

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037279**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.03

(21) Номер заявки
201791384

(22) Дата подачи заявки
2015.12.04

(51) Int. Cl. *A61K 31/19* (2006.01)
A61K 31/191 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЛАКТАТ КАЛЬЦИЯ**

(31) **10-2014-0192158; 10-2015-0142828**

(32) **2014.12.29; 2015.10.13**

(33) **KR**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/KR2015/013191**

(87) **WO 2016/108446 2016.07.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕТИМЕДИ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
КО., ЛТД (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ким Хван Мук, Чон Кын Ён, Сим Чэ
Чон, Чан Ён Су (KR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-20110117210
WO-A2-2010111650
US-B1-6306902
EP-A1-2799060
WO-A1-03063836**

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания, содержащей лактат кальция в качестве активного ингредиента, способный отщеплять лактат, который может нарушать метаболизм раковых клеток и соответственно эффективно ингибировать такие виды активности, как рост, инвазия и метастазирование раковых клеток; к применению указанной композиции для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта и к способу лечения ракового заболевания или подавления метастазирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества указанной фармацевтической композиции.

B1**037279****037279****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания, содержащей лактат кальция в качестве активного ингредиента, способный отщеплять лактат, который может нарушать метаболизм раковых клеток и соответственно эффективно ингибировать такие виды активности, как рост, инвазия и метастазирование раковых клеток; к применению указанной композиции для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта и к способу лечения ракового заболевания или подавления метастазирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества указанной фармацевтической композиции.

Уровень техники

В соответствии с опубликованными в 2011 г. данными общее число зарегистрированных случаев раковых заболеваний в Южной Корее в 2011 г. составило 218017. Исходные коэффициенты заболеваемости составили 439,2 для мужчин и 431,0 для женщин на каждые 100000 человек. Максимальный вклад в заболеваемость вносят рак желудка, рак толстой и прямой кишки, рак легкого, рак печени и рак молочной железы. Частота возникновения указанных 5 наиболее распространенных раковых заболеваний составляет более чем 50% от всех случаев раковых заболеваний. Наиболее распространенные раковые заболевания у мужчин представлены в указанном порядке раком желудка, толстой и прямой кишки, раком легкого и раком печени, а у женщин - раком молочной железы, раком толстой и прямой кишки, раком желудка и раком легкого, помимо рака щитовидной железы. При достижении возраста средней продолжительности жизни риск развития ракового заболевания у южнокорейцев составляет 36,9%. Согласно прогнозам раковое заболевание разовьется у 2 из 5 мужчин (38,1%) и у 1 из 3 женщин (33,8%). Стандартизованный по возрасту коэффициент (ASR) в Южной Корее, скорректированный по стандартному населению мира, составил 295,1 на 100000 человек, что ниже показателя для США (318,0) или Австралии (323,0), однако выше среднего значения согласно данным ОЭСР (271,5). В соответствии с данными Национальной службы статистики уровень смертности от рака в Южной Корее в 2013 г. составил 75334 человека, что составляет 28,3% от общего уровня смертности, и согласно прогнозам в течение 2-3 лет уровень смертности от рака увеличится на 8,8%. Соответственно по всему миру предпринимаются попытки использовать разнообразные способы лечения раковых заболеваний, отличающихся высоким коэффициентом заболеваемости и смертности. На настоящий момент хирургическое лечение, противораковая лекарственная терапия или лучевая терапия являются наилучшим выбором для агрессивного лечения рака на ранних стадиях и распространенного рака.

Для хирургического лечения ракового заболевания необходимо идентифицировать класс и тип опухоли путем проведения диагностики. В большинстве случаев для постановки диагноза осуществляют биопсию. Хирургия представляет собой радикальное лечение с удалением всех окружающих опухоль лимфатических узлов и первичных очагов посредством радикальной резекции. Радикальную резекцию проводят преимущественно с целью полного излечения. Уровень смертности в результате проведения резекции снизился до 1-3%, а показатель 5-летней выживаемости пациентов вырос более чем на 50%. Однако хорошо известно, что у пациентов, прошедших хирургическое лечение, имеется риск рецидива. Кроме того, хирургическое вмешательство может повлечь за собой острые побочные эффекты, такие как кровотечение, кишечная непроходимость, повреждение сосудов, повреждение мочеочника, разрыв прямой кишки, пневмония и эмболия легких в результате осложнений, и соответственно может потребоваться повторная операция. Химиотерапия представляет собой лечение заболевания с применением лекарственных средств, т.е. противораковых лекарственных средств, воздействующих на раковые клетки, распространившиеся по всему организму. Однако большинство противораковых лекарственных средств предназначены для подавления быстрого роста раковых клеток и соответственно могут повреждать как раковые клетки, так и, в меньшей степени, нормальные клетки. При этом сильно повреждаются быстро делящиеся или быстро пролиферирующие нормальные клетки, такие как клетки крови, эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, в том числе полости рта, волос и репродуктивной системы, что приводит к таким побочным эффектам, как анемия, выпадение волос и генетопатия. В тяжелых случаях противораковые лекарственные средства могут угнетать функцию костного мозга и приводить к развитию инфекции в течение 2-3 недель лечения, что приводит к смертельному исходу в результате сепсиса. Радиационная терапия относится к лечению, индуцирующему апоптоз в раковых тканях в результате воздействия высокоэнергетическим излучением. Указанное лечение относится к способам лечения, позволяющим пациенту вести обычный образ жизни, однако может приводить к локальному повреждению здоровой кожи в качестве побочного эффекта высокоэнергетического излучения. При метастатическом раке раковые стволовые клетки могут обладать устойчивостью к облучению, и могут наблюдаться рецидивирование или метастазы.

Для устранения указанных недостатков ведутся активные исследования, посвященные разработке способа лечения, объединяющего радиационную терапию с химиотерапией или генной терапией. Например, в выложенном описании изобретения к заявке на патент Кореи № 2002-0042606 описана радиосенсибилизирующая композиция, содержащая производное N-ацетилфитосфингозина и производное диметилфитосфингозина; в выложенном описании изобретения к заявке на патент Кореи № 2003-0055878 описано радиосенсибилизирующее средство, содержащее церамиды и их производные, и диме-

тилсфингозин, который представляет собой ингибитор сфингозинкиназы; в заявке на патент Кореи № 620751 описана композиция для радиосенсибилизации, содержащая панонол и его фармацевтически приемлемую соль в качестве активных ингредиентов. Однако при комбинировании радиационной терапии с вышеописанными противораковыми лекарственными средствами для улучшения терапевтических эффектов радиационной терапии помимо побочных эффектов радиационной терапии может наблюдаться токсичность указанных противораковых лекарственных средств, например воспаление на участке проведения лучевой терапии, расстройство ЖКТ, тошнота, рвота и диарея. Соответственно применение противораковых лекарственных средств ограничено. Кроме того, известно, что благодаря иммуносупрессивному окружению опухоль не может быть уничтожена полностью и сохраняется высокий риск рецидива.

Соответственно существует настоятельная потребность в разработке новых видов лечения, легко применимых и способных обеспечивать эффективное лечение рака при меньшем влиянии на нормальные ткани. Результаты недавних исследований показали, что раковая клетка обладает собственными характеристиками и при сохранении указанных характеристик способна к непрерывному росту. Во-первых, раковая клетка отличается постоянным поддержанием сигналов дифференцировки. Например, хорошо известно о дифференцировке и выживании клеток за счет поддержания β -катениновой сигнализации. В нормальной клетке избыточная β -катениновая сигнализация ингибируется в результате убиквитинирования белков, но раковая клетка избегает убиквитинирования β -катенина и в ней постоянно поддерживаются ростовые сигналы. Во-вторых, у раковой клетки имеется система синтеза избыточного количества молочной кислоты путем гликолиза с использованием глюкозы для высокоэффективного получения энергии. В-третьих, раковая клетка отличается способностью избегать апоптоза. За счет активации поли(АДФ-рибоза)полимеразы (ПАРП), молекулы "ускользания" от апоптоза, раковая клетка избегает апоптоза, демонстрируя устойчивость к различным видам направленной генной терапии и поддерживая непрерывное развитие опухоли. В-четвертых, раковые заболевания отличаются высокой способностью к инвазии или метастазированию, а также способны создавать собственное окружение путем ангиогенеза. При постоянном росте ракового новообразования вокруг опухоли происходит некроз и снижается поступление кислорода, что приводит к увеличению уровней индуцируемого гипоксией фактора (HIF)-1 α ; известно, что он прямо или косвенно задействован при вышеописанном явлении.

На основании вышеописанных характеристик раковых заболеваний были разработаны различные противораковые лекарственные средства, нацеленные на регуляцию клеточного роста и подавление метастазирования. Однако при использовании ингибиторов тирозинкиназы, опосредующих сигналы роста, наблюдались неудовлетворительные результаты лечения и лекарственная устойчивость. При разработке противораковых лекарственных средств поиска способа эффективного подавления роста раковых клеток, регулируемого сложной системой сигнальных путей, по-прежнему сопряжены с трудностями.

В указанных обстоятельствах авторы настоящего изобретения согласно настоящему описанию провели исследования и попытались разработать способ эффективного подавления роста раковых клеток и лечения раковых заболеваний и в результате пришли к описанному изобретению, обнаружив, что лактатные соли металлов, способные отщеплять лактат, который может нарушать метаболизм раковых клеток и соответственно эффективно ингибировать в раковых клетках такие виды активности, как рост, инвазия и метастазирование раковых клеток, могут применяться в качестве активных ингредиентов противоракового лекарственного средства.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта, содержащая эффективное количество лактата кальция в качестве активного ингредиента.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение фармацевтической композиции, содержащей лактат кальция, для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения ракового заболевания или подавления метастазирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции в виде однократной дозы, при этом содержание лактата кальция в указанной композиции составляет от 2,5 до 25 мМ, и при этом указанную композицию вводят подкожно, внутривенно или внутрь опухоли.

В соответствии с примерами вариантов реализации настоящего изобретения лактатные соли металлов согласно настоящему описанию не имеют побочных эффектов и нарушают метаболизм основного пути получения энергии для подавления роста раковых клеток, индуцируют апоптоз, а также подавляют экспрессию фактора, который индуцирует устойчивость к облучению, и соответственно могут широко применяться для более эффективного противоракового лечения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведены структурные схемы и таблица для сравнения структуры и энергии связи лактата кальция, лактата натрия и лактата калия, молекулярная структура которых аналогична структуре лактата кальция.

На фиг. 2 представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие результаты

сравнения уровней кальция в раковых клетках в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция (CaLa).

На фиг. 3 приведен график, отражающий результаты сравнения уровней лактата в раковых клетках в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция (CaLa).

На фиг. 4 представлены графики, отражающие изменения внутриклеточных и внеклеточных показателей pH раковых клеток, на которые воздействовали лактатом кальция; левый график отражает изменение внеклеточных показателей pH раковых клеток, а правый график отражает изменение внутриклеточных показателей pH раковых клеток.

В верхней части фиг. 5 приведены электрофоретические изображения, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии мРНК β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях, а в нижней части фиг. 5 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии белка β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях.

На фиг. 6 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии общего белка β -катенина и активированного β -катенина в клетках линий рака молочной железы человека (MCF-7 и MDA-MB-231), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях.

На фиг. 7 представлены результаты ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга, демонстрирующие эффект лактата кальция в линии раковых клеток в условиях гипоксии. График отражает уровни экспрессии мРНК транспортера глюкозы (GLUT)-1 и гексокиназы 2 (HK2), вовлеченных в раннюю стадию гликолиза, а снимки вестерн-блотов демонстрируют уровни экспрессии белка HK2.

На фиг. 8 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие эффекты лактата кальция на уровни экспрессии белка ПАРП и расщепленного ПАРП в клетках линий рака молочной железы человека (MCF-7 и MDA-MB-231).

На фиг. 9 приведены снимок вестерн-блота и график, отражающий результаты сравнения уровней экспрессии белка ПАРП в клетках линий рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция, 5-индансульфонамидом (ИС) в качестве ингибитора карбоангидразы или коричной кислотой (КК) в качестве ингибитора монокарбоксилатного транспортера MCT-4, который обеспечивает отток лактата, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 10 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии белка ПАРП в клетках линий меланомы человека (SKMEL-02 и SKMEL-28), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях.

На фиг. 11a представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие изменения уровней экспрессии белка ЛДГ-Б в линиях раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 11b представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие флуоресцентное поглощение клетками линии раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 11c представлен график количественного анализа, отражающий уровни развития флуоресценции в зависимости от уровней экспрессии белка ЛДГ-Б.

На фиг. 12 представлен график, отражающий изменения концентраций пирувата в раковых клетках в зависимости от воздействия лактатом кальция.

На фиг. 13a представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие изменения уровней экспрессии белка ПДК в линиях раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 13b представлен график количественного анализа, отражающий уровни развития флуоресценции ПДК в зависимости от воздействия лактатом кальция.

На фиг. 14a представлены графики количественного анализа, отражающие изменения концентрации α -КТ в линиях раковых клеток при воздействии лактатом кальция в нормальной среде. На фиг. 14b представлен график количественного анализа, отражающий изменения концентрации α -КТ в линиях раковых клеток при воздействии лактатом кальция в не содержащей глутамина среде.

На фиг. 15 (верхняя часть) представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие уровни экспрессии белка HIF-1A в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч при воздействии 2,5 мМ лактатом кальция или без лактата кальция, в условиях нормоксии или гипоксии, а в нижней части фиг. 15 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие уровни экспрессии белка HIF-1a в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч при воздействии 0,5, 1,5 и 2,5 мМ лактатом кальция в условиях гипоксии.

На фиг. 16a представлены графики количественного анализа, отражающие результаты измерения уровней экспрессии мРНК ФРЭС в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч с 2,5 мМ лактатом кальция или без лактата кальция в условиях нормоксии или гипоксии. На фиг. 16b представлены графики количественного анализа, отражающие результаты измерения уровней экспрессии белка ФРЭС в клетках линий рака толстой и прямой кишки че-

ловека (НСТ-116 и НТ-29), культивированных в течение 24 ч с 2,5 мМ лактатом кальция или без лактата кальция в условиях нормоксии или гипоксии.

На фиг. 17 приведены флуоресцентные изображения, демонстрирующие уровни формирования трубки эндотелиальными клетками сосудов человека (HUVEC), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Клетки HUVEC культивировали с применением среды для культивирования линий раковых клеток с разными концентрациями лактата кальция.

На фиг. 18 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака толстой и прямой кишки, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция.

На фиг. 19 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака молочной железы, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция.

На фиг. 20 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии меланомы, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция.

На фиг. 21a представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака молочной железы (MCF-7), в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. На фиг. 21b представлены результаты проточно-цитометрических анализов, демонстрирующие уровень выживаемости клеток линии рака молочной железы (MCF-7), на которые не воздействовали лактатом кальция. На фиг. 21c представлены результаты проточно-цитометрических анализов, демонстрирующие уровень выживаемости клеток линии рака молочной железы (MCF-7), на которые воздействовали лактатом кальция. На фиг. 21d представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака молочной железы (MDA-MB231) в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. На фиг. 21e представлены результаты проточно-цитометрических анализов, демонстрирующие уровень выживаемости клеток линии рака молочной железы (MDA-MB231), на которые не воздействовали лактатом кальция. На фиг. 21f представлены результаты проточно-цитометрических анализов, демонстрирующие уровень выживаемости клеток линии рака молочной железы (MDA-MB231), на которые воздействовали лактатом кальция.

На фиг. 22 представлены микроскопические изображения, демонстрирующие изменение сферообразования в стволовых клетках линий рака толстой и прямой кишки при лечении лактатом кальция.

На фиг. 23 представлены репрезентативные изображения и графики количественного анализа (слева: НСТ-116, в середине: НТ-29, справа: DLD-1), отражающие сравнение колониеобразующей способности клеток линии рака толстой и прямой кишки в зависимости от концентрации лактата кальция.

На фиг. 24a представлены графики и таблицы, отражающие результаты сравнения колониеобразующей способности клеток линии меланомы SKMEL-02 в зависимости от концентрации лактата кальция. На фиг. 24b представлены график и таблица, отражающие результаты сравнения колониеобразующей способности клеток линии меланомы SKMEL-28 в зависимости от концентрации лактата кальция.

На фиг. 25a представлены графики количественного анализа, отражающие результаты сравнения уровня выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция, 5-индансульфонамидом (ИС) в качестве ингибитора карбоангидразы или коричной кислотой (КК) в качестве ингибитора монокарбоксилатного транспортера МСТ-4, который обеспечивает отток лактата, по отдельности. На фиг. 25b представлены график количественного анализа, отражающий результаты сравнения показателей жизнеспособности клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция, 5-ИС в качестве ингибитора карбоангидразы, или КК в качестве ингибитора монокарбоксилатного транспортера МСТ-4, который обеспечивает отток лактата, в комбинации.

На фиг. 26 представлены графики количественного анализа, отражающие результаты сравнения эффектов лактата кальция на уровень выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки, культивированных в ультранизкоадгезивных планшетах.

На фиг. 27 приведено схематическое изображение схемы эксперимента с лечением лактатом кальция в моделях на животных.

На фиг. 28 приведено изображение, демонстрирующее изменение уровней экспрессии белков ПАРП, экстрагированных из опухолевой ткани, в модели ксенотрансплантатов на животных, в зависимости от способа лечения лактатом кальция и в зависимости оттого, проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция.

На фиг. 29 представлены фотографии, демонстрирующие изменение уровней экспрессии HIF-1 α или ГАФДГ в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция, по оценке в белках, экстрагированных из опухолевых тканей в моделях на животных с пероральным введением лактата кальция.

На фиг. 30 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того,

проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция в модели на животных, в которой 2,5 мМ лактат кальция вводили перорально.

На фиг. 31 показаны вестерн-блоты, демонстрирующие изменение уровней экспрессии HIF-1 α или ГАФДГ, для белка, экстрагированного из опухолевых тканей в модели ксенотрансплантатов на животных, в зависимости от того, вводился или не вводился лактат кальция в область вокруг опухоли.

На фиг. 32 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того, проводилось или не проводилось лечение путем введения 2,5 мМ лактата кальция вокруг опухоли.

На фиг. 33 представлены репрезентативные изображения, демонстрирующие изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от инъектирования 2,5 мМ лактата кальция вокруг опухоли.

На фиг. 34 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того, проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция, в модели на животных, в которой 25 мМ лактат кальция инъектировали подкожно вокруг межлопаточной области.

На фиг. 35 представлены репрезентативные изображения, демонстрирующие изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от лечения лактатом кальция.

На фиг. 36 приведено схематическое изображение схемы эксперимента с комбинированной терапией облучением и лактатом кальция в моделях на животных.

На фиг. 37a представлен график, отражающий изменение объема опухоли со временем в модели ракового заболевания на животных, которую получали путем имплантации клеток HT-29 линии рака толстой и прямой кишки в боковую область, в зависимости от того, проводилось лечение облучением и лактатом кальция, по отдельности или в комбинации. На фиг. 37b представлен график, отражающий изменение объема опухоли со временем в модели ракового заболевания на животных, которую получали путем имплантации клеток HCT-116 линии рака толстой и прямой кишки в боковую область, в зависимости от того, проводилось лечение облучением и лактатом кальция, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 38a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 38b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 39a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 39b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 40a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации. На фиг. 40b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 1 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 41a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации. На фиг. 41b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 42a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 42b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 43a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 43b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 44a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ гефинитибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 44b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ гефинитибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 45a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (Hep3B) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ сора-

фенибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 45b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (Нер3В) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ сорафенибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 46a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ ирино-теканом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 46b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ иринотеканом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 47a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ эрлотинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 47b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ эрлотинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 48a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ сунитинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 48b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ сунитинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 49a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 5, 10 и 20 нМ метотрексатом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 49b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 5, 10 и 20 нМ метотрексатом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 50a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ карбоплатином, по отдельности или в комбинации. На фиг. 50b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ карбоплатином, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 51a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,6, 1,3 и 2,5 нМ доцетакселом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 51 b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,6, 1,3 и 2,5 нМ доцетакселом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 52a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,4 и 8 мкМ лапатинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 52b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,4 и 8 мкМ лапатинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 53a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака почки человека (Сак1-1) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,3, 0,5 и 1 нМ эверолимусом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 53b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака почки человека (Сак1-1) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,3, 0,5 и 1 нМ эверолимусом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 54a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба, по отдельности или в комбинации. На фиг. 54b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 55a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ оксалиплатином, по отдельности или в комбинации. На фиг. 55b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ оксалиплатином, по отдельности или в комбинации.

Подробное описание изобретения

В представленном ниже подробном описании изобретения приведены ссылки на сопроводительные чертежи, являющиеся частью настоящего описания. Иллюстративные примеры вариантов реализации, представленные в настоящем подробном описании, чертежи и формула изобретения не предназначены для ограничения. Могут быть осуществлены другие варианты реализации и внесены иные изменения без отступления от существа и объема заявленного в настоящем документе изобретения.

Авторы настоящего изобретения согласно настоящему описанию провели различные исследования,

направленные на разработку способа лечения ракового заболевания путем эффективного подавления роста и метастазирования раковых клеток, сосредоточив внимание на метаболических путях раковых клеток. В раковых клетках энергия синтезируется из глюкозы путем гликолиза, не задействующего кислород, а не в митохондриальной дыхательной цепи, где используется значительное количество кислорода. В ходе ракового метаболизма синтезируются значительные количества лактата. Однако кислотность лактата снижает эффективность выживания раковых клеток. Соответственно избыточный лактат выводится из клеток. По указанным причинам было высказано предположение, что искусственное введение лактатной соли металла в организм онкологического пациента и накопление лактата в раковых клетках может обеспечивать метаболическое расстройство раковых клеток или создание неблагоприятных для выживания условий микроокружения раковых клеток и соответственно обуславливать итоговое повреждение, приводящее к их гибели.

Соответственно лактатная соль металла была выбрана в качестве материала для нарушения метаболизма раковых клеток. Указанный выбор был обусловлен тем, что согласно ожиданиям, поскольку глюкоза преобразуется в пируват посредством гликолиза, после чего образует лактат, при возможном накоплении лактата в раковых клетках гликолиз может замедляться или останавливаться. Однако лактат способен с легкостью разлагаться в организме и соответственно не может быть эффективно транспортирован в раковые клетки. Соответственно ожидалось, что при использовании лактатной соли металла лактат не сможет с легкостью разлагаться во внеклеточной среде и сможет легко проникать в клетки и эффективно разлагаться в клетках.

При этом авторы настоящего изобретения согласно настоящему описанию учитывали, что в случае применения лактатной соли металла, содержащей металлический компонент, который не может с легкостью метаболизироваться в организме, указанный металлический компонент может обуславливать побочный эффект ввиду особенностей противораковых лекарственных средств, которые часто вводятся в значительных количествах; соответственно авторы выбрали из различных лактатных солей металлов лактат натрия, лактат калия и лактат кальция, отличающиеся высокой прочностью связи металла с лактатом и высокой эффективностью доставки лактата в раковые клетки и не содержащие металлического компонента, который не может быть с легкостью метаболизирован в организме. В результате было подтверждено, что лактат кальция отличается максимальной прочностью связи металла с лактатом и максимальной эффективностью доставки лактата в раковые клетки; в итоге был выбран лактат кальция.

Было подтверждено, что в результате введения выбранного лактата кальция в раковые клетки в клетках повышаются уровни лактата, ЛДГ-Б (лактатдегидрогеназы В), которая влияет на метаболизм лактата, пирувата, ПДК (пируватдегидрогеназы), которая влияет на метаболизм пирувата, и α -КГ (α -кетоглутарата); понижаются уровни β -катенина как фактора роста раковых клеток, ПАРП, который подавляет повреждение внутриклеточной ДНК, HIF-1 α (индуцируемого гипоксией фактора 1 α) и ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов), который влияет на метастазирование, инвазию и ангиогенез раковых клеток; снижаются уровни роста, метастазирования (миграции) и формирования трубки раковыми клетками.

Кроме того, противораковую активность лактата кальция измеряли с применением моделей на животных, и было подтверждено, что введение лактата кальция подавляет рост раковых клеток в моделях на животных.

Кроме того, было подтверждено, что при введении лактата кальция в комбинации со стандартным облучением эквивалентный противораковый эффект может быть получен при использовании меньшего количества облучения по сравнению со стандартным лечением. Также было подтверждено, что при введении лактата кальция в раковые клетки релевантных линий в комбинации с хорошо известными противораковыми лекарственными средствами различных типов может быть получен лучший противораковый эффект при использовании меньшей концентрации указанного противоракового лекарственного средства по сравнению с введением по отдельности.

Большинство лактатных солей металлов, демонстрирующих противораковую активность, могут метаболизироваться в организме, и известно, что они не вызывают побочных эффектов. Соответственно указанные лактатные соли металлов могут применяться в качестве активных ингредиентов противораковых лекарственных средств или продуктов лечебного питания, отличающихся безопасностью и высокой противораковой активностью. Противораковые эффекты указанных лактатных солей металлов ранее не были известны и впервые были продемонстрированы авторами настоящего изобретения согласно настоящему описанию.

Пример варианта реализации настоящего изобретения представлен фармацевтической композицией для лечения ракового заболевания, содержащей лактатные соли металлов в качестве активных ингредиентов.

Термин "лактатные соли металлов" в настоящем документе относится к соединениям, продуцируемым или синтезируемым в форме молочной кислоты, связанной с ионом металла.

Согласно настоящему описанию при введении лактатных солей металлов в раковую клетку указанные лактатные соли металлов используются для отщепления лактата, и соответственно концентрация

лактата в раковой клетке увеличивается. Лактатные соли металлов, применяемые в качестве активных ингредиентов фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания в соответствии с настоящим описанием, не ограничены каким-либо конкретными солями при условии, что они способны нарушать метаболизм раковой клетки. Согласно одному примеру могут применяться, по отдельности или в комбинации, лактат кальция, лактат цинка, лактат магния, лактат натрия, лактат калия, лактат железа (II), лактат хрома, лактат меди и лактат марганца, способные образовывать стабильное соединение вне клетки и обеспечивать отщепление лактата и соответственно увеличение концентрации лактата в раковой клетке. Согласно другому примеру могут применяться, по отдельности или в комбинации, лактат кальция, лактат натрия и лактат калия, способные образовывать стабильное соединение вне клетки и обеспечивать отщепление лактата и соответственно увеличение концентрации лактата в раковой клетке, не содержащие металлического компонента, который не может быть с легкостью метаболизирован в организме. Согласно еще одному примеру может применяться лактат кальция, способный образовывать стабильное соединение вне клетки и обеспечивать отщепление лактата и соответственно увеличение концентрации лактата в раковой клетке, отличающийся высокой эффективностью доставки в раковую клетку и не содержащий металлического компонента, который не может быть с легкостью метаболизирован в организме.

Согласно настоящему описанию все указанные лактаты: лактат кальция, лактат натрия и лактат калия синтезированы в виде лактатных солей металлов; было подтверждено, что указанные лактатные соли металлов могут диссоциировать с высвобождением лактата в раковой клетке. В частности, для демонстрации различных видов противораковой активности использовали лактат кальция, который обеспечивает максимальную эффективность доставки лактата.

Тем не менее, лактат кальция представляет собой только один пример лактатных солей металлов, подходящих для применения согласно настоящему описанию. Лактатные соли металлов согласно настоящему описанию не ограничены лактатом кальция, и очевидно, что в качестве активных ингредиентов фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания в соответствии с настоящим описанием могут применяться различные лактатные соли металлов.

Лактатные соли металлов могут проявлять повышенную противораковую активность при введении в комбинации со стандартным противораковым лекарственным средством. Это объясняется тем, что стандартные противораковые лекарственные средства не вовлечены в механизм гликолиза раковой клетки. Соответственно противораковое лекарственное средство, подходящее для введения в комбинации с фармацевтической композицией для лечения ракового заболевания согласно настоящему описанию, не ограничено каким-либо конкретным средством при условии, что оно не вовлечено непосредственным образом в гликолиз раковой клетки. Например, могут применяться: иматиниб, 5-FU (5-фторурацил), иринотекан, сунитиниб, оксалиплатин, паклитаксел, лапатиниб, трастузумаб (герцептин), gefinitиб, эрлотиниб, метотрексат, карбоплатин, доцетаксел, эверолимус и сорафениб, которые представляют собой хорошо известные противораковые лекарственные средства, 5-индансульфонамид (ИС), который представляет собой ингибитор карбоангидразы и обладающий известной противораковой активностью, и коричная кислота (КК), которая представляет собой ингибитор монокарбоксилатного транспортера.

Кроме того, лактатные соли металлов понижают экспрессию PARP, HIF-1A и ФРЭС, придающих раковым клеткам устойчивость к облучению при лечении облучением. Соответственно при введении лактатных солей металлов в комбинации с облучением, указанные лактатные соли металлов увеличивают противораковую активность облучения. Соответственно возможно получение эквивалентного противоракового эффекта при использовании меньшего количества облучения по сравнению со стандартным лечением. В указанном случае количество облучения не ограничено конкретным образом и может составлять от 2 до 10 Гр в сутки. Облучение может проводиться один раз в сутки или на протяжении нескольких дней с разделением количества облучения на дробные дозы.

Термин "лактат кальция" относится к типу лактатных солей металлов и представлен солью $C_6H_{10}O_6Ca \cdot 5H_2O$, где ион кальция связан с лактатом. Лактат кальция представляет собой белый порошок или гранулы при комнатной температуре, безводную форму получают при нагревании до $120^{\circ}C$; растворимость составляет 5% (мас./об.). Кроме того, лактат кальция отличается исключительной биодоступностью и абсорбцией в организме; известно, что он не оказывает побочных эффектов; соответственно его применяли в основном в пищевых продуктах для обогащения кальцием или в качестве регулятора pH.

Согласно настоящему описанию лактат кальция может применяться в качестве примера лактатных солей металлов, которые представляют собой активные ингредиенты фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания. Поскольку кальций, связанный с лактатом, абсорбируется раковыми клетками лучше, чем нормальными клетками, лактат кальция обладает преимуществом, заключающимся в относительно большей эффективности доставки лактата в раковые клетки по сравнению с другими типами лактатных солей металлов.

Раковые заболевания, лечение которых может осуществляться с применением фармацевтических композиций, предложенных в настоящем изобретении, не ограничены какими-либо конкретными заболеваниями, поскольку рост, инвазия и метастазирование рака могут быть подавлены путем нарушения

ракового метаболизма. Согласно одному примеру может быть включен солидный рак, такой как рак легкого, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак кожи, рак костей, лимфома, рак матки, рак шейки матки, рак почки и меланома, рост, инвазия и метастазирование которого могут быть подавлены путем нарушения гликолиза. Согласно другому примеру могут быть включены рак толстой и прямой кишки, рак молочной железы и меланома, рост, инвазия и метастазирование которых могут быть подавлены путем лечения лактатными солями металлов.

В соответствии с примером варианта реализации настоящего изобретения при синтезе лактатных солей металлов синтезировали различные лактатные соли металлов, а именно лактат кальция, лактат натрия и лактат калия, не содержащие металлов, которые могут быть пагубными для организма. Затем путем сравнения энергии связи и эффективности доставки лактата в раковую клетку было подтверждено, что лактат кальция отличается максимальной прочностью связи с лактатом и обеспечивает максимальную эффективность доставки лактата в раковую клетку, и в итоге был выбран лактат кальция (фиг. 1).

Было подтверждено, что в случае воздействия на раковую клетку выбранным лактатом кальция концентрация кальция (фиг. 2) и концентрация лактата (фиг. 3) в указанной раковой клетке возрастали, а показатели pH в клетке уменьшались (фиг. 4). Кроме того, было подтверждено, что экспрессия β -катенина как фактора роста раковых новообразований подавлялась в соответствии с расшифровкой генов (фиг. 5), а экспрессия как белка β -катенина, так и активированного β -катенина снижалась по мере возрастания концентрации лактата кальция (фиг. 6). Кроме того, было подтверждено, что лактат кальция снижал экспрессию белка ПАРП, исправляющего повреждения внутриклеточной ДНК, в клетках линии рака молочной железы (фиг. 8), клетках линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 9) и клетках линии клеток меланомы (фиг. 10); повышал экспрессию белка ЛДГ-Б (лактатдегидрогеназы Б), которая влияет на метаболизм внутриклеточного лактата (фиг. 11a, 11b и 11c), повышал уровень пирувата (фиг. 12), повышал экспрессию белка ПДК (пируватдегидрогеназы) (фиг. 13a и 13b) и повышал уровень α -КГ (α -кетоглутарата) (фиг. 14a и 14b); подавлял экспрессию белка HIF-1 α (индуцируемого гипоксией фактора 1a) (фиг. 15) и ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов) (фиг. 16a и 16b), который влияет на метастазирование, инвазию и ангиогенез раковых клеток, и уменьшал уровни формирования трубки клетками HUVEC (фиг. 17); подавлял миграцию клеток линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 18), клеток линии рака молочной железы (фиг. 19) и в линии клеток меланомы (фиг. 20); повышал уровень апоптоза клеток линии рака молочной железы (фиг. 21a, 21b, 21c, 21d и 21e) и клеток линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 22); ингибировал колониеобразующую способность клеток линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 23) и в линии клеток меланомы (фиг. 24a и 24b) и повышал противораковую эффективность при введении в комбинации со стандартным противораковым лекарственным средством (фиг. 25a и 25b).

Кроме того, в результате тестирования противораковой активности лактата кальция с применением моделей на животных было подтверждено, что в модели на мышах, полученной путем диссеминации клеток линии рака толстой и прямой кишки, деградирующая активность ПАРП снижалась (фиг. 28), подавлялись экспрессия HIF-1A и ФРЭС (фиг. 29 и 31) и рост опухоли (фиг. 30, 32, и 34), объем опухолей был меньше; снижался также ангиогенез (фиг. 33 и 35). При этом было подтверждено, что введение лактата кальция в комбинации с облучением обеспечивало более эффективное уменьшение роста опухоли (фиг. 37a и 37b).

Кроме того, было подтверждено более эффективное подавление роста опухоли при введении лактата кальция в комбинации с различными противораковыми лекарственными средствами, применяемыми для лечения различных раковых заболеваний, по сравнению с отдельным введением указанных противораковых лекарственных средств (фиг. 38a, 38b-55a и 55b).

Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может быть представлена в форме фармацевтической композиции для лечения ракового заболевания и может дополнительно включать подходящие носители, вспомогательные вещества или разбавители, которые обычно вводят в состав фармацевтических композиций. В частности, указанная фармацевтическая композиция может быть введена в состав в соответствии с традиционным способом, лекарственных форм для перорального применения, таких как порошок, гранулы, таблетка, капсула, суспензия, эмульсия, сироп, аэрозоль, пластырь для полости рта и т.п., состав для наружного применения, пластырь для наружного применения, суппозитории или стерильные инъекционные растворы. Согласно настоящему описанию указанные носители, вспомогательные вещества и разбавители, которые могут быть включены в указанную фармацевтическую композицию, могут быть представлены лактозой, декстрозой, сахарозой, сорбитом, маннитом, ксилитом, эритритом, мальтитом, крахмалом, гуммиарабиком, альгинатом, желатином, фосфатом кальция, силикатом кальция, целлюлозой, метилцеллюлозой, аморфной целлюлозой, поливинилпирролидоном, водой, метилгидроксibenзоатом, пропилгидроксibenзоатом, тальком, стеаратом магния и минеральным маслом. Получение состава с композицией может включать применение разбавителей или вспомогательных веществ, таких как наполнители, объемобразующие агенты, связующие вещества, смачивающие агенты, разрыхлители, поверхностно-активные вещества и т.п. Твердые составы для перорального введе-

ния могут включать таблетки, депо, пилюли, порошки, гранулы, капсулы, пластыри для наружного применения и т.п. Твердые составы могут быть получены путем смешивания по меньшей мере одного вспомогательного вещества, такого как крахмал, карбонат кальция, сахароза, лактоза или желатин и т.п., с экстрактами и их фракциями. Помимо таких общих вспомогательных веществ могут также применяться смазывающие вещества, такие как стеарат магния или тальк. Жидкие составы для перорального введения могут включать суспензии, растворы для внутреннего применения, эмульсии, сиропы и т.п., помимо общих разбавителей, таких как вода и жидкий парафин, могут быть включены другие вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, вкусоароматические добавки, ароматизирующие вещества, консерванты и т.п. Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, неводные растворители, суспензии, эмульсии, лиофилизированные составы, пластыри для наружного применения или суппозитории. Неводные растворы и суспензии могут включать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, подходящий для инъекций сложный эфир, такой как этилолеат и т.п. Основа для суппозитория может включать витепсол, макрогол, Твин-61, какао-масло, лауриновое масло, глицерожелатин и т.п.

Количество лактатных солей металлов, включенное в фармацевтическую композицию согласно настоящему описанию, может составлять от 0,0001 до 50 мас.% или более предпочтительно от 0,01 до 20 мас.% от общей массы итоговой композиции, однако не ограничено конкретными указанными диапазонами. Концентрация лактатных солей металлов, включенных в одну дозу фармацевтической композиции, может составлять от 2,5 до 25 мМ.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может вводиться в фармацевтически эффективном количестве; в настоящем документе термин "фармацевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для лечения или предотвращения заболеваний, соответствующему разумному соотношению риска и пользы, применимому к любому медицинскому лечению или профилактике. Эффективный уровень дозы может быть определен с учетом тяжести заболевания, активности лекарственного средства, возраста, массы тела, состояния здоровья и пола пациента, чувствительности к лекарственному средству, времени введения, способа введения и скорости выведения композиции согласно настоящему описанию, продолжительности лечения, лекарственных средств, применяемых одновременно или в комбинации с композицией согласно настоящему описанию, и других факторов, известных в области медицины. Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может вводиться по отдельности или в комбинации с другими общеизвестными противораковыми лекарственными средствами или компонентами, имеющими известную противораковую активность. Важно вводить композицию в минимальном количестве, способном обеспечить максимальный эффект, не вызывая побочных эффектов, с учетом всех вышеперечисленных факторов.

Дозировка фармацевтической композиции согласно настоящему описанию может быть определена специалистами в данной области техники с учетом цели применения, тяжести заболевания, возраста, массы тела, пола и анамнеза пациента, вида материала, применяемого в качестве активного ингредиента, или т.п. Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может вводиться, например, в дозировке, составляющей от приблизительно 0,1 нг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела взрослого человека или предпочтительно от 1 нг до приблизительно 100 мг/кг массы тела взрослого человека; частота введения композиции согласно настоящему описанию может соответствовать однократному введению или нескольким введениям разделенной дозы в сутки, однако конкретным образом не ограничена указанной частотой. Дозировка или частота введения не ограничивает каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Согласно другому примеру варианта реализации настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания, включающий этап введения фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции субъекту, страдающему раковым заболеванием.

В настоящем документе термин "субъект" включает любых млекопитающих, в том числе мышей, сельскохозяйственных животных и человека, а также культивируемую рыбу, страдающих раковыми заболеваниями, без ограничений.

Термин "лечение" в настоящем документе относится ко всем видам активности, направленной на облегчение или улучшение симптомов ракового заболевания путем введения фармацевтической композиции, содержащей лактатные соли металлов в качестве активных ингредиентов согласно настоящему описанию, страдающему раковым заболеванием субъекту.

В способах лечения ракового заболевания согласно настоящему описанию виды подлежащих лечению раковых заболеваний соответствуют описанным выше.

Указанная композиция может вводиться в виде единичной лекарственной формы или лекарственной формы для многократного приема. В указанном случае указанная композиция может быть введена в жидкий состав, порошок, аэрозоль, состав для инъекций, жидкость для трансфузии (внутривенного капельного введения), в состав капсул, пилюль, таблеток, суппозитория или пластырей.

Фармацевтическая композиция для лечения ракового заболевания согласно настоящему описанию может вводиться любыми известными способами при условии, что они обеспечивают доставку в целевую ткань.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может вводиться внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, через трансдермальный пластырь, перорально, интраназально, внутривлагалищно или ректально в зависимости от назначения, однако способы введения конкретным образом не ограничены. Однако указанная фармацевтическая композиция может вводиться перорально и не в виде лекарственной формы; поскольку лактатные соли металлов могут быть денатурированы желудочным соком при пероральном введении, активные ингредиенты композиции для перорального введения должны быть покрыты оболочкой или введены в состав, защищающий от разложения в желудке, или вводиться перорально через пластырь для перорального введения. Кроме того, композиция может вводиться с применением определенного аппарата, позволяющего транспортировать активные ингредиенты в целевую клетку.

Согласно другому примеру варианта реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения ракового заболевания, содержащая лактатные соли металлов и противораковое лекарственное средство в качестве активных ингредиентов.

Согласно описанию выше, лактатные соли металлов согласно настоящему описанию могут проявлять противораковую активность при введении в комбинации со стандартным противораковым лекарственным средством. Это обусловлено тем, что стандартное противораковое лекарственное средство не вовлечено в механизм гликолиза раковой клетки. Соответственно противораковое лекарственное средство, содержащее лактатную соль металла согласно настоящему описанию и активный ингредиент, представленный общеизвестным противораковым лекарственным средством, может применяться для более эффективного лечения ракового заболевания.

В настоящем документе лактатные соли металлов, общеизвестные противораковые лекарственные средства, раковые заболевания, для лечения которых может применяться указанная фармацевтическая композиция, дозировки, способ введения и т.п., соответствуют описанию выше.

Согласно другому примеру варианта реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для подавления метастазирования рака, содержащая лактатные соли металлов в качестве активных ингредиентов.

Лактатные соли металлов согласно настоящему описанию способны подавлять различные характеристики, которые могут индуцировать метастазирование раковых клеток, например метастазирование, инвазию, ангиогенез раковых клеток, формирование трубки, миграцию клеток, колониеобразующую способность и т.п., и соответственно могут применяться в качестве активных ингредиентов фармацевтической композиции для подавления метастазов рака.

В настоящем документе целевое раковое заболевание, метастазирование которого подавляется, соответствует описанию выше. Например, фармацевтическая композиция для подавления метастазов рака может применяться для подавления возникновения одного или более метастатического ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из метастатического рака легкого, рака молочной железы, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головного мозга, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, лимфомы, рака матки, рака шейки матки, рака почки и меланомы.

В соответствии с примером варианта реализации настоящего изобретения было подтверждено, что при воздействии на различные раковые клетки лактатом кальция в качестве лактатной соли металла согласно настоящему описанию экспрессия белка HIF-1A (индуцируемого гипоксией фактора 1 α) (фиг. 15) и ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов) (фиг. 16), которые влияют на метастазирование, инвазию и ангиогенез раковой клетки; снижаются уровни формирования трубки клетками HUVEC (фиг. 17); подавляется миграция клеток линий рака толстой и прямой кишки (фиг. 18), рака молочной железы (фиг. 19) и меланомы (фиг. 20); увеличиваются уровни клеточного апоптоза клеток линии рака молочной железы (фиг. 21) и клеток линий рака толстой и прямой кишки (фиг. 22) и ингибируется колониеобразующая способность клеток линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 23) и меланомы (фиг. 24).

Согласно еще одному примеру варианта реализации настоящего изобретения предложена пищевая композиция для облегчения ракового заболевания, содержащая лактатные соли металлов в качестве активных ингредиентов.

Лактатные соли металлов широко использовались для метаболизма *in vivo*; лактат кальция был сертифицирован как не имеющее побочных эффектов вещество и применялся в качестве официальной пищевой добавки. Соответственно лактатные соли металлов могут приниматься в форме пищевого продукта, который может потребляться ежедневно и способствовать облегчению ракового заболевания. Согласно настоящему документу количество лактатных солей металлов, включенное в пищевой продукт, может составлять от 0,001 до 10 мас.% или от 0,1 до 1 мас.% от общей массы пищевой композиции, однако не ограничивается конкретными указанными диапазонами. В том случае, если указанный пищевой продукт представляет собой напиток, лактатные соли металлов могут быть включены в него в относительном количестве 1-10 г или 2-7 г на 100 мл.

Кроме того, указанная композиция может дополнительно включать дополнительные компоненты, которые, как правило, используются в пищевой композиции для улучшения запаха, вкуса, внешнего вида и т.п., например витамины A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, ниацин, биотин, фолат, пантотеновая кислота и

т.п. Кроме того, указанная композиция может дополнительно включать минеральные вещества, такие как Zn, Fe, Ca, Cr, Mg, Mn, Cu и т.п. Кроме того, указанная композиция может дополнительно включать аминокислоты, такие как лизин, триптофан, цистеин, валин и т.п. Кроме того, указанная композиция может дополнительно включать пищевые добавки, такие как консерванты (калия сорбат, натрия бензоат, салициловую кислоту, дегидроацетат натрия и т.п.), дезинфектанты (белильный порошок, активный белильный порошок, гипохлорит натрия и т.п.), антиоксиданты (бутилгидроксанизол (БНА), бутилгидрокситолуол (БНТ) и т.п.), красящие агенты (анилиновые красители и т.п.), цветопроявляющие агенты (нитрит натрия и т.п.), отбеливающие агенты (сульфит натрия), вкусовые вещества (глутамат натрия (MSG) и т.п.), подсластители (дульцин, цикламат, сахарин натрия и т.п.), вкусоароматические добавки (ванилин, лактоны и т.п.), способствующие набуханию агенты (квасцы, D-битартрат калия и т.п.), обогатители, эмульгаторы, загустители (клейкие пасты), пленкообразующие агенты, гуммиосновы, противовспенивающие агенты, растворители, улучшители и т.п. Пищевые добавки могут быть выбраны в соответствии с видом пищевого продукта и использованы в подходящем количестве.

При этом с использованием указанной пищевой композиции для облегчения ракового заболевания, содержащей лактатные соли металлов, могут быть приготовлены функциональные пищевые продукты для облегчения ракового заболевания.

В частности, с использованием указанной пищевой композиции могут быть приготовлены прошедшие технологическую обработку пищевые продукты, способные обеспечивать облегчение ракового заболевания. Примеры прошедших технологическую обработку пищевых продуктов могут быть представлены функциональными пищевыми продуктами, приготовленными в форме выпечки, напитков, алкогольных напитков, ферментированных пищевых продуктов, консервированных пищевых продуктов, продуктов переработки молока, продуктов переработки мяса или макаронных изделий. В настоящем документе примеры выпечки включают выпечку из пресного теста, выпечку с начинкой, сладкую выпечку, хлеб, сладости, желейные конфеты, жевательные резинки, хлопья (продукты-заменители, например, зерновые хлопья). Примеры напитков включают питьевую воду, газированные безалкогольные напитки, функциональные изотонические напитки, соки (например, яблочный, грушевый, виноградный, алоэ, мандариновый, персиковый, морковный, томатный соки и т.п.), сладкие рисовые напитки и т.п. Примеры алкогольных напитков включают осветленное рисовое вино, виски, соджу (корейский крепкий спиртной напиток), пиво, крепкие алкогольные напитки, фруктовое вино и т.п. Примеры ферментированных пищевых продуктов включают соевый соус, соевую пасту, пасту из красного перца и т.п. Примеры консервированных пищевых продуктов включают консервированные пищевые морепродукты (например, консервированные тунец, скумбрия, сайра, моллюски и т.п.), консервированные пищевые продукты с мясом сельскохозяйственных животных (консервированные говядина, свинина, курица, индейка и т.п.) и консервированные пищевые продукты на основе сельскохозяйственных растений (консервированная кукуруза, персики, ананасы и т.п.). Примеры продуктов переработки молока включают сыр, масло, йогурт и т.п. Примеры продуктов переработки мяса включают свиные котлеты, котлеты из говядины, котлеты из курицы, сосиски, свинину в кисло-сладком соусе, наггетсы, пульки и т.п. Примеры макаронных изделий включают сухую лапшу, простую лапшу, лапшу рамен, удон, корейскую холодную лапшу, герметизированную и упакованную свежую лапшу и т.п. Указанная композиция также может применяться для приготовления пищевых продуктов в герметических термостойких пакетах, супов и т.п.

В настоящем документе термин "функциональный пищевой продукт", имеющий то же значение, что и термин "продукты питания для специальных лечебных целей (FoSHU)", относится к пищевому продукту, обеспечивающему выраженные эффекты, относящиеся к лекарственному и медицинскому лечению, обработанному таким образом, чтобы обеспечивать эффективную модуляцию организма, а также обеспечивать питательные вещества. Функциональный пищевой продукт может производиться в различных формах, в том числе в виде таблеток, капсул, порошков, гранул, жидкостей, пилюлей и т.п., обеспечивающих полезные эффекты для облегчения ракового заболевания.

Здесь и далее в настоящем документе заявленное изобретение более подробно объясняется на представленных примерах. Однако указанные примеры предложены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Получение лактатной соли металла.

Проводили реакцию карбоната кальция, карбоната натрия или карбоната калия с лактатом для получения растворов лактатных солей металлов (лактата кальция, лактата натрия или лактата калия) соответственно. Каждый раствор фильтровали, высушивали и тонко измельчали с получением лактатной соли металла (лактата кальция, лактата натрия или лактата калия) в форме порошка. Затем анализировали структуру и энергию связи полученных лактатных солей металлов (лактата кальция, лактата натрия или лактата калия) (фиг. 1).

На фиг. 1 приведена структурная схема и таблица со сравнительной информацией о структуре и энергии связи для лактата кальция, лактата натрия и лактата калия; все они имеют молекулярную структуру, аналогичную структуре лактата кальция. Как видно из фиг. 1, было подтверждено, что лактат кальция отличается относительно высокой энергией связи по сравнению с лактатом натрия и лактатом калия.

Затем проводили эксперименты с применением лактата кальция, отличающегося относительно вы-

сокой энергией связи.

Пример 2. Эффект лактата кальция на микроокружение опухоли.

После воздействия на раковую клетку лактатом кальция анализировали изменение концентрации кальция, изменение концентрации лактата и изменение показателей pH в клетке для прогнозирования уровней притока лактата кальция.

Пример 2-1. Изменение уровня кальция.

На клетки каждой из линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29) в количестве 5×10^5 клеток, культивированные в среде для культивирования раковых клеток (среда RPMI1640, содержащая 10% ФБС и 1% пенициллина/стрептомицина) при 37°C в атмосфере 5% CO₂, воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция и затем культивировали в течение 24 ч. Культивированные раковые клетки обрабатывали 10 мкМ кальциевого индикатора Fluo-3/AM и 25% плуронином (Pluronic F-127), проводили реакцию при 37°C в течение 30 мин, вводили флуоресцентные зонды и фотографировали с применением конфокального микроскопа (фиг. 2). В указанном случае раковые клетки, на которые не воздействовали лактатом кальция, использовали в качестве контрольных групп.

На фиг. 2 представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие результаты сравнения уровней кальция в раковых клетках в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция (CaLa). Как видно на фиг. 2, было подтверждено, что в раковых клетках, на которые воздействовали лактатом кальция, увеличивалась концентрация кальция.

Пример 2-2. Изменение уровня лактата.

Клетки, культивированные согласно примерам 2-1, культивировали повторно в среде, содержащей 3 мМ (низкий уровень) или 11 мМ (нормальный уровень) глюкозу. Культивированные клетки разрушали путем обработки ультразвуком. Концентрацию лактата, содержащегося в разрушенных клетках, измеряли с применением набора для анализа на лактат (AbCam, Кембридж, Массачусетс) (фиг. 3). В указанном случае раковые клетки, на которые не воздействовали лактатом кальция, использовали в качестве контрольных групп.

На фиг. 3 приведен график, отражающий результаты сравнения уровней лактата в раковых клетках в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция (CaLa). Как видно на фиг. 3, было подтверждено, что независимо от концентрации глюкозы в среде в раковых клетках, на которые воздействовали лактатом кальция, концентрация лактата увеличивалась; этот результат был более очевиден при культивировании указанных клеток в среде, содержащей глюкозу в высокой концентрации.

Пример 2-3. Изменение показателей pH внутри и вне раковой клетки.

Результаты, представленные на фиг. 2 и 3, подтверждают, что при воздействии на раковую клетку лактатом кальция лактат кальция поступает внутрь раковой клетки. Следовательно, проверяли, изменяется ли лактат кальция показатели pH внутри и вне раковой клетки.

В частности, в клетках, культивированных согласно примеру 2-1, при помощи pH-метра измеряли внеклеточные показатели pH в среде для культивирования клеток, на которые воздействовали лактатом кальция, после чего проводили культивирование и измеряли внутриклеточные показатели pH с использованием набора для определения pH (Life Technologies, Калифорния) в клетках, на которые воздействовали лактатом кальция и затем культивировали (фиг. 4). В указанном случае раковые клетки, на которые не воздействовали лактатом кальция, использовали в качестве контрольных групп.

На фиг. 4 представлены графики, отражающие изменения внутриклеточных и внеклеточных показателей pH раковых клеток, на которые воздействовали лактатом кальция; левый график отражает изменение внеклеточных показателей pH раковых клеток; правый график отражает изменение внутриклеточных показателей pH раковых клеток. Как видно на фиг. 4, было подтверждено, что при воздействии на клетки лактатом кальция, внеклеточные показатели pH не изменялись, однако внутриклеточные показатели pH снижались до кислотных. Как видно на левом графике на фиг. 4, лактат кальция сам по себе не изменял показатели pH во внеклеточной среде, однако при поступлении лактата кальция в раковую клетку показатель pH снижался; соответственно внутриклеточная среда раковой клетки изменялась за счет притока лактата кальция.

Пример 3. Эффект лактата кальция на экспрессию фактора роста раковых новообразований.

Результаты, описанные в примере 2, подтвердили, что внутриклеточная среда раковой клетки может быть изменена путем применения лактата кальция. Соответственно для проверки того, влияет ли такое изменение на рост раковой клетки, исследовали зависимость уровней экспрессии β-катенина, представляющего собой один из раковых факторов роста, на геном и белковом уровнях, от воздействия лактатом кальция, в клетках линий рака толстой и прямой кишки или рака молочной железы.

Пример 3-1. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии α-катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки.

Клетки линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1) культивировали с применением способа, описанного в примере 2-1, за исключением того, что на них воздействовали 0, 1,5 или 2,5 мМ лактатом кальция, и получали культуру раковых клеток. Затем уровни экспрессии β-

катенина, зависимость от концентрации лактата кальция, сравнивали с уровнями экспрессии мРНК и соответствующего белка.

Сначала для сравнения уровней экспрессии мРНК из всех раковых клеток экстрагировали общую РНК с применением мини-набора RNeasy и синтезировали кДНК с применением обратной транскриптазы. Ген β -катенина получали посредством ПЦР с обратной транскриптазой, используя синтезированную кДНК в качестве матрицы и следующие праймеры:

β -катенин F: 5'-AAAATGGCAGTGCCTTTAG-3' (SEQ ID NO:1)

β -катенин R: 5'-TTTGAAGGCAGTCTGTCTGTA-3' (SEQ ID NO:2)

АКТИН F: 5'-AAC-TGGAACGGTGAAGGT-3' (SEQ ID NO:3)

АКТИН R: 5'-CCTGTAACAACGCATCTCAT-3' (SEQ ID NO:4)

В верхней части фиг. 5 приведены электрофоретические изображения, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии мРНК β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях, а в нижней части фиг. 5 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии белка β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Как видно по верхней части фиг. 5, различия уровней экспрессии мРНК β -катенина в зависимости от концентрации лактата кальция отсутствовали.

Затем для сравнения уровней экспрессии белка все раковые клетки разрушали и выполняли электрофорез. После этого проводили вестерн-блоттинг с применением антитела к β -катенину в качестве первичного антитела и конъюгированного антитела к IgG кролика в качестве вторичного антитела (нижняя часть фиг. 5); блоты анализировали в программе Image-J. В указанном случае для групп внутреннего контроля использовали актин.

В верхней части фиг. 5 приведены электрофоретические изображения, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии мРНК β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях, а в нижней части фиг. 5 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии белка β -катенина в клетках линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Как видно по нижней части фиг. 5, было подтверждено, что по мере увеличения концентрации лактата кальция уровни экспрессии белка β -катенина снижаются в отличие от уровней экспрессии мРНК β -катенина.

Соответственно было подтверждено, что поступление лактата кальция в раковую клетку изменяет внутриклеточную среду указанной раковой клетки, и соответственно экспрессия β -катенина, который представляет собой фактор роста раковых новообразований, подавляется на уровне расшифровки генов.

Пример 3-2. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии β -катенина в клетках линии рака молочной железы.

С применением способа, описанного в примере 3-1, уровни экспрессии β -катенина и активированного β -катенина в зависимости от концентрации лактата кальция сравнивали на уровне экспрессии белка (фиг. 6) в клетках линии рака молочной железы человека (MCF-7), культивированных в среде для культур раковых клеток (среде RPMI1640, содержащей 10% ФБС и 1% пенициллина/стрептомицина) при 37°C в атмосфере 5% CO₂; и клетках линии рака молочной железы человека (MDA-MB-231), культивированных в другой среде для культур раковых клеток (среде DMEM, содержащей 10% ФБС и 1% пенициллина/стрептомицина) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

На фиг. 6 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии общего белка β -катенина и активированного β -катенина в клетках линий рака молочной железы человека (MCF-7 и MDA-MB-231), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Как видно на фиг. 6, было подтверждено, что по мере увеличения концентрации лактата кальция уровни экспрессии как белка β -катенина, так и активированного белка β -катенина понижаются.

Пример 4. Эффект лактата кальция в отношении энергетики ракового заболевания.

В примере 2 было подтверждено, что при воздействии лактатом кальция на линии раковых клеток концентрация лактата кальция в клетках линии раковых клеток повышается. Соответственно проверяли, изменяется ли синтез лактата в результате повышения концентрации лактата.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29) культивировали в условиях нормоксии или гипоксии. На линии клеток, культивированные в условиях гипоксии, воздействовали лактатом кальция, после чего сравнивали уровни экспрессии GLUT1 и HK2 в каждой из культивированных линий клеток на уровне мРНК и уровне экспрессии белка (фиг. 7).

На фиг. 7 представлены результаты ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга, демонстрирующие эффект лактата кальция в линии раковых клеток в условиях гипоксии. График отражает уровни экспрессии мРНК транспортера глюкозы (GLUT)-1 и гексокиназы (HK)2, вовлеченных в раннюю стадию гликолиза; снимки вестерн-блотов демонстрируют уровни экспрессии белка HK2. Как видно на фиг. 7,

было подтверждено, что в условиях гипоксии уровни экспрессии GLUT 1 и HK2, функционирующих на ранней стадии гликолиза, повышаются, и в результате активируется гликолиз, однако при воздействии на указанные линии клеток лактатом кальция указанная активация уменьшалась.

Пример 5. Анализ стабилизации раковых генов, обусловленной лактатом кальция.

Проверяли наличие или отсутствие изменений уровней экспрессии поли(АДФ-рибоза)полимеразы (ПАРП), которая играет важную роль в поддержании целостности ДНК в ходе удаления оснований для восстановления поврежденных генов, при воздействии лактатом кальция.

Пример 5-1. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии ПАРП в клетках линии рака молочной железы.

Клетки линий рака молочной железы человека (MCF-7 и MDA-MB-231) культивировали с применением способа, описанного в примере 2-1, за исключением того, что на них воздействовали 0, 2,5 или 5,0 мМ лактатом кальция; получали культуру раковых клеток. Затем анализировали изменения уровня экспрессии белка ПАРП в указанных клетках в зависимости от концентрации лактата кальция (фиг. 8). В указанном случае изменение уровня экспрессии анализировали посредством вестерн-блоттинга с применением программы Image-J с антителом против ПАРП в качестве первичного антитела и конъюгированным антителом к IgG кролика в качестве вторичного антитела, и использовали ГАФДГ для групп внутреннего контроля.

На фиг. 8 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие эффекты лактата кальция на уровни экспрессии белка ПАРП и расщепленного ПАРП в клетках линий рака молочной железы человека (MCF-7 и MDA-MB-231). Как видно на фиг. 8, было подтверждено, что по мере увеличения концентрации лактата кальция уровни экспрессии белка ПАРП во всех линиях клеток рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB-231) снижаются. При этом уровни экспрессии белка усеченного ПАРП в линии клеток MCF-7 увеличиваются. Соответственно было подтверждено, что лактат кальция не только останавливает гликолиз в раковой клетке, однако также индуцирует апоптоз раковой клетки за счет остановки гликолиза и соответственно может применяться в качестве противоракового лекарственного средства.

Пример 5-2. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии ПАРП в клетках линии рака толстой и прямой кишки.

Сравнивали уровни экспрессии белка ПАРП в клетках линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 9) после воздействия на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) в течение 24 ч, по отдельности или в комбинации, 5 мМ лактатом кальция, 5-индансульфонамидом (ИС) в качестве ингибитора карбоангидразы или коричной кислотой (КК) в качестве ингибитора МСТ-4, который обеспечивает отток лактата. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали линию раковых клеток без какой-либо обработки.

На фиг. 9 представлены снимок вестерн-блота и график, отражающий результаты сравнения уровней экспрессии белка ПАРП в клетках линий рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция, 5-индансульфонамидом (ИС) в качестве ингибитора карбоангидразы или коричной кислотой (КК) в качестве ингибитора монокарбоксилатного транспортера МСТ-4, который обеспечивает отток лактата, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 9, было подтверждено, что при воздействии каждым из вышеописанных материалов по отдельности уровни экспрессии белка ПАРП снижаются только в случае воздействия на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека отдельно лактатом кальция. Однако было подтверждено, что при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека комбинацией двух ингибиторов без воздействия лактатом кальция уровни экспрессии белка ПАРП снижаются; при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки комбинацией любого ингибитора с лактатом кальция уровни экспрессии белка ПАРП снижаются в еще большей степени; и при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека комбинацией всех трех материалов ПАРП в клетках не детектируется.

Пример 5-3. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии ПАРП в линиях клеток меланомы.

На клетки каждой из линий клеток меланомы человека (SKMEL-02 и SKMEL-28), культивированные в среде для культивирования раковых клеток (среда RPMI1640, включающая 10% ФБС и 1% пенициллина/стрептомицина) при 37°C в атмосфере 5% CO₂, воздействовали 0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 или 10 мМ лактатом кальция в течение 12 ч. Затем сравнивали уровни экспрессии белка ПАРП, экспрессируемого в линиях клеток меланомы (фиг. 10).

На фиг. 10 представлены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие результаты сравнения уровней экспрессии белка ПАРП в клетках линий меланомы человека (SKMEL-02 и SKMEL-28), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Как видно на фиг. 10, было подтверждено, что уровни экспрессии белка ПАРП в линиях клеток меланомы также снижаются по мере увеличения концентрации лактата кальция.

Пример 6. Эффект лактата кальция в отношении связанного с лактатом метаболизма в раковой клетке.

Результаты, приведенные на фиг. 2 и 4, подтверждают, что при поступлении лактата кальция в раковую клетку концентрация лактата в указанной клетке повышается, и соответственно нормальный ре-

жим получения энергии путем гликолиза нарушается.

Следовательно, исследовали обусловленный воздействием лактата кальция эффект лактата на внутриклеточный метаболизм.

Пример 6-1. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии белка ЛДГ-Б (лактатдегидрогеназы Б).

Исследовали эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии белка ЛДГ-Б (лактатдегидрогеназы Б), который представляет собой фермент для преобразования лактата в пируват.

На клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116 и НТ-29) воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция и культивировали в течение 24 ч. Культивированные линии раковых клеток иммобилизовали 4%-ным параформальдегидом и обрабатывали антителом против ЛДГ-Б кролика в течение 15 ч. Затем клетки линий раковых клеток промывали ФСБ и обрабатывали вторичным антителом, конъюгированным с биотином, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем клетки линий раковых клеток обрабатывали стрептавидином, конъюгированным с ФИТЦ, для флуоресцентного окрашивания и получали флуоресцентно-микроскопические фотографии (фиг. 11a-11c). В указанном случае клетки линий раковых клеток, культивированных в условиях нормоксии (N-контроль) или гипоксии (H-контроль), использовали в качестве контрольных групп, и ядро каждой клетки окрашивали с применением DAPI. Кроме того, фотографии анализировали с применением системы *in vivo* визуализации Xenogen (Xenogen IVIS-100) и программного обеспечения для визуализации в реальном времени (Xenogen).

На фиг. 11a представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие изменения уровней экспрессии белка ЛДГ-Б в линиях раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 11b представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие поглощение флуоресценции в линии раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 11c представлен график количественного анализа, отражающий уровни развития флуоресценции в зависимости от уровней экспрессии белка ЛДГ-Б. Как видно на фиг. 11a-11c, было подтверждено, что уровни экспрессии белка ЛДГ-Б в клетках, на которые воздействовали лактатом кальция, резко возрастают.

Пример 6-2. Эффект лактата кальция в отношении уровня пирувата.

Результаты, описанные в примере 6-1, подтвердили, что уровни экспрессии белка ЛДГ-Б в раковой клетке возрастают при воздействии лактатом кальция. После этого исследовали эффект лактата кальция на внутриклеточные уровни экспрессии пирувата, продуцируемого под действием ЛДГ-Б.

Клетки каждой из линий рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116 и НТ-29) в количестве 5×10^5 клеток обрабатывали 2,5 мМ лактатом кальция в течение 24 ч, и указанные клетки разрушали обработкой ультразвуком и получали фильтрат с применением фильтра с отсечением по массе 10 кДа. Полученный фильтрат использовали с набором для анализа на пируват (Abeam, Кембридж, Массачусетс) для измерения концентрации пирувата, содержащегося в фильтрате (фиг. 12).

На фиг. 12 представлен график, отражающий изменения концентраций пирувата в раковых клетках в зависимости от воздействия лактатом кальция. Как видно на фиг. 12, было подтверждено, что уровни пирувата в клетках, на которые воздействовали лактатом кальция, резко возрастают.

Пример 6-3. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии белка ПДК (пируватдегидрогеназы).

Результаты, описанные в примере 6-2, подтвердили, что уровень пирувата в раковой клетке возрастает при воздействии лактатом кальция. Следовательно, исследовали эффект лактата кальция на уровни экспрессии белка ПДК (пируватдегидрогеназы), который представляет собой фермент превращения пирувата при переходе к циклу трикарбоновых кислот (ЦТК).

После применения способа, описанного в примере 6-1, за исключением использования антитела против ПДК кролика вместо антитела против ЛДГ-Б кролика, измеряли уровни экспрессии белка ПДК в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116 и НТ-29), на которые воздействовали лактатом кальция (фиг. 13).

На фиг. 13a представлены флуоресцентно-микроскопические снимки, демонстрирующие изменения уровней экспрессии белка ПДК в линиях раковых клеток в зависимости от воздействия лактатом кальция. На фиг. 13b представлен график количественного анализа, отражающий уровни развития флуоресценции ПДК в зависимости от воздействия лактатом кальция. Как видно на фиг. 13a и 13b, было подтверждено, что уровни экспрессии белка ПДК в клетках, на которые воздействовали лактатом кальция, резко возрастают.

Пример 6-4. Эффект лактата кальция на уровень α -КГ (α -кетоглутарата).

Результаты, описанные в примере 6-3, подтвердили, что уровни экспрессии белка ПДК в раковой клетке возрастают при воздействии лактатом кальция. Следовательно, исследовали эффект лактата кальция в отношении внутриклеточных уровней α -КГ (α -кетоглутарата), синтезируемого в цикле ЦТК, активируемом ПДК. α -КГ может быть синтезирован из глутамина, содержащегося в среде. Соответственно в указанном случае использовали линии раковых клеток, культивированных в нормальной среде или в не содержащей глутамина среде.

На клетки линий раковых клеток в количестве 5×10^5 клеток, культивированные в нормальной среде

или в не содержащей глутамина среде, воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция в течение 24 ч; указанные клетки разрушали обработкой ультразвуком и получали фильтрат с применением фильтра с отсечением по массе 10 кДа. Полученный фильтрат использовали с набором для анализа на α -кетоглутарат (BioVision, Экстон, Пенсильвания) для измерения концентрации содержащегося в фильтрате α -КГ (фиг. 14a и 14b).

На фиг. 14a представлены графики количественного анализа, отражающие изменения концентрации α -КГ в линиях раковых клеток при воздействии лактатом кальция в нормальной среде. На фиг. 14b представлен график количественного анализа, отражающий изменения концентрации α -КГ в линиях раковых клеток при воздействии лактатом кальция в не содержащей глутамина среде. Как видно на фиг. 14a и 14b, было подтверждено, что при культивировании линий раковых клеток в нормальной среде или в не содержащей глутамина среде при воздействии лактатом кальция уровни α -КГ в указанных клетках резко возрастают.

В совокупности результаты, описанные в примерах с 6-1 по 6-4, показывают, что в раковой клетке, на которую воздействовали лактатом кальция, уровни ЛДГ-Б, преобразующей лактат в пируват, пирувата, продуцируемого под действием ЛДГ-Б, ПДК (пируватдегидрогеназы), переводящей пируват в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), и α -КГ, синтезируемого в цикле ЦТК, активируемом ПДК, повышаются.

Пример 7. Эффект лактата кальция в отношении метастазирования, инвазии и уровней экспрессии фактора ангиогенеза раковых клеток.

Результаты, описанные в примере 6, подтвердили, что в раковой клетке, на которую воздействовали лактатом кальция, уровень α -КГ повышается. Следовательно, исследовали эффекты лактата кальция на уровни экспрессии влияющих на метастазирование, инвазию и ангиогенез раковых клеток факторов, которые регулируются α -КГ.

Пример 7-1. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии белка HIF-1A (индуцируемого гипоксией фактора 1 α).

Исследовали эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии белка HIF-1A (индуцируемого гипоксией фактора 1 α), известного как фактор метастазирования раковых клеток.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29) культивировали в течение 24 ч в условиях нормоксии или гипоксии, воздействуя или не воздействуя на них 2,5 мМ лактатом кальция. Затем проводили вестерн-блоттинг с применением антитела против HIF-1A для каждой из культивированных линий раковых клеток (верхняя часть фиг. 15).

В верхней части фиг. 15 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие уровни экспрессии белка HIF-1A, экспрессируемого в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч при воздействии 2,5 мМ лактатом кальция или без лактата кальция в условиях нормоксии или гипоксии. Как видно по верхней части фиг. 15, было подтверждено, что HIF-1A экспрессируется в условиях гипоксии, однако при воздействии на клетки раковых линий лактатом кальция HIF-1A не экспрессируется даже в условиях гипоксии.

Затем на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29) воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях (0,5, 1,5 и 2,5 мМ) в условиях гипоксии, культивировали и измеряли изменение уровней экспрессии HIF-1A в ядре раковой клетки (нижняя часть фиг. 15).

В нижней части фиг. 15 приведены снимки вестерн-блотов, демонстрирующие уровни экспрессии белка HIF-1A, экспрессируемого в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч при воздействии 0,5, 1,5 и 2,5 мМ лактатом кальция в условиях гипоксии. Как видно по нижней части фиг. 15, было подтверждено, что лактат кальция подавляет экспрессию HIF-1A, уменьшая ее уровни зависимым от концентрации образом.

Пример 7-2. Эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов).

Результаты, описанные в примере 7-1, подтвердили, что лактат кальция подавляет экспрессию HIF-1A, уменьшая ее уровни зависимым от концентрации образом. Следовательно, исследовали эффект лактата кальция в отношении уровней экспрессии ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов), известного как фактор инвазии раковых клеток, экспрессию которого регулирует HIF-1A.

На клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29) воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция в условиях гипоксии и культивировали в течение 24 ч. Затем анализировали уровни экспрессии мРНК и уровней экспрессии белка ФРЭС в клетках каждой из культивированных линий раковых клеток (фиг. 16a и 16b). В указанном случае клетки линии рака толстой и прямой кишки человека, культивированные в отсутствие воздействия лактатом кальция, в условиях нормоксии или гипоксии, использовали в качестве контрольных групп.

На фиг. 16a представлены графики, отражающие результаты измерения уровней экспрессии мРНК и уровней экспрессии белка (фиг. 16b) ФРЭС в клетках линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116 и HT-29), культивированных в течение 24 ч при воздействии 2,5 мМ лактатом кальция или без лактата кальция, в условиях нормоксии или гипоксии. Как видно на фиг. 16a и 16b, было подтверждено, что уровень ФРЭС резко возрастает в условиях гипоксии, однако при воздействии на клетки раковых

линий лактатом кальция указанный повышенный уровень ФРЭС снижается.

Пример 7-3. Эффект лактата кальция на вызванное происходящим из раковых клеток фактором формирование трубки эндотелиальными клетками сосудов человека (HUVEC).

Для подтверждения эффекта лактата кальция на ангиогенез исследовали эффект лактата кальция в отношении секретируемого раковой клеткой фактора, который может индуцировать формирование трубки эндотелиальными клетками сосудов человека (HUVEC).

На клетки линий раковых клеток, культивированных в среде RPMI-1640 с добавлением 1% ФБС, воздействовали 0,5, 1, 1,5 и 2,5 мМ лактатом кальция в течение 24 ч и получали из них культуральные супернатанты. Эндотелиальные клетки сосудов человека (HUVEC) инокулировали в каждый из полученных культуральных супернатантов и культивировали для анализа конформационных изменений клеток (фиг. 17). В указанном случае в качестве контрольной группы использовали HUVEC, культивированные с применением культуральной среды для линий раковых клеток, без воздействия лактатом кальция; в качестве группы сравнения использовали HUVEC, культивированные при воздействии сульфорафана, который представляет собой ингибитор роста HUVEC.

На фиг. 17 приведены флуоресцентные изображения, демонстрирующие уровни формирования трубки эндотелиальными клетками сосудов человека (HUVEC), на которые воздействовали лактатом кальция в различных концентрациях. Клетки HUVEC культивировали с использованием среды для культивирования линий раковых клеток с разными концентрациями лактата кальция. Как видно на фиг. 17, было подтверждено, что по сравнению с контрольной группой, демонстрирующей ярковыраженную способность к формированию трубки, клетки HUVEC, культивированные с использованием супернатантов культур линий раковых клеток, на которые воздействовали лактатом кальция, демонстрировали снижение способности к формированию трубки по мере увеличения концентрации лактата кальция; клетки HUVEC, культивированные в супернатанте культуры клеток раковых линий, на которые воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция, демонстрировали пониженную способность к формированию трубки, аналогичную группе сравнения, на которую воздействовали сульфорафаном. Поскольку ангиогенез в клетках HUVEC индуцирует фактор, секретируемый раковыми клетками, было подтверждено, что лактат кальция отличается зависимой от концентрации ингибирующей активностью на указанный индуцирующий ангиогенез фактор.

В совокупности результаты, описанные в примерах 7-1-7-3, показывают, что лактат кальция оказывает ингибирующий эффект на экспрессию HIF-1A, известного как фактор метастазирования раковых клеток, и ФРЭС, известного как фактор инвазии раковых клеток, а также обуславливает эффект снижения ангиогенеза.

Пример 8. Эффект лактата кальция в отношении метастазирования и инвазии линии раковых клеток.

Результаты, описанные в примере 7, подтвердили, что лактат кальция оказывает ингибирующий эффект на экспрессию HIF-1A, известного как фактор метастазирования раковых клеток, и ФРЭС, известного как фактор инвазии раковых клеток, а также оказывает ингибирующий эффект на активность фактора, индуцирующего ангиогенез. Следовательно, исследовали фактические эффекты лактата кальция в отношении метастазирования и инвазии раковых клеток путем анализа миграции раковых клеток.

Пример 8-1. Эффект лактата кальция в отношении метастазирования и инвазии клеток линии рака толстой и прямой кишки.

Клетками линии рака толстой и прямой кишки HCT-116 в количестве 4×10^5 клеток инокулировали контейнер для культивирования, в центр которого помещали культуральный вкладыш Ibidi толщиной 500 мкм, обрабатывали 2,5 мМ лактатом кальция и затем культивировали в течение 24 ч. Затем вкладыш извлекали и продолжали культивирование в течение 12 ч для анализа миграции раковых клеток в сайт, где размещался извлеченный вкладыш, с применением анализатора клеток JuLi Br Live Cell Analyzer (NanoEnTek Inc., Южная Корея) (фиг. 18). В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки, культивированные без воздействия лактатом кальция.

На фиг. 18 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака толстой и прямой кишки, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. Как видно на фиг. 18, было подтверждено, что миграция клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция, снижается, тогда как миграция клеток линии рака толстой и прямой кишки в контрольной группе, на которую не воздействовали лактатом кальция, сохраняется.

Пример 8-2. Эффект лактата кальция в отношении метастазирования и инвазии клеток линии рака молочной железы.

С применением способа, описанного в примере 8-1, исследовали эффект лактата кальция на миграцию клеток линий рака молочной железы, используя клетки линий рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB231) вместо клеток линии рака толстой и прямой кишки (фиг. 19).

На фиг. 19 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии рака молочной железы, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. Как видно на фиг. 19,

было подтверждено, что клетки линий рака молочной железы, на которые воздействовали лактатом кальция, демонстрируют относительно низкие уровни метастазирования по сравнению с клетками линий рака молочной железы контрольных групп, на которые не воздействовали лактатом кальция.

Пример 8-3. Эффект лактата кальция в отношении метастазирования и инвазии в линии клеток меланомы.

С применением способа, описанного в примере 8-1, исследовали эффект лактата кальция на миграцию клеток в линиях клеток меланомы (SKMEL-02 и SKMEL-28) вместо клеток линии рака толстой и прямой кишки, дополнительно культивированных в течение 24 ч после извлечения вкладыша (фиг. 20).

На фиг. 20 представлены фотографии, отражающие результаты, подтверждающие миграцию клеток, которая указывает на способность к метастазированию клеток линии меланомы, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. Как видно на фиг. 20, было подтверждено, что в линиях клеток меланомы, на которые воздействовали лактатом кальция, наблюдаются относительно низкие уровни метастазирования по сравнению с линиями клеток меланомы контрольных групп, на которые не воздействовали лактатом кальция.

В совокупности результаты, описанные в примерах 8-1 - 8-3, показывают, что лактат кальция может ингибировать метастазирование всех раковых клеток, таких как клетки рака толстой и прямой кишки, рака молочной железы и меланомы.

Пример 9. Эффект лактата кальция в отношении жизнеспособности в линии раковых клеток.

Исследовали эффект лактата кальция в отношении жизнеспособности клеток линий рака молочной железы, клеток линий рака толстой и прямой кишки и меланомы.

Пример 9-1. Эффект лактата кальция в отношении жизнеспособности клеток линии рака молочной железы.

Клетки линий рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB231) культивировали в течение 24 ч при воздействии или без воздействия 2,5 мМ лактатом кальция. Клетки каждой из линий рака молочной железы обрабатывали 5 мкл ФИТЦ-конъюгированного аннексина V и 5 мкл йодистого пропидия и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем выполняли их проточно-цитометрический анализ с применением FACS Calibur (BD Bioscience, США) для оценки окрашивания и соответственно измерения уровней апоптоза раковых клеток (фиг. 21a-21f).

На фиг. 21a и 21d приведены фотографии, отражающие результаты для клеток линии MCF-7 и MDA-MB231 соответственно, подтверждающие миграцию клеток, указывающую на способность к метастазированию клеток линии рака молочной железы, в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция. На фиг. 21b, 21c, 21e и 21f представлены результаты проточно-цитометрического анализа, отражающие изменения уровня выживаемости. Как видно на фиг. 21b и 21c, было подтверждено, что в клетках линии MCF-7 наблюдается уровень апоптоза, составляющий 9,63% до воздействия лактатом кальция и 33,8% после воздействия лактатом кальция; в клетках линии MDA-MB231 (фиг. 21e и 21f) наблюдается уровень апоптоза, составляющий 10,17% до воздействия лактатом кальция и 13,05% после воздействия лактатом кальция.

Соответственно, как можно видеть, в клетках линий рака молочной железы, на которые воздействовали лактатом кальция, уровень клеточного апоптоза повышается.

Пример 9-2. Эффект лактата кальция в отношении конформационного изменения стволовых клеток линий рака толстой и прямой кишки.

Стволовыми клетками линии рака толстой и прямой кишки человека инокулировали культуральную среду для стволовых клеток (среду, содержащую 1% пенициллина/стрептомицина и 50× B27 и включающую среду DMEM и среду F12, смешанные в соотношении 1:1) и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. На культивированные стволовые клетки линии рака толстой и прямой кишки воздействовали лактатом кальция, а затем проверяли наличие или отсутствие конформационного изменения сферы, образуемой указанными стволовыми клетками (фиг. 22). В указанном случае в качестве контрольной группы использовали раковые клетки, на которые воздействовали ДМСО вместе лактата кальция.

На фиг. 22 представлены микроскопические изображения, демонстрирующие конформационное изменение сферы в зависимости от воздействия на стволовые клетки линии рака толстой и прямой кишки, образующие указанную сферу, лактатом кальция. Как видно на фиг. 22, было подтверждено, что в контрольной группе, на которую не воздействовали лактатом кальция, сфера сохраняется, однако после воздействия лактатом кальция сферическая конформация разрушается, что подтверждает снижение жизнеспособности стволовых клеток рака толстой и прямой кишки.

Пример 9-3. Эффект лактата кальция в отношении колониеобразующей способности линии раковых клеток.

Сначала клетки линий рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116, HT-29 и DLD-1) инокулировали в твердые среды, содержащие различные концентрации (0, 0,5, 1,5 или 2,5 мМ) лактата кальция, и культивировали в течение 10 дней. После окончания культивирования клетки иммобилизовали и окрашивали гематоксилином. Затем подсчитывали количество раковых клеток, образующих колонии (фиг.

23).

На фиг. 23 представлены фотографии и графики (слева: НСТ-116, в середине: НТ-29, справа: DLD-1), отражающие результаты сравнения колониеобразующей способности клеток линии рака толстой и прямой кишки в зависимости от воздействия лактатом кальция. Как видно на фиг. 23, было подтверждено, что клетки всех линий рака толстой и прямой кишки, на которые не воздействовали лактатом кальция, образуют от 260 до 360 колоний, однако при возрастании концентрации лактата кальция число колоний уменьшается, и при воздействии на клетки линий рака толстой и прямой кишки 2,5 мМ лактатом кальция образуется только 100-120 колоний.

Затем с применением способа согласно описанию выше клетками линий меланомы человека (SKMEL-02 и SKMEL-28) инокулировали твердые среды, содержащие различные концентрации (1, 2,5 или 5 мМ) лактата кальция, культивировали и подсчитывали число раковых клеток, образующих колонии (фиг. 24a и 24b).

На фиг. 24a и 24b приведены графики и таблицы, отражающие результаты сравнения колониеобразующей способности клеток линии меланомы в зависимости от воздействия лактатом кальция. Как видно на фиг. 24a и 24b, было подтверждено, что клетки линий меланомы человека, на которые не воздействовали лактатом кальция, образуют от 105 до 168 колоний; при возрастании концентрации лактата кальция число колоний уменьшалось; при воздействии на клетки линии SKMEL-28 5 мМ лактатом кальция колонии не образуются, а при воздействии на клетки линии SKMEL-02 5 мМ лактатом кальция образуется приблизительно 49 колоний.

В совокупности указанные результаты показывают, что лактат кальция оказывает ингибирующее действие на колониеобразующую способность клеток линий рака толстой и прямой кишки и меланомы.

Пример 9-4. Эффект комбинации лактата кальция с материалом, обладающим противораковой активностью, в отношении жизнеспособности линии раковых клеток.

Подготавливали планшеты с полуклекарственными средствами на основе агарозы, содержащие 5 мМ лактат кальция или материалы, обладающие известной противораковой активностью (1 мМ ИС (5-индансульфонамид) или 5 мМ КК (коричную кислоту)) по отдельности или в комбинации. Затем клетками линии рака толстой и прямой кишки человека НСТ-116 инокулировали каждый из подготовленных планшетов и культивировали в течение 10 дней. После этого сравнивали уровни выживаемости указанных клеток (фиг. 25a и 25b).

На фиг. 25a и 25b приведены графики, отражающие результаты сравнения уровня выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали, по отдельности или в комбинации, лактатом кальция, 5-индансульфонамидом (ИС) в качестве ингибитора карбоангидразы или коричной кислотой (КК) в качестве ингибитора МСТ-4, который обеспечивает отток лактата. Как видно на фиг. 25a и 25b, было подтверждено, что уровни выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция или материалами с известной противораковой активностью (ИС или КК) по отдельности, снижались приблизительно до 60%; уровни выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки, на которые воздействовали лактатом кальция в комбинации с ИС или КК, либо и ИС, и КК, дополнительно снижались приблизительно до 10-30%.

Пример 9-5. Эффект лактата кальция в отношении жизнеспособности линии раковых клеток при пониженной адгезивности.

Клетками линий рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116, НТ-29 и DLD-1) инокулировали низкоадгезивный 6-луночный планшет и затем культивировали при воздействии лактатом кальция в различных концентрациях (0, 1,5 или 2,5 мМ). Затем сравнивали уровни выживаемости клеток (фиг. 26).

На фиг. 26 представлены графики, отражающие результаты сравнения эффектов лактата кальция на уровень выживаемости клеток линии рака толстой и прямой кишки при культивировании в низкоадгезивном культуральном контейнере. Как видно на фиг. 26, было подтверждено, что при культивировании клеток линий рака толстой и прямой кишки в культуральной среде в условиях низкой адгезивности без воздействия лактатом кальция уровень клеточного апоптоза очень незначителен (приблизительно 5%), однако при воздействии на указанные клетки лактатом кальция уровень клеточного апоптоза резко возрастает (приблизительно до 90%).

В совокупности результаты, описанные в примерах 9-1-9-5, показывают, что лактат кальция может понижать уровни выживаемости всех раковых клеток, таких как клетки рака толстой и прямой кишки и клетки меланомы.

Пример 10. Верификация эффекта лактата кальция с применением модели на животных.

Пример 10-1. Получение экспериментальной группы с применением модели на животных.

Клетки рака толстой и прямой кишки (НТ-29) культивировали в среде RPMI1640, затем разводили в ФСБ и подкожно имплантировали в боковую область мышам Balb/c. Опухолям из клеток рака толстой и прямой кишки у мышей позволяли достичь размера, составляющего приблизительно 5 мм. После этого мышей разделяли на четыре группы: контрольная группа, в которой лечение лактатом кальция на протяжении 30 дней не проводилось, экспериментальная группа 1 (пероральное введение, п/о), в которой перорально вводили 2,5 мМ лактат кальция, экспериментальная группа 2 (внутриопухолевое введение, в/о), в которой 2,5 мМ лактат кальция инъецировали вокруг опухоли, и экспериментальная группа 3 (подкож-

ное введение, п/к), в которой подкожно инъецировали 25 мМ лактат кальция (фиг. 27).

На фиг. 27 представлено схематическое изображение эксперимента с лечением лактатом кальция в моделях на животных.

Пример 10-2. Изменение уровней экспрессии ПАРП.

Извлекали раковые ткани толстой и прямой кишки у мышей контрольной группы, экспериментальной группы 1 или экспериментальной группы 2 согласно описанию в примере 10-1 и сравнивали уровни экспрессии ПАРП и усеченного ПАРП, принимающих участие в стабилизации экспрессирующих их раковых клеток (фиг. 28). На фиг. 28 приведено изображение, демонстрирующее изменение уровней экспрессии белков ПАРП, экстрагированных из опухолевой ткани, в модели ксенотрансплантатов на животных, в зависимости от способа лечения лактатом кальция, и в зависимости от того проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция. Как видно на фиг. 28, было подтверждено, что в экспериментальных группах, в которых различным образом проводили лечение лактатом кальция, по сравнению с контрольной группой, на которую не воздействовали лактатом кальция, деградирующая активность ПАРП повышается.

Пример 10-3. Изменение уровней экспрессии HIF-1A и ФРЭС в модели на животных при пероральном введении лактата кальция.

Раковые ткани толстой и прямой кишки извлекали у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 1, описанных в примере 10-1, и сравнивали уровни экспрессии HIF-1A и ФРЭС, вовлеченных в метастазирование, инвазию и ангиогенез экспрессирующей их опухоли (фиг. 29). В указанном случае для групп внутреннего контроля использовали ГАФДГ.

На фиг. 29 представлены фотографии, демонстрирующие изменение уровней экспрессии HIF-1A или ГАФДГ в зависимости от того, воздействовали или не воздействовали на них лактатом кальция, в белках, экстрагированных из опухолевых тканей в моделях на животных с пероральным введением лактата кальция. Как видно на фиг. 29, было подтверждено, что экспрессия HIF-1A и ФРЭС ингибирована в экспериментальной группе 1, где проводили лечение лактатом кальция, по сравнению с контрольной группой, на которую не воздействовали лактатом кальция.

Пример 10-4. Изменение размера опухоли в модели на животных при пероральном введении лактата кальция.

Измеряли зависимость от времени и сравнивали объем раковых тканей толстой и прямой кишки, извлеченных у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 1, описанных в примере 10-1 (фиг. 30).

На фиг. 30 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того, проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция в модели на животных, которым перорально вводили 2,5 мМ лактат кальция. Как видно на фиг. 30, конечный объем опухолей в контрольной группе, не получавшей лечения лактатом кальция, составляет приблизительно $1200 \text{ мм}^3 \times 10^3$, тогда как конечный объем опухолей в экспериментальной группе 1, где проводили лечение лактатом кальция, составляет приблизительно $480 \text{ мм}^3 \times 10^3$. Соответственно, как можно видеть, лактат кальция оказывает ингибирующий эффект на рост опухоли.

Пример 10-5. Изменение уровней экспрессии HIF-1A и ФРЭС в моделях на животных, которым инъецировали лактат кальция.

Раковые ткани толстой и прямой кишки извлекали у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 2, описанных в примере 10-1, и сравнивали в них уровни экспрессии HIF-1A и ФРЭС, вовлеченных в метастазирование, инвазию и ангиогенез опухоли (фиг. 31). В указанном случае для групп внутреннего контроля использовали ГАФДГ.

На фиг. 31 показаны вестерн-блоты, демонстрирующие изменение уровней экспрессии HIF-1A или ГАФДГ, для белка, экстрагированного из опухолевых тканей в модели ксенотрансплантатов на животных, в зависимости от того, вводился или не вводился лактат кальция в область вокруг опухоли. Как видно на фиг. 31, было подтверждено, что в экспериментальной группе 2, где проводилось лечение лактатом кальция, по сравнению с контрольной группой, где не проводилось лечение лактатом кальция, экспрессия HIF-1A и ФРЭС ингибирована.

Пример 10-6. Изменение размера опухоли в модели на животных, которым инъецировали лактат кальция.

Измеряли зависимость от времени и сравнивали объем раковых тканей толстой и прямой кишки, извлеченных у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 2, описанных в примере 10-1 (фиг. 32).

На фиг. 32 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того, проводилось или не проводилось лечение путем введения 2,5 мМ лактата кальция вокруг опухоли. Как видно на фиг. 32, было подтверждено, что конечный объем опухолей в контрольной группе, не получавшей лечения лактатом кальция, составляет приблизительно $1200 \text{ мм}^3 \times 10^3$, тогда как указанный конечный объем опухолей в экспериментальной группе 2, получавшей лечение лактатом кальция, составляет приблизительно $490 \text{ мм}^3 \times 10^3$. Соответственно, как можно видеть, лактат кальция оказывает ингибирующий

эффект на рост опухоли.

Пример 10-7. Изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от лечения лактатом кальция.

Сравнивали морфологию опухоли у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 2, описанных в примере 10-1 (фиг. 33).

На фиг. 33 представлены фотографии, демонстрирующие изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от инъектирования 2,5 мМ лактата кальция вокруг опухоли. Фотография опухоли из контрольной группы, в которой не проводилось лечение лактатом кальция, на фиг. 33 подтверждает, что опухоль имеет значительные размеры и отличается усиленным ангиогенезом на поверхности; в то же время фотография опухоли из экспериментальной группы подтверждает уменьшение размеров и снижение ангиогенеза.

Пример 10-8. Изменение размера опухоли в модели на животных при подкожном инъектировании лактата кальция.

Измеряли зависимость от времени и сравнивали объем раковых тканей толстой и прямой кишки, извлеченных у мышей контрольной группы или экспериментальной группы 3, описанных в примере 10-1 (фиг. 34).

На фиг. 34 представлен график, отражающий изменение объема опухоли в зависимости от того, проводилось или не проводилось лечение лактатом кальция в модели на животных, в которой 25 мМ лактат кальция инъектировали подкожно вокруг затылка. Как видно на фиг. 34, было подтверждено, что конечный объем опухолей в контрольной группе, не получавшей лечения лактатом кальция, составляет приблизительно 2300 мм³, тогда как конечный объем опухолей в экспериментальной группе 3, получавшей лечение лактатом кальция, составляет приблизительно 80 мм³. Соответственно, как можно видеть, 25 мМ лактат кальция оказывает ингибирующий эффект на рост опухоли.

Пример 10-9. Изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от лечения лактатом кальция.

Сравнивали морфологию опухоли мышей контрольной группы или экспериментальной группы 3, описанных в примере 10-1 (фиг. 35).

На фиг. 35 представлены фотографии, демонстрирующие изменение морфологии опухоли в модели на животных в зависимости от лечения 25 мМ лактатом кальция. Фотография опухоли из контрольной группы, в которой не проводилось лечение 25 мМ лактатом кальция, на фиг. 35 подтверждает, что опухоль имеет значительные размеры и отличается усиленным ангиогенезом на поверхности, тогда как фотография опухоли из экспериментальной группы 3 подтверждает значительно меньшие размеры опухоли, а также снижение ангиогенеза. Соответственно в совокупности результаты, описанные в примерах 10-1-10-9, показывают, что лактат кальция в концентрации 2,5-25 мМ демонстрирует превосходную противораковую активность в модели на животных.

Пример 11. Эффект лечения рака толстой и прямой кишки облучением в комбинации с введением лактата кальция.

Примеры 10-2, 10-3 и 10-5 подтверждают, что экспрессия ПАРП, HIF-1A и ФРЭС снижается при воздействии лактатом кальция. Согласно настоящему документу указанные факторы придают устойчивость к облучению. Соответственно при обусловленном лактатом кальция уменьшении количества указанных факторов эффективность облучения может повышаться, что и было подтверждено.

Пример 11-1. Получение экспериментальных групп с применением модели на животных.

Клетки рака толстой и прямой кишки (HT-29 или HCT-116) подкожно имплантировали мышам в боковую область. Опухолям из клеток рака толстой и прямой кишки у мышей позволяли достичь размера, составляющего приблизительно 5 мм. После этого мышей разделяли на четыре группы: контрольная группа, в которой лечение лактатом кальция на протяжении 30 дней не проводилось, экспериментальная группа 11 (внутриопухолевое введение, в/о), в которой инъектировали 2,5 мМ лактат кальция, экспериментальная группа 12 (IR), получавшая облучение в дозе 2 Гр пятикратно с использованием рентгеновского облучателя X-RAD 320 (300 кВп), оснащенного алюминиевым фильтром толщиной 2,0 мм, и экспериментальная группа 13 (CaLa+IR), получавшая облучение в дозе 2 Гр пятикратно и инъекции 2,5 мМ лактата кальция в те же моменты времени (фиг. 36).

На фиг. 36 приведено схематическое изображение схемы эксперимента с лечением облучением и лактатом кальция в моделях на животных.

Пример 11-2. Изменение размера опухоли в модели на животных при лечении облучением в комбинации с лактатом кальция.

Измеряли зависимость от времени и сравнивали объем раковых тканей толстой и прямой кишки, извлеченных у мышей контрольной группы или каждой из экспериментальных групп, описанных в примере 11-1 (фиг. 37a и 37b).

На фиг. 37a представлен график, отражающий изменение объема опухоли со временем в модели ракового заболевания на животных, которую получали путем имплантации клеток HT-29 линии рака толстой и прямой кишки в боковую область, в зависимости от того, проводилось лечение облучением и лактатом кальция по отдельности или в комбинации, и на фиг. 37b представлен график, отражающий изме-

нение объема опухоли со временем в модели ракового заболевания на животных, которую получали путем имплантации клеток НСТ-116 линии рака толстой и прямой кишки в боковую область, в зависимости от того, проводилось лечение облучением и лактатом кальция по отдельности или в комбинации.

Как видно на фиг. 37a и 37b, было подтверждено, что в экспериментальных группах, получавших лечение облучением и лактатом кальция по отдельности или в комбинации, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения облучением и лактатом кальция, рост опухоли ингибируется независимо от типа имплантированных клеток линии рака толстой и прямой кишки и, в частности, в экспериментальной группе 13, получавшей лечение облучением в комбинации с лактатом кальция, рост опухоли ингибирован до минимального уровня.

Указанный результат подтвердил, что лечение лактатом кальция может ингибировать экспрессию факторов, придающих устойчивость к облучению; анализ показал, что при лечении лактатом кальция в комбинации с облучением эффективность противоракового лечения может повышаться даже при использовании меньшей дозы облучения. Соответственно лактат кальция может применяться отдельно для лечения ракового заболевания. Однако, как можно видеть, при введении лактата кальция в комбинации с облучением можно добиться лучшего эффекта противоракового лечения.

Пример 12. Воздействие хорошо известным противораковым лекарственным средством в комбинации с лактатом кальция.

В примере 9-4 было подтверждено, что воздействие лактатом кальция в комбинации с материалом, демонстрирующим противораковую активность, снижает жизнеспособность раковой клетки по сравнению с воздействием лактатом кальция или указанным материалом по отдельности. Исходя из указанного результата, проверяли эффект воздействия хорошо известного противоракового лекарственного средства в комбинации с лактатом кальция на различные линии раковых клеток.

Пример 12-1. Воздействие иматинибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29 и НСТ-116) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, или иматинибом в различных концентрациях (1, 2,5 и 5 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольных групп использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29 и НСТ-116), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 38a, 38b, 39a и 39b).

На фиг. 38a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 38b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1F, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 39a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 39b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ иматинибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 38a, 38b, 39a и 39b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали иматинибом в низких концентрациях (1, 2,5 и 5 мкМ) по отдельности происходит подавление колониобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали иматинибом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно иматинибом.

Пример 12-2. Воздействие 5-FU (5-фторурацилом) в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29 и НСТ-116) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU или 5-FU в различных концентрациях (2,5, 5 и 10 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольных групп использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29 и НСТ-116), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 40a, 40b, 41a и 41b).

На фиг. 40a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации. На фиг. 40b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 1 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации. На фиг. 41a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НСТ-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или

в комбинации. На фиг. 41b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HCT-116) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ 5-FU, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 40a, 40b, 41a и 41b, было подтверждено, что наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно 5-FU в низких концентрациях (2,5, 5 и 10 мкМ), по сравнению с контрольной группой; дополнительное подавление колониеобразующей способности происходит в группах, на которые воздействовали 5-FU и лактатом кальция в комбинации, по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно 5-FU.

Пример 12-3. Воздействие паклитакселом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) и клетки линии рака легкого человека (A549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция или 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом по отдельности или паклитакселом в различных концентрациях (0,63, 1,3 и 2,5 нМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольных групп использовали клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) и клетки линии рака легкого человека (A549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 42a, 42b, 43a и 43b).

На фиг. 42a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 42b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 42a и 42b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно паклитакселом в низких концентрациях (0,63, 1,3 и 2,5 нМ), происходит подавление колониеобразующей способности по сравнению с контрольной группой; а в группах, на которые воздействовали паклитакселом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно паклитакселом.

На фиг. 43a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 43b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,63, 1,3 и 2,5 нМ паклитакселом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 43a и 43b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно паклитакселом в низких концентрациях (0,63, 1,3 и 2,5 нМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали паклитакселом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно паклитакселом.

Пример 12-4. Воздействие гефинитибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака легкого человека (A549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 1,3, 2,5 и 5 мкМ гефинитибом, или гефинитибом в различных концентрациях (1,3, 2,5 и 5 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака легкого человека (A549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 44a и 44b).

На фиг. 44a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ гефинитибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 44b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ гефинитибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 44a и 44b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно гефинитибом в низких концентрациях (1,3, 2,5 и 5 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; дополнительное подавление колониеобразующей способности происходит в группах, на которые воздействовали гефинитибом и лактатом кальция в комбинации, по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно гефинитибом.

Пример 12-5. Воздействие сорафенибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака печени (Hep3B) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каж-

дый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 1, 2,5 и 5 мкМ сорафенибом или обрабатывали сорафенибом в различных концентрациях (1, 2,5 и 5 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака печени (Нер3В), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 45а и 45b).

На фиг. 45а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (Нер3В) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ сорафенибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 45b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (Нер3В) 2,5 мМ лактатом кальция и 1, 2,5 и 5 мкМ сорафенибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 45а и 45b, было подтверждено, что наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно сорафенибом в низких концентрациях (1, 2,5 и 5 мкМ), по сравнению с контрольной группой; происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности в группах, на которые воздействовали сорафенибом и лактатом кальция в комбинации, по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно сорафенибом.

Пример 12-6. Воздействие иринотеканом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 0,5, 1 и 2 мкМ иринотеканом; или иринотеканом в различных концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 46а и 46b).

На фиг. 46а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ иринотеканом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 46b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ иринотеканом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 46а и 46b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно иринотеканом в низких концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали иринотеканом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно иринотеканом.

Пример 12-7. Воздействие эрлотинибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака легкого человека (А549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 0,5, 1 и 2 мкМ эрлотинибом, или эрлотинибом в различных концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака легкого человека (А549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 47а и 47b).

На фиг. 47а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ эрлотинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 47b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (А549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ эрлотинибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 47а и 47b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно эрлотинибом в низких концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали эрлотинибом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно эрлотинибом.

Пример 12-8. Воздействие сунитинибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (НТ-29) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 0,5, 1 и 2 мкМ сунитинибом, или сунитинибом в различных концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной груп-

пы использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 48а и 48б). На фиг. 48а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ сунитинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 48б приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,5, 1 и 2 мкМ сунитинибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 48а и 48б, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно сунитинибом в низких концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали сунитинибом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно сунитинибом.

Пример 12-9. Воздействие метотрексатом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака легкого человека (A549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 5, 10 и 20 нМ метотрексатом, или метотрексатом в различных концентрациях (5, 10 и 20 нМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака легкого человека (A549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 49а и 49б).

На фиг. 49а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 5, 10 и 20 нМ метотрексатом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 49б приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 5, 10 и 20 нМ метотрексатом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 49а и 49б, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно метотрексатом в низких концентрациях (5, 10 и 20 нМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали метотрексатом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно метотрексатом.

Пример 12-10. Воздействие карбоплатином в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака легкого человека (A549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 2,5, 5 и 10 мкМ карбоплатином, или карбоплатином в различных концентрациях (2,5, 5 и 10 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака легкого человека (A549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 50а и 50б).

На фиг. 50а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ карбоплатином, по отдельности или в комбинации. На фиг. 50б приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 2,5, 5 и 10 мкМ карбоплатином, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 50а и 50б, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно карбоплатином в низких концентрациях (2,5, 5 и 10 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали карбоплатином и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно карбоплатином.

Пример 12-11. Воздействие доцетакселом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака легкого человека (A549) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 0,6, 1,3 и 2,5 нМ доцетакселом, или доцетакселом в различных концентрациях (0,6, 1,3 и 2,5 нМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака легкого человека (A549), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 51а и 51б).

На фиг. 51а приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,6, 1,3 и 2,5 нМ доцетакселом, по от-

дельности или в комбинации. На фиг. 51 b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака легкого человека (A549) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,6, 1,3 и 2,5 нМ доцетакселом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 51 а и 51b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно доцетакселом в низких концентрациях (0,6, 1,3 и 2,5 нМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали доцетакселом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно доцетакселом.

Пример 12-12. Воздействие лапатинибом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 2, 4 и 8 мкМ лапатинибом, или лапатинибом в различных концентрациях (2, 4 и 8 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 52a и 52b).

На фиг. 52a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 2, 4 и 8 мкМ лапатинибом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 52b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 2, 4 и 8 мкМ лапатинибом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 52a и 52b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно лапатинибом в низких концентрациях (2, 4 и 8 мкМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группах, на которые воздействовали лапатинибом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно лапатинибом.

Пример 12-13. Воздействие эверолимусом в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака почки человека (Caki-1) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую, и на указанные клетки воздействовали отдельно 0,3, 0,5 и 1 нМ эверолимусом или эверолимусом в различных концентрациях (0,3, 0,5 и 1 нМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака почки человека (Caki-1), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 53a и 53b).

На фиг. 53a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака почки человека (Caki-1) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,3, 0,5 и 1 нМ эверолимусом, по отдельности или в комбинации. На фиг. 53b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака почки человека (Caki-1) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,3, 0,5 и 1 нМ эверолимусом, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 53a и 53b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали отдельно эверолимусом в низких концентрациях (0,3, 0,5 и 1 нМ), наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток по сравнению с контрольной группой; в группе, на которую воздействовали эверолимусом и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно эверолимусом.

Пример 12-14. Воздействие трастузумабом (герцептином) в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) в количестве 1×10^3 клеток, демонстрирующие устойчивость к противораковому лекарственному средству трастузумабу, высевали в среду RPMI1640 (содержащую 1% фетальной бычьей сыворотки+500 нг/мкл фактора роста эпителия) в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали отдельно 2,5 мМ лактатом кальция или отдельно 0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба, или трастузумабом в различных концентрациях (0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 54a и 54b).

На фиг. 54a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба, по отдельности или в комбинации. На фиг. 54b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака молочной железы человека (MCF-7) 2,5 мМ лактатом кальция и 0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба, по отдельности или в комбинации. Как видно на

фиг. 54a и 54b, было подтверждено, что в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, колониеобразующая способность снижается по сравнению с контрольной группой, при этом в группах, на которые воздействовали отдельно трастузумабом в низких концентрациях (0,23, 0,45 и 1,8 мкг/мл), колониеобразующая способность отличалась от контрольной группы незначительно. Однако было подтверждено, что в группах, на которые воздействовали 0,2, 0,45 и 1,8 мкг/мл трастузумаба в комбинации с лактатом кальция, наблюдалось большее подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно трастузумабом, не проявлявшим противоракового эффекта.

Пример 12-15. Воздействие оксалиплатином в комбинации с лактатом кальция.

Клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) в количестве 1×10^3 клеток высевали в среду RPMI1640 в каждый из 6-луночных планшетов. Через сутки среду заменяли на свежую и на клетки воздействовали 2,5 мМ лактатом кальция или 1,3, 2,5 и 5 мкМ оксалиплатином по отдельности, или обрабатывали оксалиплатином в различных концентрациях (1,3, 2,5 и 5 мкМ) в комбинации с 2,5 мМ лактатом кальция. Затем сравнивали колониеобразующую способность клеток. В указанном случае в качестве контрольной группы использовали клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29), на которые не воздействовали никакими лекарственными средствами (фиг. 55).

На фиг. 55a приведен результат сравнения уменьшения числа колоний при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ оксалиплатином, по отдельности или в комбинации. На фиг. 55b приведен результат сравнения подавления образования индивидуальной колонии при воздействии на клетки линии рака толстой и прямой кишки человека (HT-29) 2,5 мМ лактатом кальция и 1,3, 2,5 и 5 мкМ оксалиплатином, по отдельности или в комбинации. Как видно на фиг. 55a и 55b, было подтверждено, что по сравнению с контрольной группой наблюдается подавление колониеобразующей способности раковых клеток в группе, на которую воздействовали отдельно лактатом кальция, и в группах, на которые воздействовали в низких концентрациях (1,3, 2,5 и 5 мкМ) отдельно оксалиплатин; в группах, на которые воздействовали оксалиплатином и лактатом кальция в комбинации, происходит дополнительное подавление колониеобразующей способности по сравнению с группами, на которые воздействовали отдельно оксалиплатином. Анализ указанных результатов дает основания полагать, что при лечении лактатом кальция в комбинации с хорошо известным противораковым лекарственным средством эффективность противоракового лечения может повышаться даже при применении меньшего количества указанного противоракового лекарственного средства.

Соответственно при воздействии на раковую клетку лактатной солью металла в комбинации с хорошо известным противораковым лекарственным средством может быть продемонстрирована повышенная противораковая активность, при том, что противораковая активность может наблюдаться и при воздействии на раковую клетку отдельно лактатной солью металла. Кроме того, по результату для трастузумаба можно видеть, что чувствительность раковой клетки к хорошо известному противораковому лекарственному средству может дополнительно повышаться.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения ракового заболевания у нуждающегося в этом субъекта, содержащая эффективное количество лактата кальция в качестве активного ингредиента.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головного мозга, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, лимфомы, рака матки, рака шейки матки, рака почки и меланомы.

3. Фармацевтическая композиция для подавления метастазов рака у нуждающегося в этом субъекта, содержащая эффективное количество лактата кальция в качестве активного ингредиента.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, отличающаяся тем, что лактат кальция представлен в количестве, эффективном для подавления возникновения одного или более метастатических раковых заболеваний, выбранных из группы, состоящей из метастатического рака легкого, рака молочной железы, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головного мозга, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, лимфомы, рака матки, рака шейки матки, рака почки и меланомы.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, дополнительно включающая одно или более противораковых лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из иматиниба, 5-FU (5-фторурацила), иринотекана, сунитиниба, оксалиплатина, паклитаксела, лапатиниба, трастузумаба (герцептина), gefинитиба, эрлотиниба, метотрексата, карбоплатина, доцетаксела, эверолимуса, сорафениба, 5-индансульфонамида и коричной кислоты.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанная композиция пригодна для подкожного, внутривенного или внутритрипухолевого введения.

7. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1, 2 и 5, 6 для лечения ракового за-

болевания у нуждающегося в этом субъекта.

8. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.3, 4 и 6 для подавления метастазов рака у нуждающегося в этом субъекта.

9. Применение по п.7 или 8 в комбинации с лучевой терапией или с известным противораковым лекарственным средством у нуждающегося в этом субъекта.

10. Применение по п.9, отличающееся тем, что лучевой терапии подвергают онкологического пациента, используя дозу радиации от 2 до 10 Гр в сутки, и лечение проводят в комбинации с указанной фармацевтической композицией.

11. Применение по любому из пп.7-10, отличающееся тем, что противораковое лекарственное средство включает одно или более противораковых лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из иматиниба, 5-FU (5-фторурацила), иринотекана, сунитиниба, оксалиплатина, паклитаксела, лапатиниба, трастузумаба (герцептина), гефинитиба, эрлотиниба, метотрексата, карбоплатина, доцетаксела, эверолимуса, сорафениба, 5-индансульфонамида и коричной кислоты.

12. Применение по любому из пп.7-11, отличающееся тем, что указанную композицию вводят подкожно, внутривенно или внутрь опухоли.

13. Способ лечения ракового заболевания или подавления метастазирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции в виде однократной дозы, при этом содержание лактата кальция в указанной композиции составляет от 2,5 до 25 мМ, и при этом указанную композицию вводят подкожно, внутривенно или внутрь опухоли.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головного мозга, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, лимфомы, рака матки, рака шейки матки, рака почки и меланомы.

15. Способ по п.13, отличающийся тем, что лактат кальция вводят в виде единичной дозы фармацевтической композиции, содержащей лактат кальция в концентрации от 2,5 до 25 мМ.

16. Способ по п.13, отличающийся тем, что лактат кальция вводят в качестве единственного активного ингредиента.

17. Способ по п.13, дополнительно включающий лечение субъекта лучевой терапией.

18. Способ по п.13, отличающийся тем, что лучевой терапии подвергают онкологического пациента, используя дозу радиации от 2 до 10 Гр в сутки.

19. Способ по п.13, дополнительно включающий введение субъекту одного или нескольких дополнительных противораковых лекарственных средств.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что одно или более дополнительных противораковых лекарственных средств выбирают из иматиниба, 5-FU (5-фторурацила), иринотекана, сунитиниба, оксалиплатина, паклитаксела, лапатиниба, трастузумаба (герцептина), гефитиниба, эрлотиниба, метотрексата, карбоплатина, доцетаксела, эверолимуса, сорафениба, 5-индансульфонамида и коричной кислоты.

21. Способ по п.19, дополнительно включающий введение субъекту иматиниба, 5-FU (5-фторурацила), иринотекана, сунитиниба, оксалиплатина, паклитаксела, лапатиниба, трастузумаба (герцептина), гефитиниба, эрлотиниба, метотрексата, карбоплатина, доцетаксела, эверолимуса, сорафениба, 5-индансульфонамида, коричной кислоты или их комбинации.

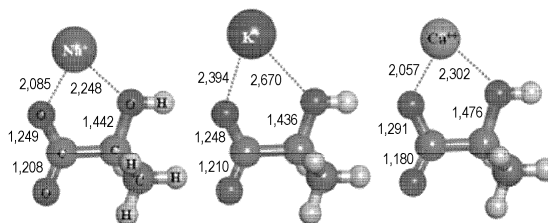
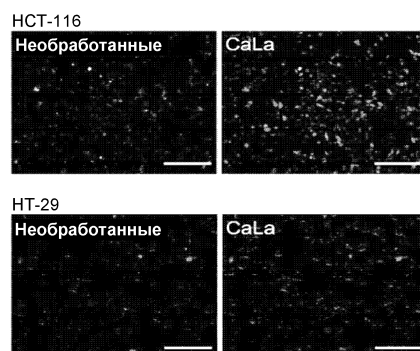


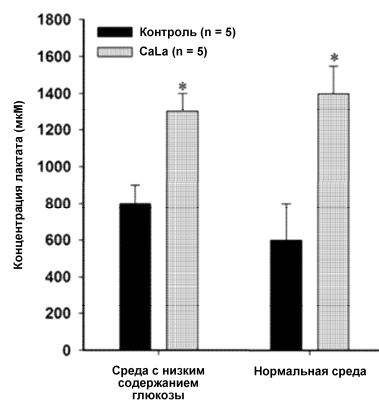
Таблица 1. Свободная энергия связывания лактатных комплексов металлов

	Металл (Хартри)	Лактат (Хартри)	Энергия связывания (ΔE, ккал/моль)	TΔS (ккал/моль)	ΔG (ккал/моль)
Na ⁺ -Лактат	-161,664286	-341,163438	-126,21	-8,03	-118,18
K ⁺ -Лактат	-599,001916	-341,163438	-106,85	-7,06	-99,79
Ca ²⁺ -Лактат	-676,13655	-341,163438	-290,86	-8,20	-282,66

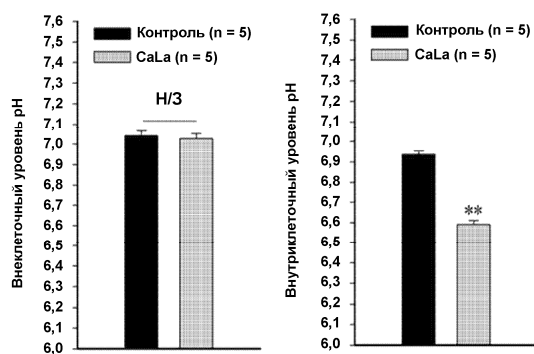
Фиг. 1



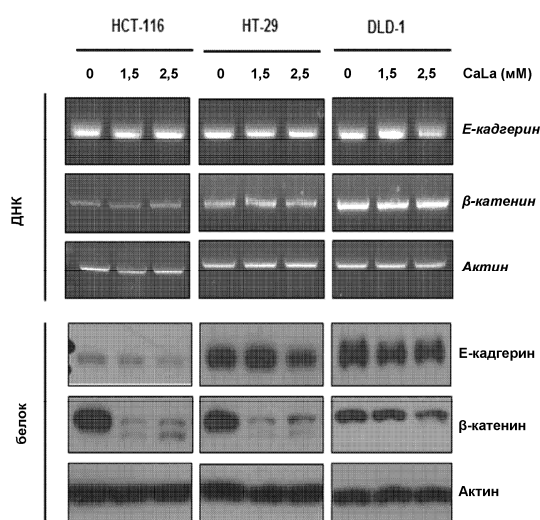
Фиг. 2



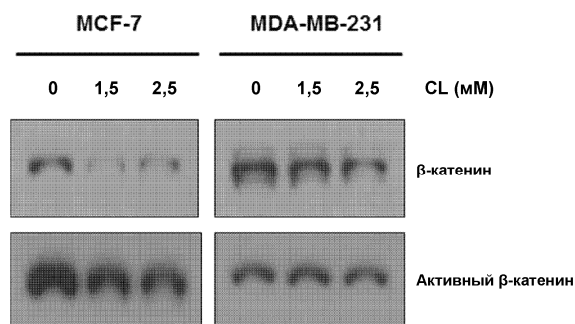
Фиг. 3



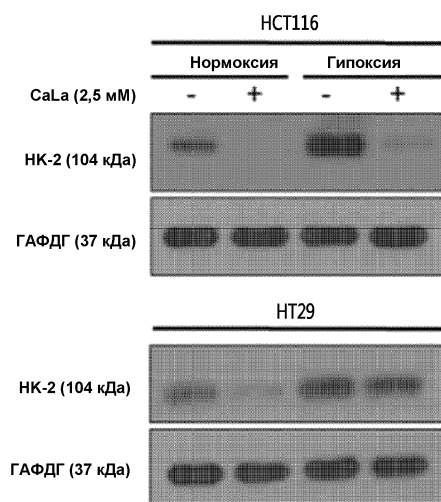
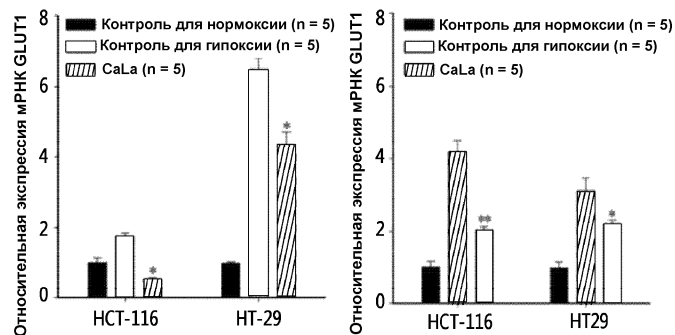
Фиг. 4



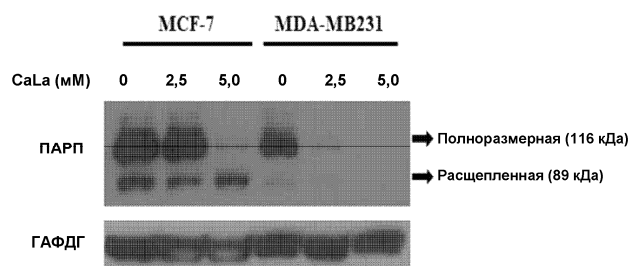
Фиг. 5



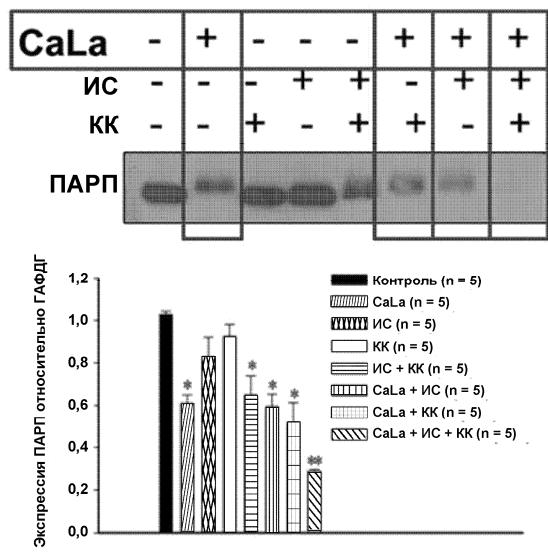
Фиг. 6



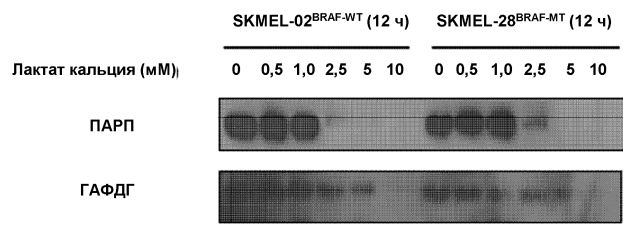
Фиг. 7



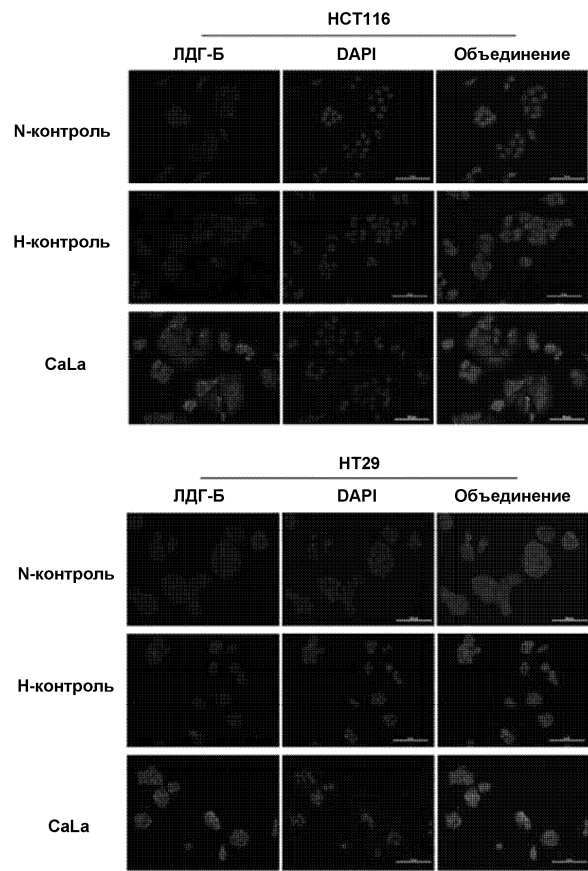
Фиг. 8



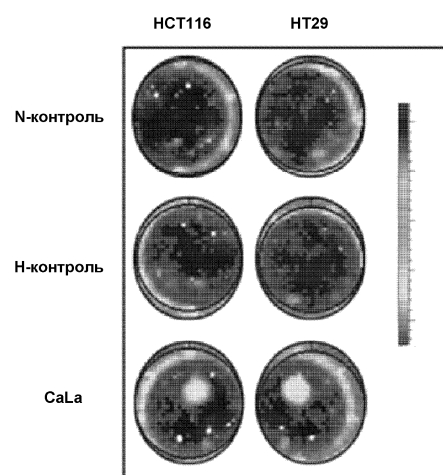
Фиг. 9



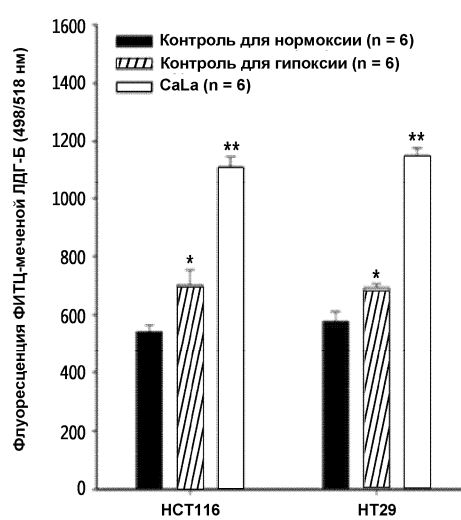
Фиг. 10



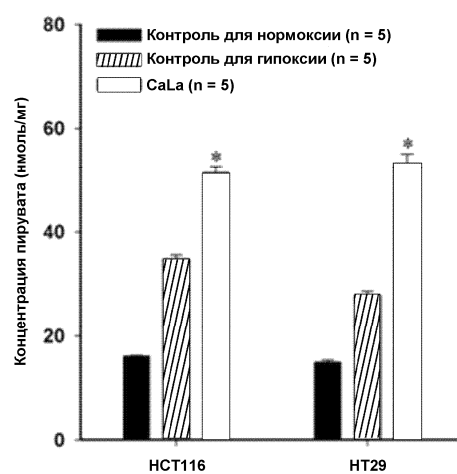
Фиг. 11a



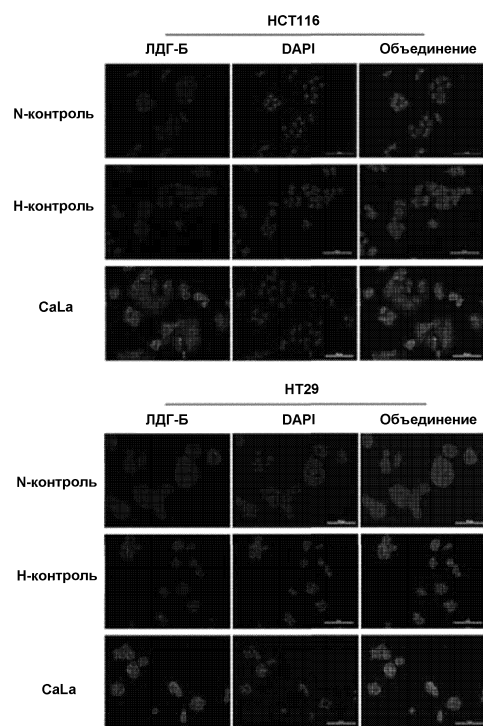
Фиг. 11b



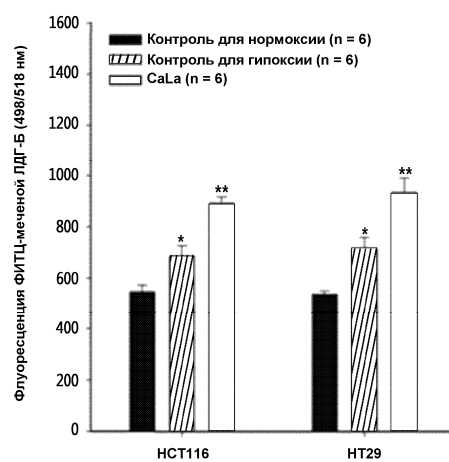
Фиг. 11с



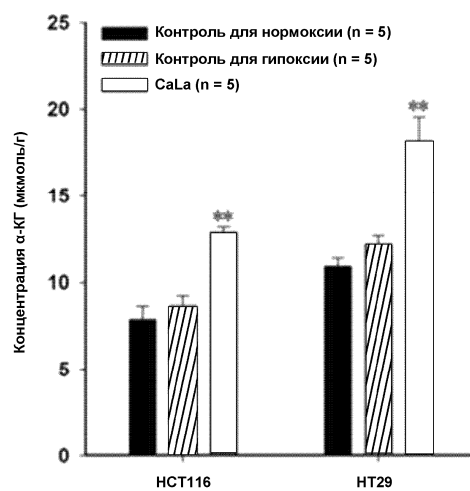
Фиг. 12



Фиг. 13а

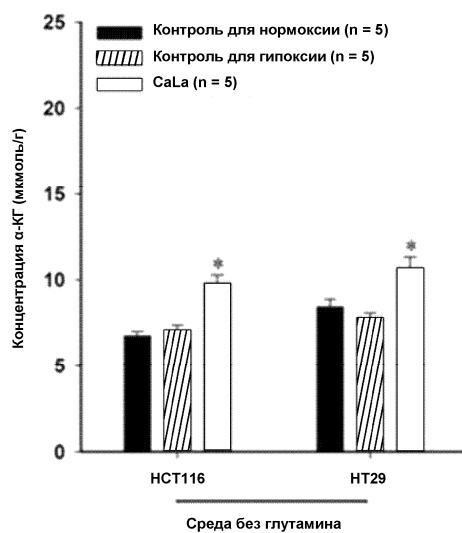


Фиг. 13б

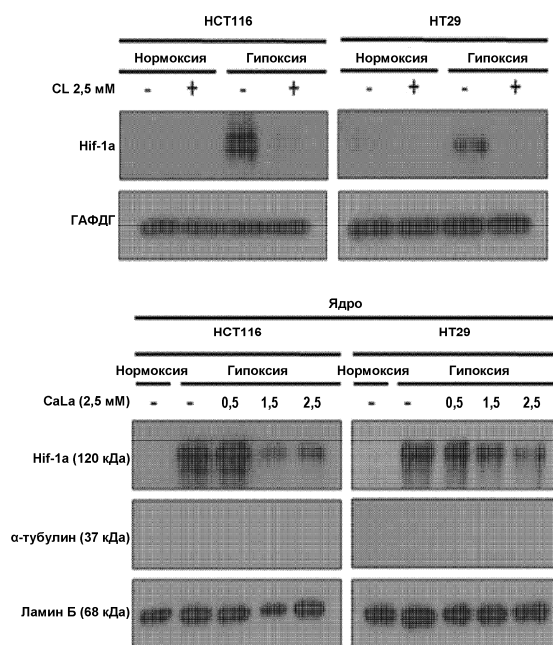


Нормальная среда

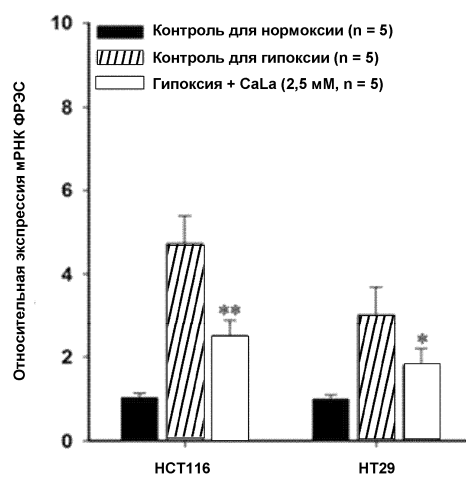
Фиг. 14а



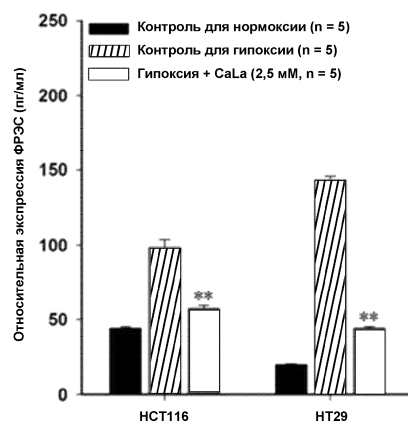
Фиг. 14b



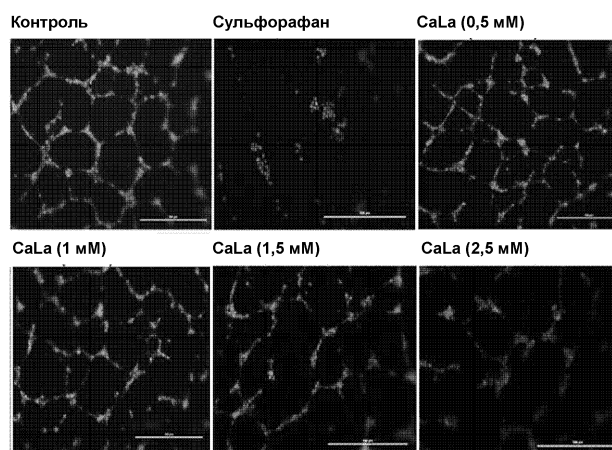
Фиг. 15



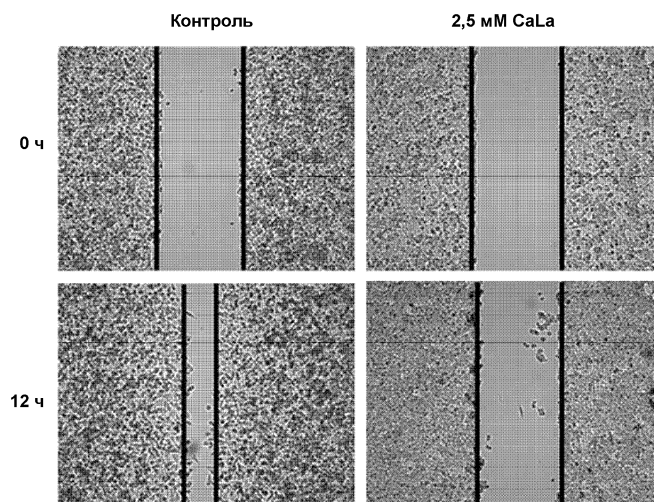
Фиг. 16a



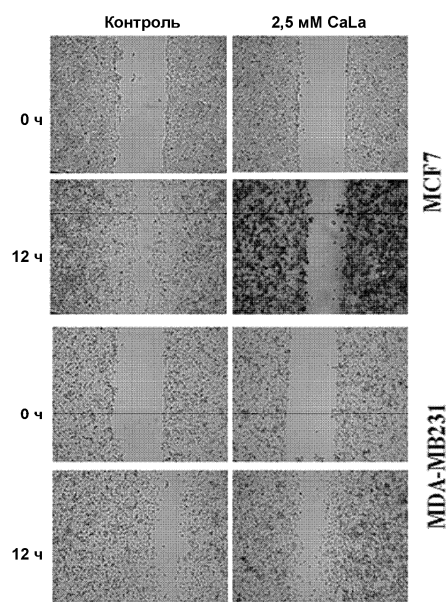
Фиг. 16b



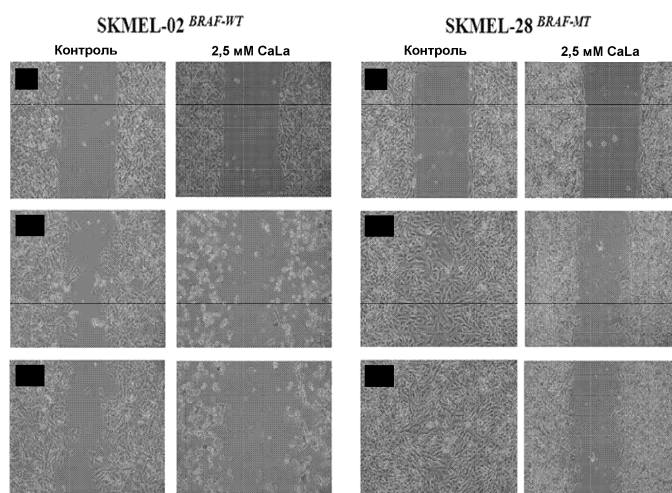
Фиг. 17



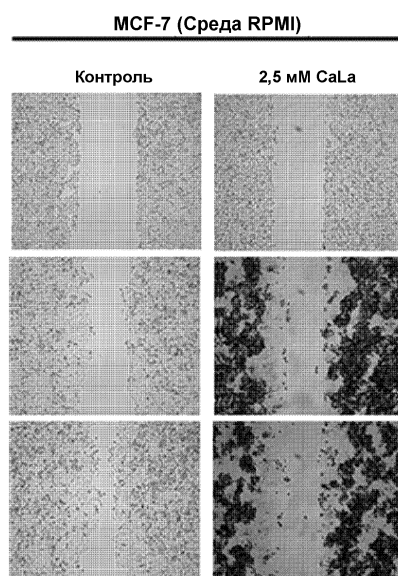
Фиг. 18



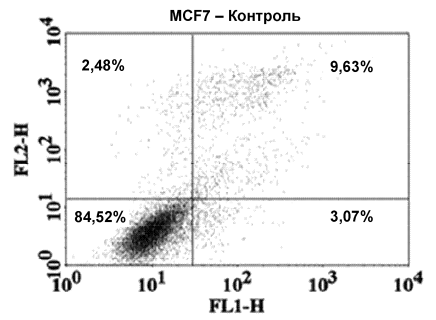
Фиг. 19



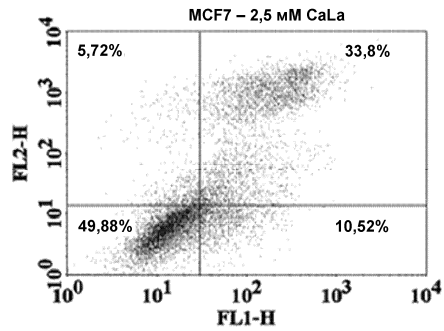
Фиг. 20



Фиг. 21a

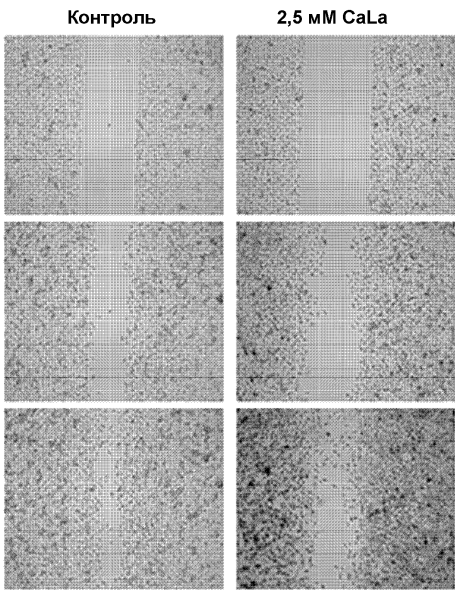


Фиг. 21b

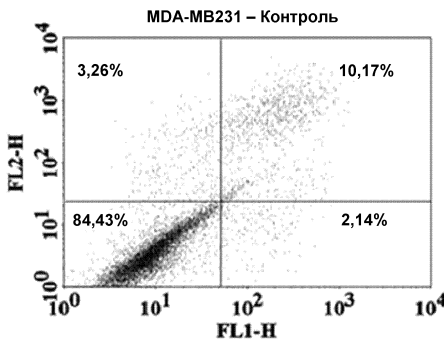


Фиг. 21с

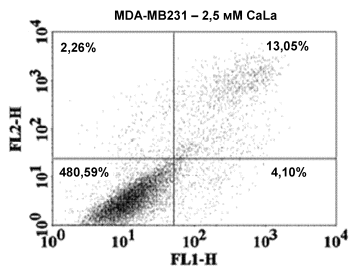
MDA-MB231 (Среда RPMI)



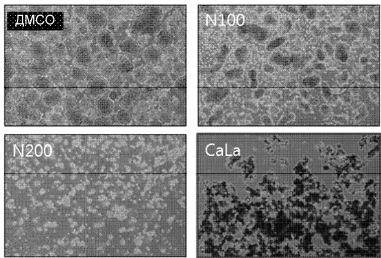
Фиг. 21d



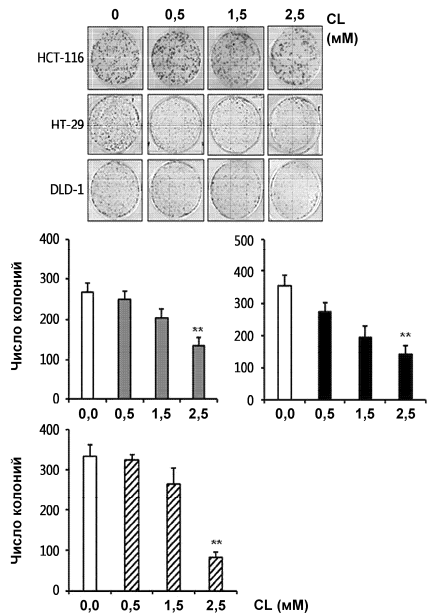
Фиг. 21е



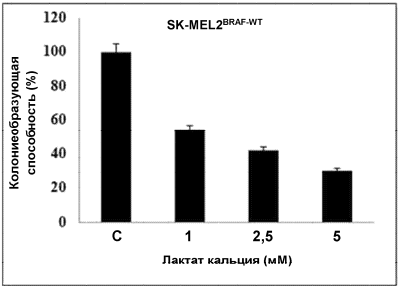
Фиг. 21f



Фиг. 22

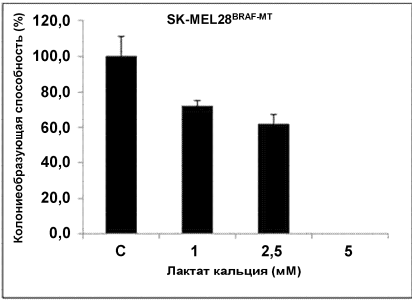


Фиг. 23



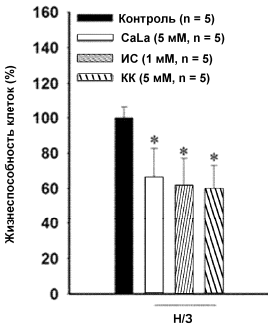
SK-MEL2 ^{BRAF-WT}	Среднее значение	% гибели	SD
Контроль	167	100	18,52
CaLa 1 мМ	90,7	53,8922	20,11
CaLa 2,5 мМ	69,7	41,3174	8,5
CaLa 5 мМ	49,7	29,3413	11,72

Фиг. 24а

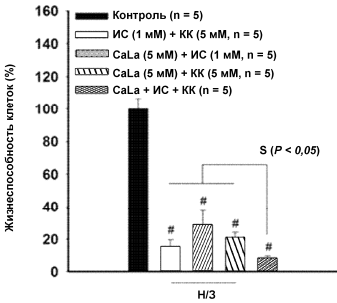


SK-MEL28 ^{BRAF-MT}	Среднее значение	% гибели	SD
Контроль	105,3	100,3	10,97
CaLa 1 мМ	75,7	72,1	3,51
CaLa 2,5 мМ	65,3	62,2	5,51
CaLa 5 мМ	0,0	0,0	0,0

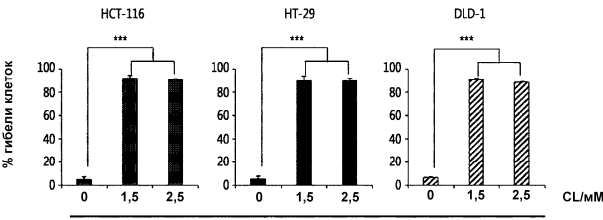
Фиг. 24b



Фиг. 25a



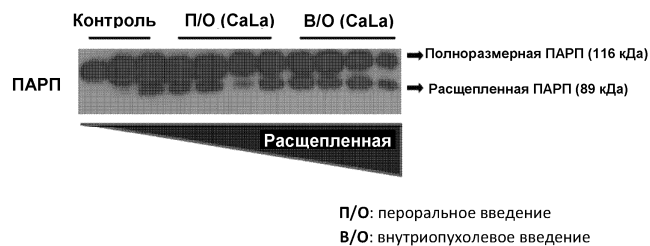
Фиг. 25b



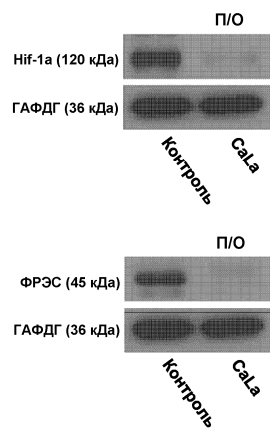
Фиг. 26



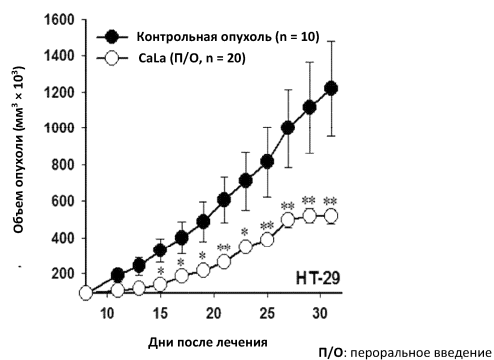
Фиг. 27



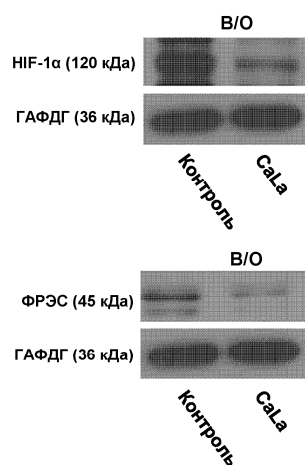
Фиг. 28



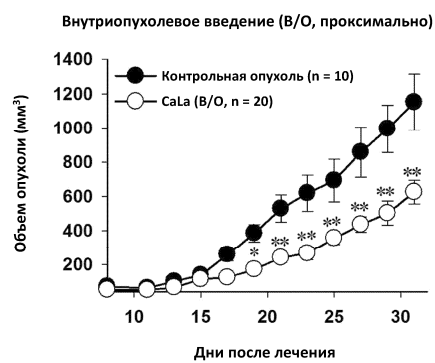
Фиг. 29



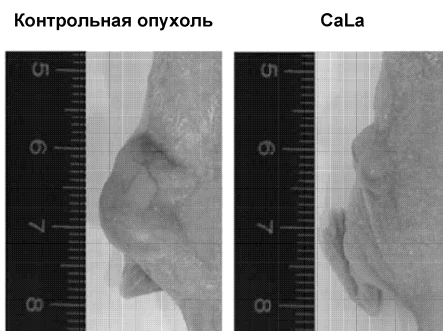
Фиг. 30



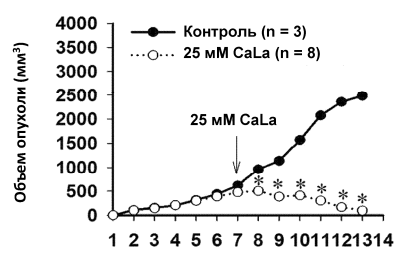
Фиг. 31



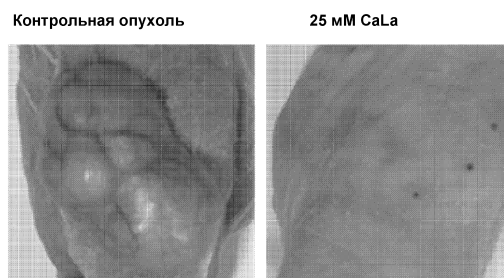
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34

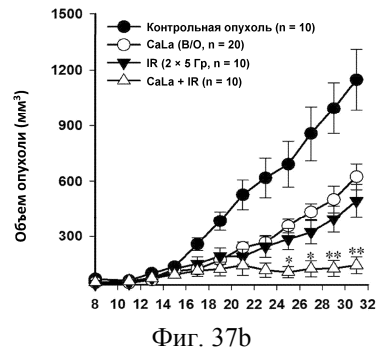
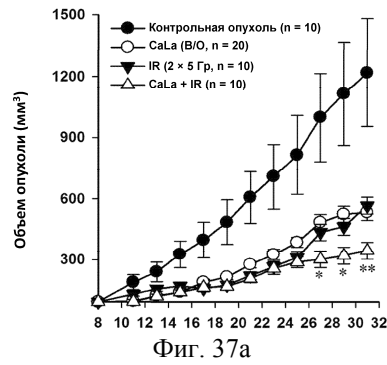


Фиг. 35

Разделенная доза облучения (2 Гр × 5, всего 10 Гр)

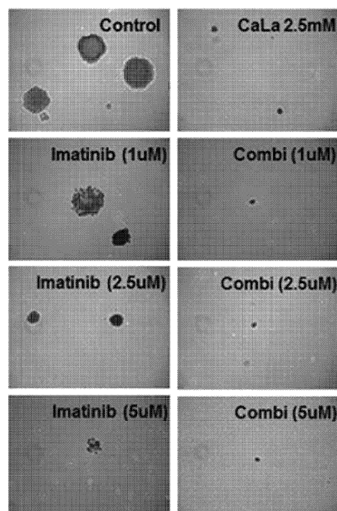
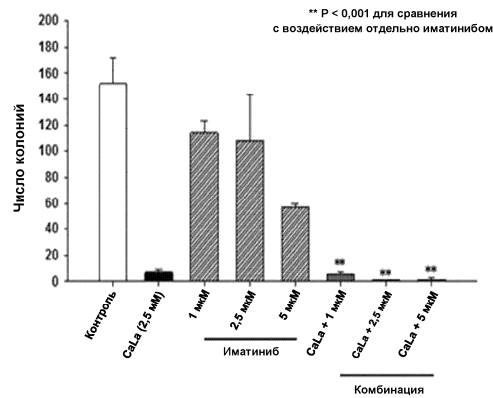


Фиг. 36

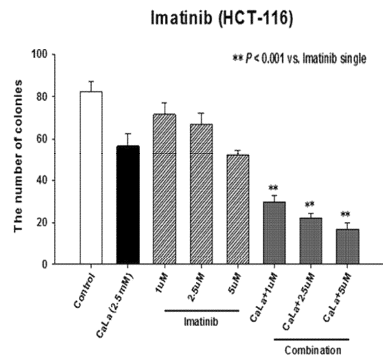


• Стромальные опухоли ЖКТ

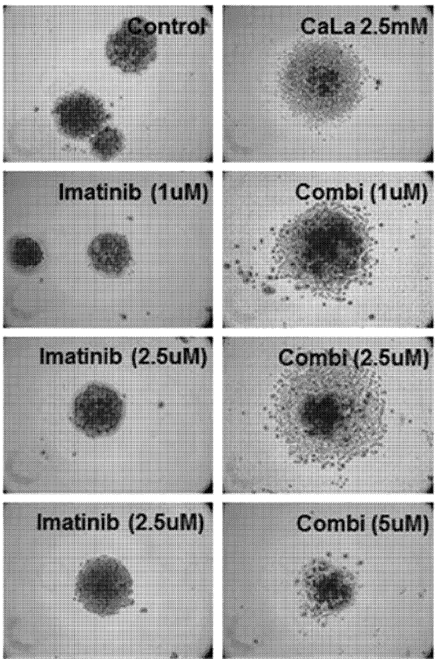
Иматиниб (НТ-29)



• Gastrointestinal stromal tumors

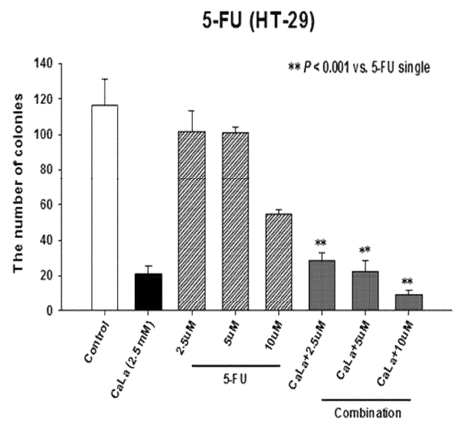


Фиг. 39а

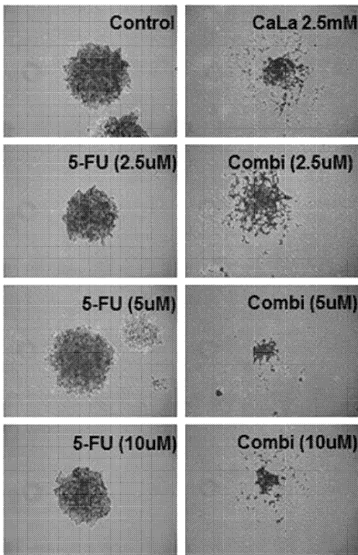


Фиг. 39б

• Colorectal and oesophageal cancers

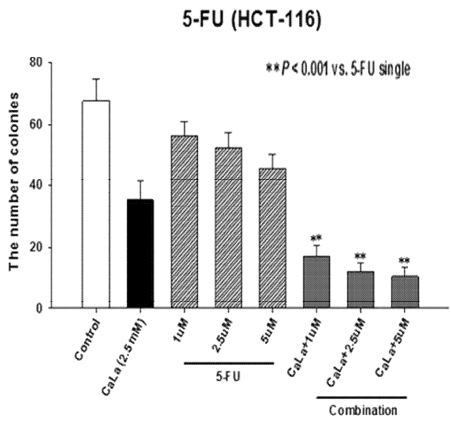


Фиг. 40а

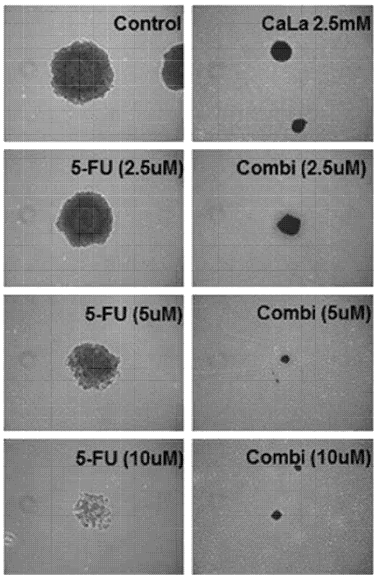


Фиг. 40b

• Colorectal and oesophageal cancers

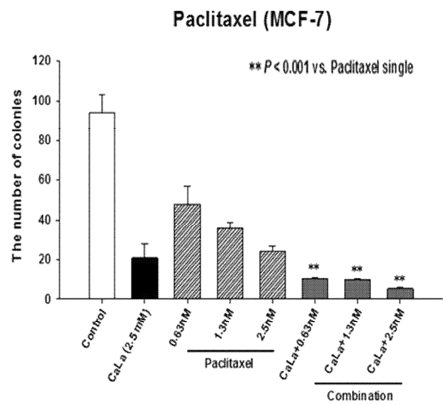


Фиг. 41a

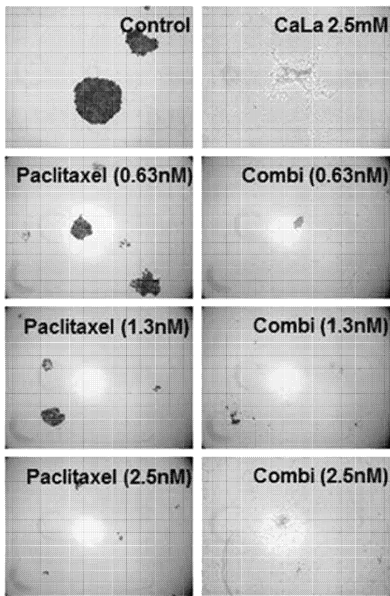


Фиг. 41b

* Ovarian cancer, Breast cancer, Lung cancer cancer

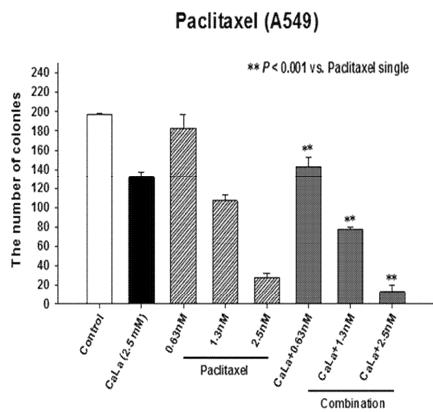


Фиг. 42а

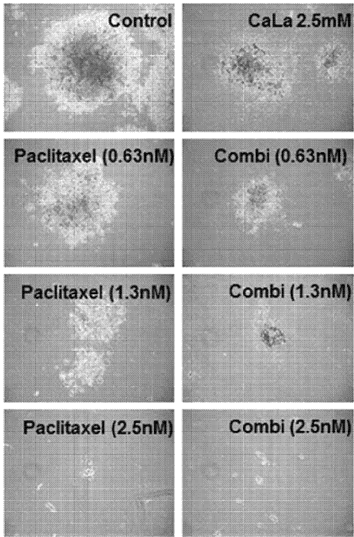


Фиг. 42b

* Ovarian cancer, Breast cancer, Lung cancer cancer

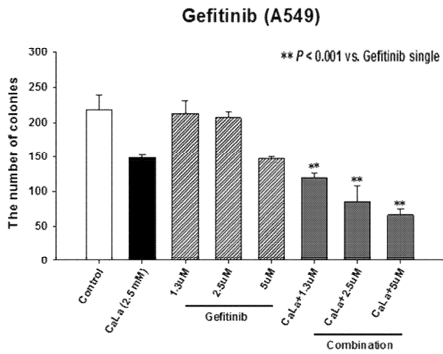


Фиг. 43а

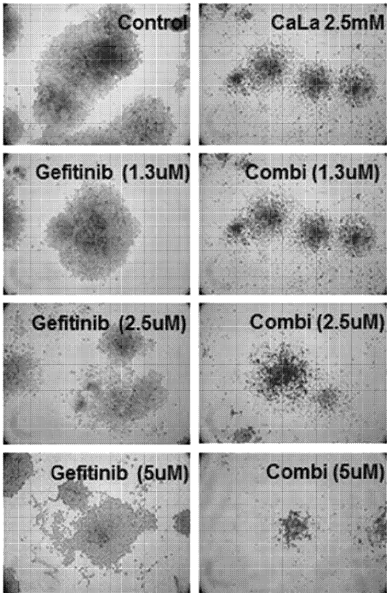


Фиг. 43b

• Non-small-cell lung carcinoma

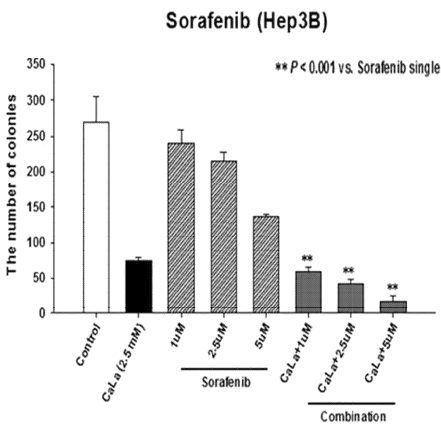


Фиг. 44a

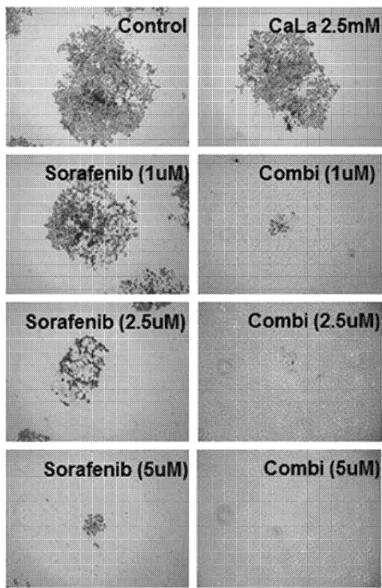


Фиг. 44b

• Renal cell carcinoma, Hepatocellular carcinoma, Thyroid cancer.

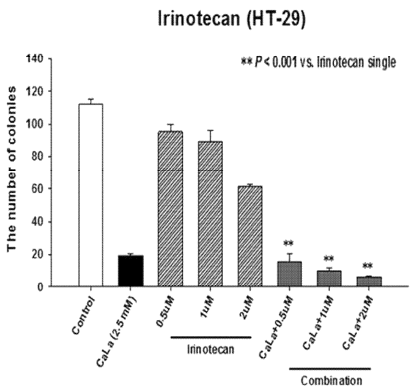


Фиг. 45а

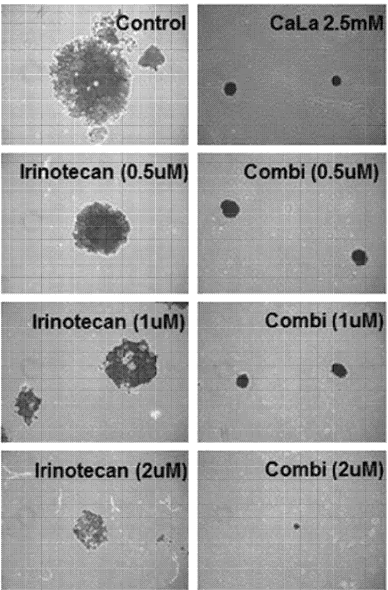


Фиг. 45b

• Colorectal cancer

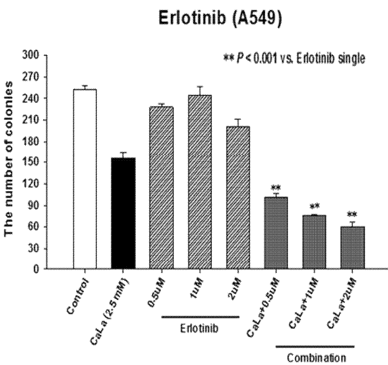


Фиг. 46а

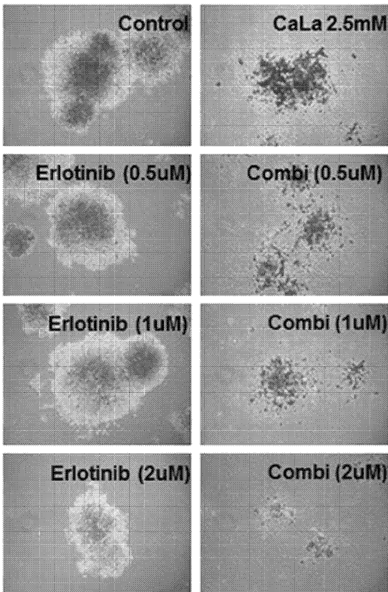


Фиг. 46b

• Non-small cell lung cancer

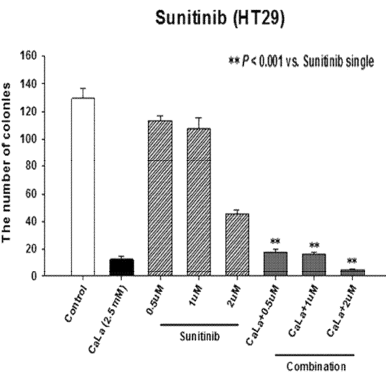


Фиг. 47a

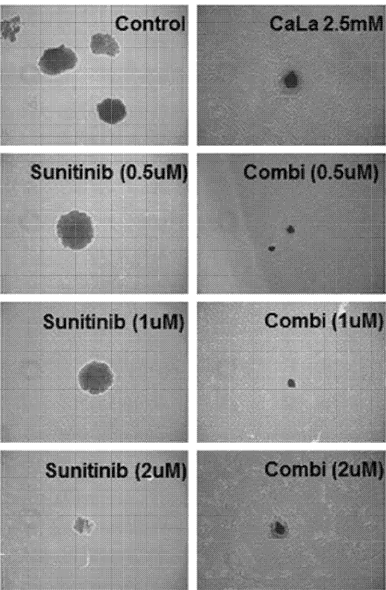


Фиг. 47b

• Renal cell carcinoma, gastrointestinal stromal tumor

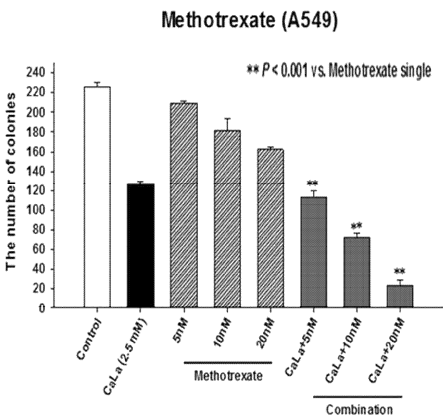


Фиг. 48а

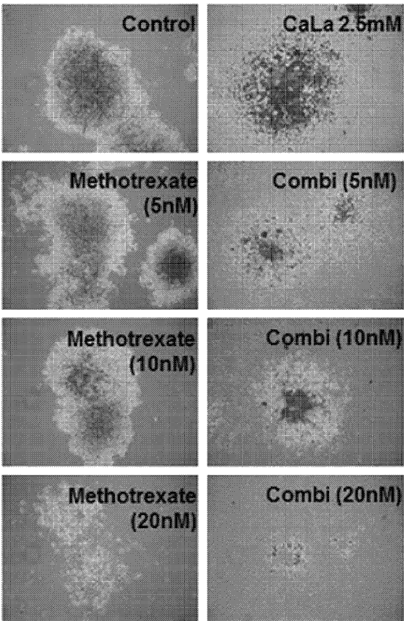


Фиг. 48b

• Breast, lung cancer

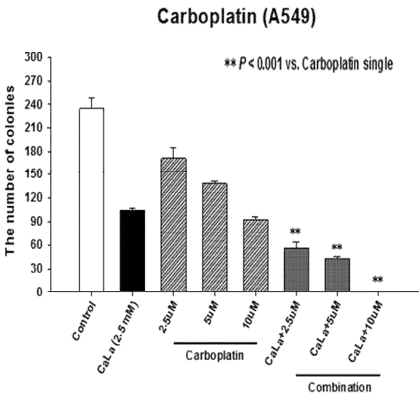


Фиг. 49а

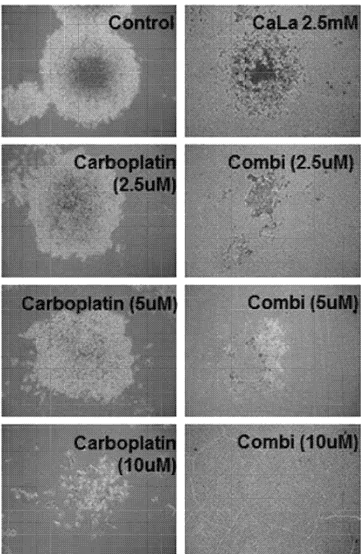


Фиг. 49b

• Ovarian carcinoma, lung, head and neck cancers

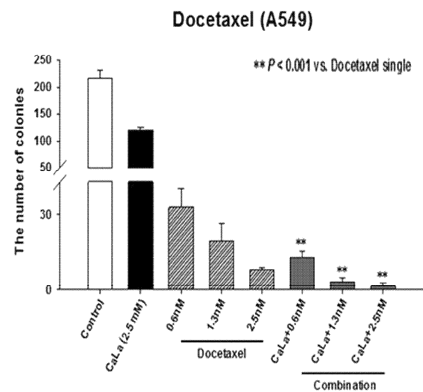


Фиг. 50a

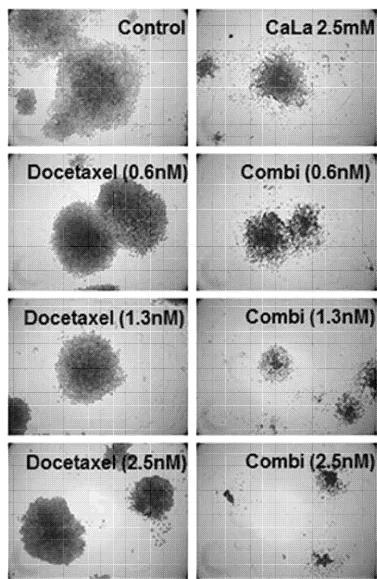


Фиг. 50b

• Breast, lung, and ovarian cancer

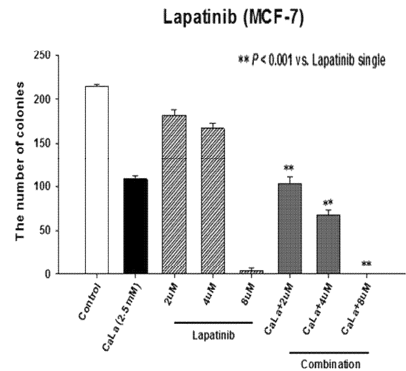


Фиг. 51a

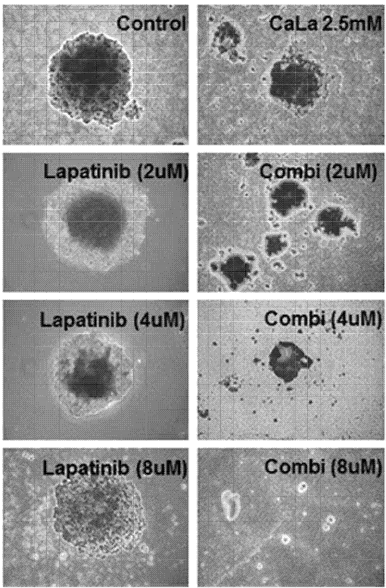


Фиг. 51b

• Breast cancer

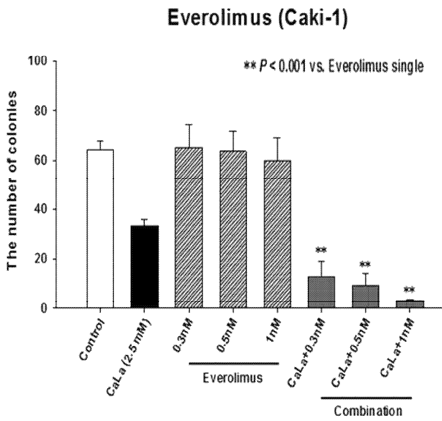


Фиг. 52a

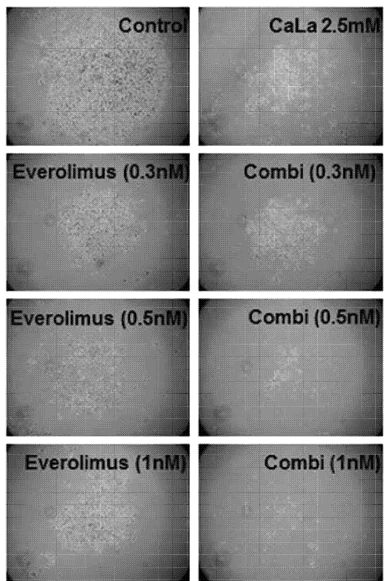


Фиг. 52b

• Renal cell cancer

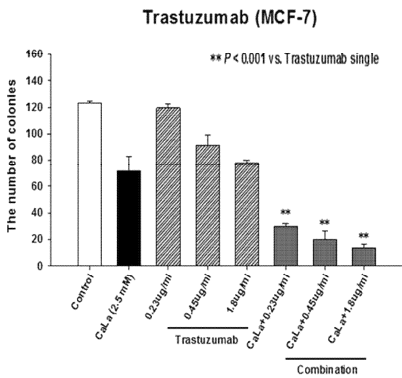


Фиг. 53a

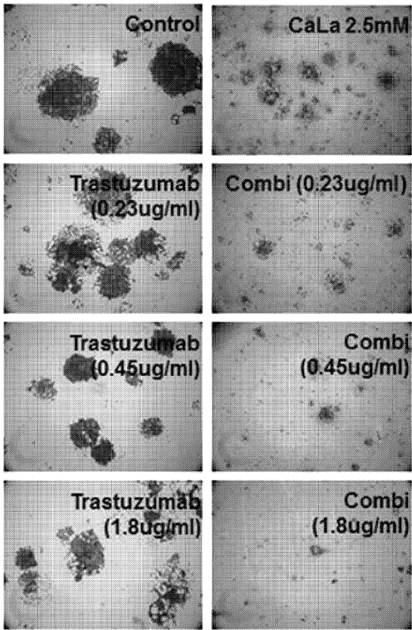


Фиг. 53b

• Breast cancer
1% FBS state, + EGF 500ng/ul

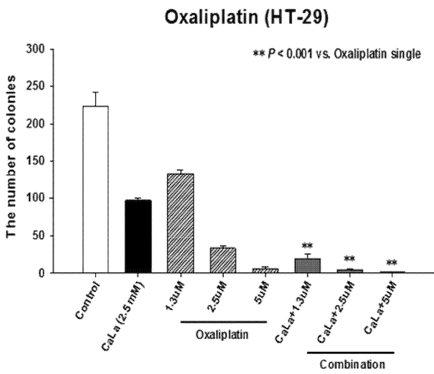


Фиг. 54а

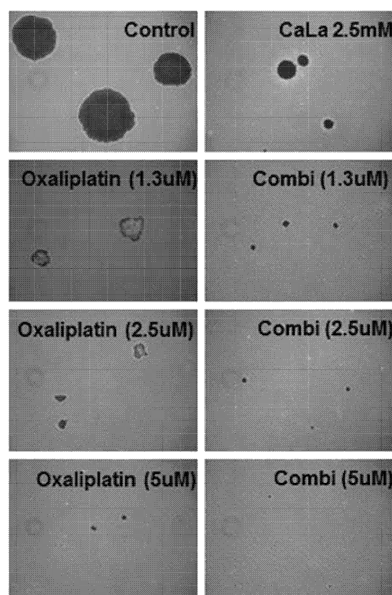


Фиг. 54b

• Colorectal cancer



Фиг. 55а



Фиг. 55b

