. *Nature*. 2003; 426: 125.
2. Taldone T, Kang Y, Patel H, Patel M, Patel P. Heat Shock Protein 70 Inhibitors. 2,5'-Thiodipyrimidines, 5-(Phenylthio)pyrimidines, 2-(Pyridin-3-ylthio)pyrimidines, and 3-(Phenylthio)pyridines as Reversible Binders to an Allosteric Site on Heat Shock Protein 70. *J Med Chem*. 2014; 57: 1208–24.
3. Kang Y, Taldone T, Patel H, Patel P. Heat Shock Protein 70 Inhibitors. 2,5'-Thiodipyrimidine and 5-(Phenylthio)pyrimidine Acrylamides as Irreversible Binders to an Allosteric Site on Heat Shock Protein 70. *J Med Chem*. 2014; 57: 1188–207.
4. Zeng Y, Cao R, Zhang T, Li S, Zhong W. Design and synthesis of piperidine derivatives as novel human heat shock protein 70 inhibitors for the treatment of drug-resistant tumors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 97: 19–31.
5. Aldobaev VN, Prezent MA, Zavarzin IV. Sintez N,N-dialkil-1-(2-alkiltiopirimidin-4-il)piperidin-4-aminov — potencial'nyh ingibitorov belkov teplovogo shoka. *Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja*. 2018; 11: 1–4. Russian.
6. Mironov AN, redaktery. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv, chast' pervaja. M.: FGBU «NCJemSP» Minzdravsocrazvitiya Rossii, 2012; s. 640–69. Russian.
7. Aldobaev VN, Maslikov AA, Eremenko LA, Mazanova AA. Raschet kriticheskikh harakteristik raspredelenij obshheprinjatyh pokazatelej protivopuholevoj terapii TRO i UPZh i ocenka ih znachimosti na osnove modelirovaniya funkcij plotnosti raspredelenija. *Toksikologicheskij vestnik*. 2017; 3 (144): 2–7. Russian.
8. Sofina ZP, redaktor. Pervichnyj otbor protivopuholevyh preparatov: metodicheskie rekomendacii. M.: MZ SSSR, 1980; s. 11–23. Russian.
9. Wen W, Liu W, Shao Y, Chen L. VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP70 with potent anti-cancer activity on lung cancer cell lines. *Exp Biol Med*. 2014; 239 (5): 638–45.
10. Yu B, Yang H, Zhang X, Li H. Visualizing and quantifying the effect of the inhibition of HSP70 on breast cancer cells based on laser scanning microscopy. *Technol Cancer Res Treat*. 2018; 17: 1–7.
11. Tian Y, Xu H, Farooq AA, Nie B, Chen X, et al. Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. *Phytother Res*. 2018; 23 (7): 1320–31.
12. Howe MK, Bodoor K, Carlson DA, et al. Identification of an allosteric small-molecule inhibitor selective for the inducible form of heat shock protein 70. *Chem Biol*. 2014; 21 (12): 1648–59.
13. Wisén S, Bertelsen EB, Thompson AD, et al. Binding of a small molecule at a protein–protein interface regulates the chaperone activity of hsp70–hsp40. *ACS Chem Biol*. 2010; 5 (6): 611–22.
14. Adam C, Baeurle A, Brodsky JL, et al. The HSP70 modulator MAL3-101 inhibits Merkel cell carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e92041.
15. Wright CM, Chovatiya RJ, Jameson NE, et al. Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16 (6): 3291–301.
16. Hwang JH, Kim JY, Cha MR, et al. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to ptericidin A, a GRP78 down-regulator. *J Cell Physiol*. 2008; 215 (1): 243–50.
17. Park HR, Ryoo IJ, Choo SJ, et al. Glucose-deprived HT-29 human colon carcinoma cells are sensitive to verrucosidin as a GRP78 down-regulator. *Toxicology*. 2007; 229 (3): 253–61.
18. Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, Ahn SG. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2010; 10 (1): 276.
19. Ramya T, Surolia N, Surolia A. 15-Deoxyspergualin inhibits eukaryotic protein synthesis through eIF2 α phosphorylation. *Biochem J*. 2007; 401 (2): 411–20.
20. Koren J, Miyata Y, Kiray J, O'Leary JC, Nguyen L, et al. Rhodacyanine derivative selectively targets cancer cells and overcomes tamoxifen resistance. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e35566.
21. Colvin TA, Gabai VL, Gong J, et al. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res*. 2014; 74 (17): 4731–40.
22. Li X, Colvin T, Rauch JN, et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14 (3): 642–8.
23. Tang X, Tan L, Shi K, et al. Gold nanorods together with HSP inhibitor-VER-155008 micelles for colon cancer mild-temperature photothermal therapy. *Acta Pharm Sin. B*. 2018; 8 (4): 587–601.
24. Fewell SW, Smith CM, Lyon MA, et al. Small molecule modulators of endogenous and co-chaperone-stimulated Hsp70 ATPase activity. *J Biol Chem*. 2004; 279 (49): 51131–40.
25. Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, et al. (–) — Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res*. 2006; 66 (18): 9260–69.
26. Z-p Y, L-j C, L-y F, Tang M-h, G-l Y, et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (10): 3193–99.
27. Ko S-K, Kim J, Na DC, et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol*. 2015; 22 (3): 391–403.
28. Park S-H, Baek K-H, Shin I. Subcellular Hsp70 inhibitors promote cancer cell death via different mechanisms. *Cell Chem Biol*. 2018; 25 (10): 1242–54.
29. Leu J-J, Pimkina J, Pandey P, Murphy ME, George DL. HSP70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethynylsulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells. *Mol Cancer Res*. 2011; 9 (7): 936–47.
30. Zhou Y, Ma J, Zhang J, He L, Gong J, Long C. Pifithrin- μ is efficacious against non-small cell lung cancer via inhibition of heat shock protein 70. *Oncol Rep*. 2017; 37 (1): 313–22.
31. Wadhwa R, Sugihara T, Yoshida A, et al. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res*. 2000; 60 (24): 6818–21.
32. Yaglom JA, Wang Y, Li A, et al. Cancer cell responses to Hsp70 inhibitor JG-98: Comparison with Hsp90 inhibitors and finding synergistic drug combinations. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 3010.
33. Wang AM, Morishima Y, Clapp KM, et al. Inhibition of hsp70 by methylene blue affects signaling protein function and ubiquitination and modulates polyglutamine protein degradation. *J Biol Chem*. 2010; 285 (21): 15714–23.