

<https://doi.org/10.25207/1608-6228-2019-26-1-101-107>

## К ВОПРОСУ О БЕЗОПАСНОСТИ 4-АЛКИЛ-ЗАМЕЩЕННОГО СОЕДИНЕНИЯ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ

М. О. Дудина<sup>1</sup>, Е. В. Блинова<sup>1,\*</sup>, И. Я. Моисеева<sup>2</sup>, Е. А. Самышина<sup>3</sup>,  
И. Р. Суслова<sup>1</sup>, Д. С. Блинов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, д. 8, г. Москва, 119991, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пензенский государственный университет», ул. Красная, д. 40, г. Пенза, 440026, Россия

<sup>3</sup> Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», ул. Кирова, д. 23, Московская область, г. Старая Купавна, 142450, Россия

### Аннотация

**Цель.** Исследовать острую токсичность соединения АХ-554 при внутрижелудочном введении, а также определить его эффективные цитотоксические концентрацию и дозу.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 76 нелинейных белых лабораторных мышах обоего пола весом 18–22 г, 150 мышах-самцах линии C<sub>57</sub>BL/6, культуре опухолевых клеток ЛСС. Острая токсичность 4-алкил-замещенного соединения АХ-554 в виде гранулята таблеточной массы изучена при внутрижелудочном введении с анализом результатов по Литчфилду и Уилкоксону. Эффективная доза вещества определена в сингенной опухолевой модели на мышах-самцах C<sub>57</sub>Bl/6 с перевитой карциномой легкого Льюис, эффективная концентрация — в культуре опухолевых клеток.

**Результаты.** Исследование острой токсичности АХ-554 при внутрижелудочном введении в виде гранулята таблеточной массы показало, что оно является нетоксичным веществом. В диапазоне доз от 21,2 до 384 мг/кг АХ-554 подавляет рост опухоли у мышей с сингенной карциномой легкого от 20 до 90%, при этом высшая терапевтическая доза превышает минимально действующую более чем в 18 раз. Полученная закономерность сохраняется и при использовании АХ-554 в культуре опухолевых клеток. Результаты исследования могут быть использованы при создании лекарственного средства на основе соединения АХ-554.

**Заключение.** Производное 2-амино-4Н-хромена АХ-554 обладает оптимальным профилем безопасности, поскольку является нетоксичным веществом с большой широтой противоопухолевого действия.

**Ключевые слова:** соединение 2-амино-4Н-хромена, острая токсичность, внутрижелудочное введение, широта противоопухолевого действия, карцинома легкого Льюис

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Финансовая поддержка:** работа частично поддержана Государственной программой России (№ 14.N08.11.084).

**Благодарности:** авторы признательны лауреату Государственной премии Российской Федерации профессору С.Я. Скачиловой за любезно предоставленную субстанцию вещества для исследования.

**Для цитирования:** Дудина М.О., Блинова Е.В., Моисеева И.Я., Самышина Е.А., Сулова И.Р., Блинов Д.С. К вопросу о безопасности 4-алкил-замещенного соединения с противоопухолевым действием. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019; 26(1): 101–107. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2019-26-1-101-107>

Поступила 28.10.2018

Принята после доработки 15.01.2019

Опубликована 25.02.2019

## ON THE QUESTION OF THE SAFETY OF A 4-ALKYL-SUBSTITUTED COMPOUND WITH ANTI-TUMOUR ACTION

Marina O. Dudina<sup>1</sup>, Ekaterina V. Blinova<sup>1,\*</sup>, Inessa Ya. Moiseeva<sup>2</sup>,  
Elena A. Samyshina<sup>3</sup>, Irina R. Suslova<sup>1</sup>, Dmitrii S. Blinov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya str., 8, Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup> Penza State University, Krasnaya str., 40, Penza, 440026, Russia

<sup>3</sup> Joint-stock company "All-Union Scientific Center for the Safety of Biologically Active Substances", Kirova str., 23, Staraja Kupavna, 142450, Russia

### Abstract

**The aim was** to investigate the acute toxicity of the AX-554 compound following its intragastric administration, as well as to determine the effective cytotoxic concentration and dose of this preparation.

**Materials and methods.** The study was performed using 76 nonlinear white laboratory mice of both sexes weighing 18–22 g, 150 male mice of C<sub>57</sub>BL/6 line and LCC tumour cell culture. The acute toxicity of the AX-554 4-alkyl-substituted compound in the form of granulated pellet mass was studied following its intragastric administration, with the results being analysed according to Litchfield and Wilcoxon. The effective dose of the substance was determined using a syngeneic tumour model in C<sub>57</sub>Bl/6 male mice with inoculated Lewis lung carcinoma. The effective concentration of the compound was determined in a tumour cell culture.

**Results.** Our study of the acute toxicity of AH-554 after its intragastric administration in the form of granulate tablet mass have confirmed AH-554 to be a non-toxic substance. In doses ranging from 21.2 to 384 mg/kg, AH-554 is observed to suppress tumour growth in mice with syngeneic lung carcinoma at a level from 20 to 90%, with the highest therapeutic dose exceeding the minimum effective one by more than 18 times. This pattern is also observed when AH-554 is applied in the culture of tumour cells. The results of this study can be used for developing a pharmaceutical based on the AH-554 compound.

**Conclusion.** The AH-554 compound, 2-amino-4H-chromene derivative, is characterized by an optimal safety profile due its low toxicity and a wide range of anti-tumour action.

**Keywords:** 2-amino-4H-chromene compound, acute toxicity, intragastric administration, wide-range anti-tumour activity, Lewis lung carcinoma

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial support:** the study has been partly supported by the Russian State program (No. 14.N08.11.084).

**Acknowledgements:** the authors express their sincere gratitude to Prof. S. Ya. Skachilova, the Russian State Prize winner for granting the synthesized substance for study.

**For citation:** Dudina M.O., Blinova E.V., Moiseeva I.Ya., Samyshina E.A., Suslova I.R., Blinov D.S. On the Question of the Safety of a 4-Alkyl-Substituted Compound with Anti-Tumour Action. *Kubanskii Nauchnyi Meditsinskii Vestnik*. 2019; 26(1): 101–107. (In Russ., English abstract). <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2019-26-1-101-107>

Submitted 28.10.2018

Revised 15.01.2019

Published 25.02.2019

## Введение

Одним из наиболее существенных обстоятельств, ограничивающих клиническое использование противоопухолевых лекарственных средств, является их высокая токсичность и малая широта терапевтического действия. Недостаточная безопасность химиопрепаратов диктует необходимость поиска новых фармакологических средств, подходов, позволяющих обеспечивать высокую активность и хорошую переносимость при курсовом введении. Одним из перспективных классов веществ с небольшой прямой цитотоксической активностью, селективно подавляющих синтез структурного онкогена в опухолевых клетках — тубулина-бета класса 3 [1], а также ингибирующих внутриклеточные рецепторные киназы [2], являются производные 2-амино-4Н-хроменов [3].

В нашей стране разработана экономически обоснованная химическая технология получения веществ рассматриваемой химической природы с высокой степенью выхода конечного продукта [4]. Одним из достоинств представителей 2-амино-4Н-хроменов является их высокая биодоступность при энтеральном применении, что открывает широкие перспективы для создания пероральной лекарственной формы.

*Цель работы:* исследовать острую токсичность 4-алкил-замещенного соединения класса аминохроменов АХ-554 при внутрижелудочном введении, а также определить эффективные цитотоксические концентрацию и дозу в аспекте изучения безопасности его применения.

## Материал и методы

Исследование выполнено в соответствии с этическими требованиями к работе с экспериментальными животными — Федеральным законом «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными; правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», введенными

в действие 01.07.2016 и одобренными Локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева».

Работа выполнена на 76 нелинейных белых лабораторных мышах обоего пола весом 18–22 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 150 мышам-самцам линии C<sub>57</sub>BL/6, полученных из питомника SPF-лабораторных животных — филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (г. Пущино), а также на культуре опухолевых клеток карциномы легкого Льюис (LLC).

Использовали гранулят таблеточной массы (готовая лекарственная форма) вещества АХ-554 производства АО «ВНЦ БАВ» (Россия). В опытах *in vivo* гранулят вводили животным через зонд G24 в 2% крахмальном геле. При исследовании на культуре клеток применяли субстанцию АХ-554 (чистота 98,56%) того же производителя.

Острая токсичность АХ-554 изучена при однократном внутрижелудочном введении нелинейным белым лабораторным мышам (по 6 особей обоего пола в группе) в диапазоне доз от 1000 до 7500 мг/кг. Индивидуальный объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывался исходя из значения массы тела и корректировался после каждого взвешивания. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток после введения. О токсичности соединений судили по гибели животных и общей картине интоксикации. Расчет показателей ЛД<sub>100</sub>, ЛД<sub>50</sub>, а также доверительного интервала проводили методом Литчфилда и Уилкоксона в соответствии с действующими методическими рекомендациями [5, 6].

Эффективную дозу вещества определяли на сингенной опухолевой модели — LLC из банка опухолевых штаммов ФГБУ «Национальный исследовательский медицинский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Модель воспроизводили трехступенчатой перевивкой клеток опухолевого штамма [7]. Эффективную дозу определяли в соответствии с международными рекомендациями [8].

Эффективные концентрации фармацевтической субстанции АХ-554 определяли в культуре клеток LLC при 72-часовой инкубации в среде с добавлением АХ-554 в диапазоне концентраций от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  М на основе анализа содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде культивирования методом количественного иммунофлуоресцентного анализа с использованием исследовательского диагностического набора ЛДГ-2 производства «Ольвекс Диагностика» (Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием дисперсионного и пробит-анализа [9], а также пакета программ по статистике SPSS.

### Результаты и обсуждение

При внутрижелудочном введении ЛД<sub>50</sub> гранулята таблеточной массы АХ-554 составила  $5228 \pm 115$  мг/кг, следовательно, вещество относится к 4 классу токсичности и опасности — нетоксичным соединениям [10].

Для определения диапазона эффективных противоопухолевых доз АХ-554 были использованы дозы, составляющие 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 и 10% от показателя ЛД<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении мышам. Для каждой дозы выявляли максимальный противоопухолевый эффект по индексу торможения роста опухоли (ТРО) на 7 сутки после прекращения введения вещества. С помощью построения графика «доза — эффект» (рис. 1) определяли эффек-

тивные дозы (effective dose) ЕД<sub>20</sub>, ЕД<sub>50</sub> и ЕД<sub>90</sub>, вызывающие ТРО на 20, 50 и 90% соответственно.

При вычислении эффективных доз готовой лекарственной формы АХ-554 ЕД<sub>20</sub> составила 21,2 мг/кг, ЕД<sub>50</sub> — 137,6 мг/кг, в то время как ЕД<sub>90</sub> — 384,0 мг/кг.

Следовательно, для дальнейшего доклинического исследования специфической противоопухолевой активности и механизмов антибластомного действия АХ-554 необходимо использовать следующие дозы: минимально-действующая — 21,2 мг/кг, среднетерапевтическая — 137,6 мг/кг и высшая терапевтическая — 384,0 мг/кг. Поскольку доза 384 мг/кг соответствует 7,68% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для данного пути введения у мышей, она соответствует условиям, согласно которым высшая терапевтическая доза не должна превышать 10% от показателя ЛД<sub>50</sub> [7].

При расчете терапевтических индексов (ТИ<sub>20</sub>, ТИ<sub>50</sub> или ТИ<sub>90</sub> как соотношение соответствующих летальной и эффективной доз) АХ-554 нами были получены следующие показатели: 94,3, 36,3 и 23,4 соответственно (рис. 2). На основании полученных данных можно судить о широте терапевтического действия исследуемого соединения: в частности, значение высшей терапевтической дозы в 18 раз превышает показатель минимально действующей дозы.

Исследование эффективных концентраций фармацевтической субстанции АХ-554

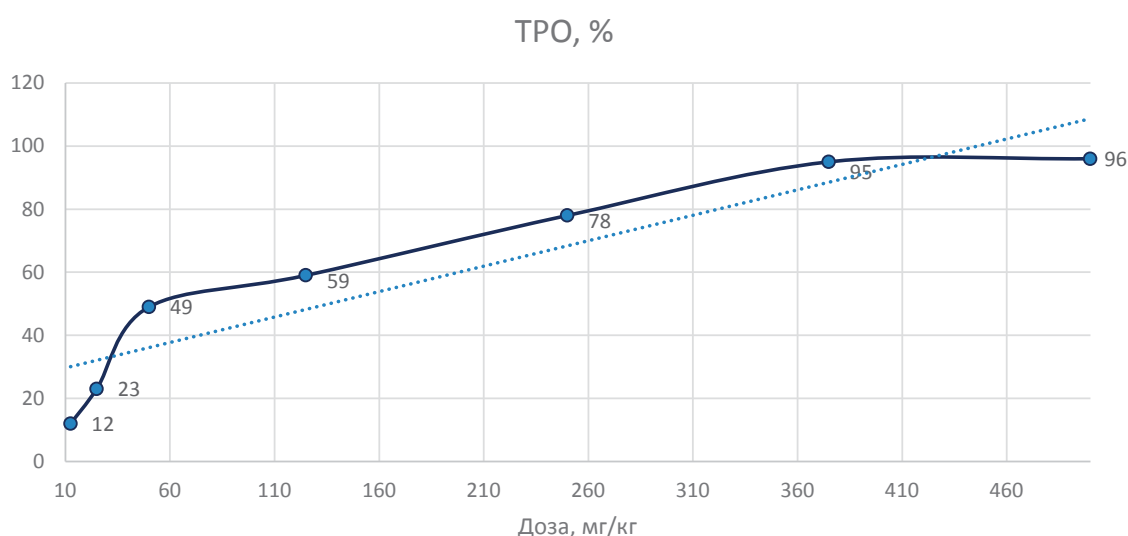


Рис. 1. Кривая «доза — эффект» (по значению индекса ТРО) на 7 сутки после завершения внутрижелудочного введения АХ-554 в диапазоне доз от 0,25 до 10% от ЛД<sub>50</sub> мышам С<sub>57</sub>В16 с LLC.

Fig. 1. "Dose — effect" curve (according to TGI index value) on the 7th day after the completion of the intragastric administration of АН-554 in a dose ranging from 0.25 to 10% of LD<sub>50</sub> in С<sub>57</sub>В16 mice with LLC.

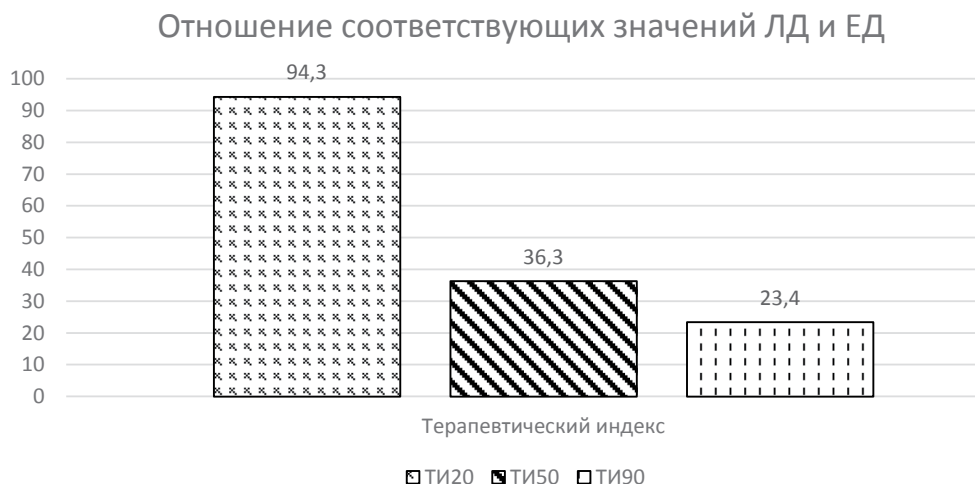


Рис. 2. Значения терапевтических индексов на 7 сутки после завершения внутрижелудочного введения АХ-554 в диапазоне доз от 0,25 до 10% от ЛД<sub>50</sub> мышам С<sub>57</sub>В16 с LLC.

Fig. 2. Therapeutic index values on the 7th day after the completion of the intragastric administration of АХ-554 in a dose ranging from 0.25% to 10% of LD<sub>50</sub> in С<sub>57</sub>В16 mice with LLC.

определено в культуре клеток LLC при их инкубировании в среде с добавлением фармацевтической субстанции АХ-554 в семи концентрациях: 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> М. По результатам *in vitro* исследований были вычислены показатели ЭК<sub>20</sub>, ЭК<sub>50</sub> и ЭК<sub>90</sub> — расчетные концентрации, вызывающие гибель 20, 50 и 90% клеточной популяции в культуре соответственно (рис. 3, 4).

При вычислении показателей ЭК<sub>20</sub>, ЭК<sub>50</sub> и ЭК<sub>90</sub> нами были получены следующие результаты (рис. 4): 10<sup>-8</sup>, 2×10<sup>-7</sup> и 10<sup>-4</sup> М.

Таким образом, диапазон эффективных цитотоксических концентраций АХ-554 в отношении опухолевых клеток карциномы легкого Lewis находится в пределах от 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-4</sup> М, при этом средняя эффективная концентрация составляет 2×10<sup>-7</sup> М, что сопоставимо с концентрациями фармацевтической субстанции вещества в плазме крови и легочной ткани при ее внутрижелудочном введении нелинейным мышам в ЕД<sub>20</sub>, ЕД<sub>50</sub> и ЕД<sub>90</sub> и внутривенном введении в ЕД<sub>50</sub> в рамках проведения фармакокинетических исследований фармацевтической субстанции.

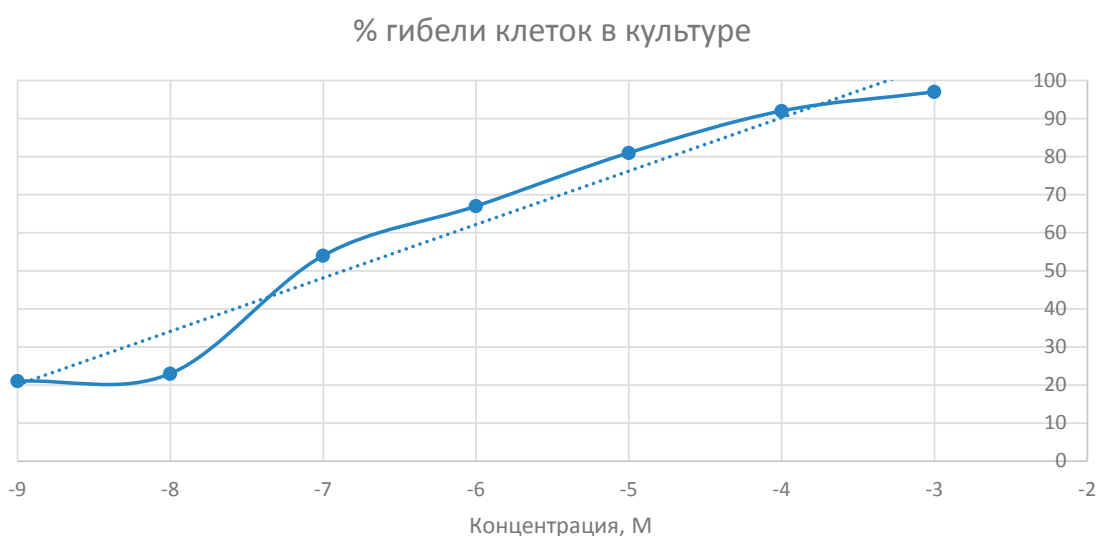


Рис. 3. Кривая «концентрация — эффект» (по значению % гибели клеток культуры LLC при ее 24-часовом инкубировании с фармацевтической субстанцией АХ-554 в диапазоне концентраций от 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-3</sup> М.

Fig. 3. “Concentration — effect” curve (by the value of cell death % of LLC culture during its 24-hour incubation with АХ-554 in the concentration range from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-3</sup> М.

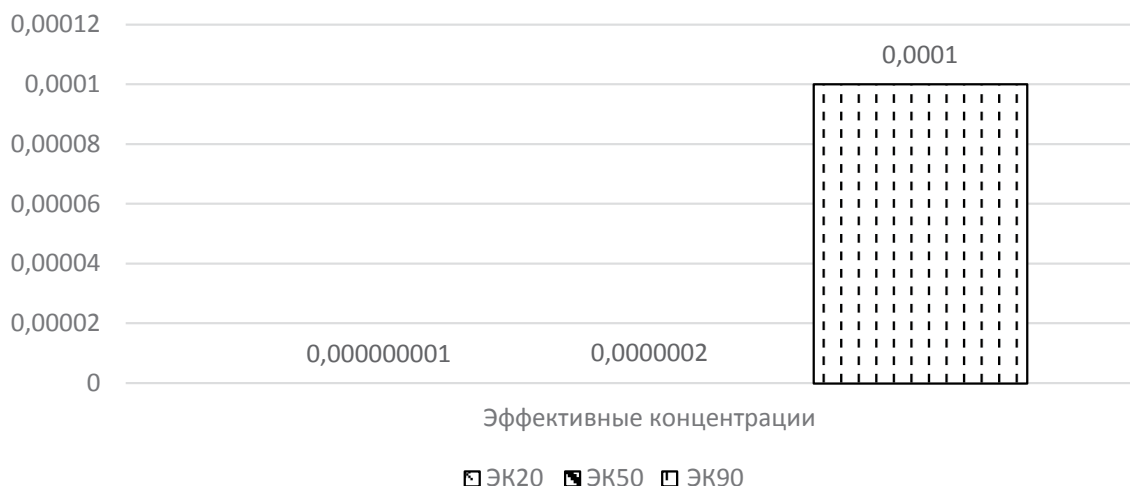


Рис. 4. Значения показателей эффективных концентраций фармацевтической субстанции АХ-554, определенных по цитотоксическому действию в культуре клеток LLC.  
 Fig. 4. АН-554 effective concentrations determined by the cytotoxic effect in LLC cell culture.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что АХ-554 в виде готовой лекарственной формы и фармацевтической субстанции обладает оптимальным профилем безопасности, характеризующимся крайне низкой острой токсичностью, большой шириной терапевтического действия и высокой противоопухолевой активностью в отношении сингенной опухоли легких мышей.

#### Выводы

1. Лекарственная форма 4-алкил-замещенного производного 2-амино-4Н-хромена в виде гранулята таблеточной массы при внутривен-

лудочном введении является практически нетоксичной.

2. Вещество АХ-554 в диапазоне доз от 21,2 до 384 мг/кг и концентраций от  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  М подавляет соответственно рост опухоли в модельной системе у мышей и вызывает гибель злокачественных клеток карциномы легкого Льюиса (в опытах *in vitro* от 20 до 90%).
3. Высшая терапевтическая доза АХ-554 превышает минимально действующую более чем в 18 раз, что свидетельствует о большой широте терапевтического действия вещества.

#### Список литературы

1. Seve P., Dumontet C. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* 2008; 9(2): 168–175. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70029-9
2. Fallah-Tafti A., Tiwari R., Shizari A.N. et al. 4-Aryl-4H-chromene-3-carbonitrile derivatives: evaluation of Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Med. Chem.* 2011; 7(5): 466–472.
3. Patil S.A., Patil R., Pfeffer L.M., Miller D.D. Chromenes: potential new chemotherapeutic agents for cancer. *Future Med. Chem.* 2013; 5(14): 1647–1660. DOI: 10.4155/fmc.13.126
4. Bardashov I.N., Alekseeva A.U., Ershov O.V., Grishanov D.A. One-pot synthesis of 4-alkyl-2-amino-4H-chromene derivatives. *Heterocycl. Commun.* 2015; 21(3): 175–177. DOI: 10.1515/hc-2015-0077
5. Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л., Гуськова Т.А., Дурнев А.Д. *Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств.* В кн.: Мионов А.Н., ред. *Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств.* М.: Гриф и Ко; 2012: 13–51.
6. Gad S.C., ed. *Animal models in toxicology.* 2nd ed. Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York; 2007: 950.
7. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. *Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств.* В кн.: Мионов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* М.: Гриф и Ко; 2012: 640–654.
8. Geran R.I., Greenberg N.H., MacDonald M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against tumor

- and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 1972; 3: 1–103.
9. Glantz S.A. *Primers in Biostatistics*. 7th Ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2012: 320.
10. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(3): 32–34.

## References

1. Seve P., Dumontet C. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* 2008; 9(2): 168–175. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70029-9
2. Fallah-Tafti A., Tiwari R., Shizari A.N. et al. 4-Aryl-4H-chromene-3-carbonitrile derivatives: evaluation of Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Med. Chem.* 2011; 7(5): 466–472.
3. Patil S.A., Patil R., Pfeffer L.M., Miller D.D. Chromenes: potential new chemotherapeutic agents for cancer. *Future Med. Chem.* 2013; 5(14): 1647–1660. DOI: 10.4155/fmc.13.126
4. Bardashov I.N., Alekseeva A.U., Ershov O.V., Grishanov D.A. One-pot synthesis of 4-alkyl-2-amino-4H-chromene derivatives. *Heterocycl. Commun.* 2015; 21(3): 175–177. DOI: 10.1515/hc-2015-0077
5. Arzamastsev E.V., Berezovskaya I.V., Verstakova O.L., Gus'kova T.A., Durnev A.D. *Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv*. In.: Mironov A.N., ed. *Rukovodstvo po doklinicheskomu izucheniyu lekarstvennykh sredstv*. M.: Grif i Ko; 2012: 13–51 (in Russ.).
6. Gad S.C., ed. *Animal models in toxicology*. 2nd ed. Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York; 2007: 950.
7. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. *Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu protivoopukholevoi aktivnosti lekarstvennykh sredstv*. In: Mironov A.N., ed. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. Part one. M.: Grif i Ko; 2012: 640–654 (in Russ.).
8. Geran R.I., Greenberg N.H., MacDonald M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against tumor and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 1972; 3: 1–103.
9. Glantz S.A. *Primers in Biostatistics*. 7th Ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2012: 320.
10. Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003; 37(3): 139–141 (In Eng.).

## Контактная информация / Corresponding author

**Блинова Екатерина Валериевна**; тел.: +7 (927) 640-86-15.  
e-mail: [bev-sechenov@mail.ru](mailto:bev-sechenov@mail.ru)

**Ekaterina V. Blinova**; tel.: +7 (927) 640-86-15.  
e-mail: [bev-sechenov@mail.ru](mailto:bev-sechenov@mail.ru)