

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ОРМУСТИНА НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛЕЙКОЗАХ МЫШЕЙ

Н.С. Сапрыкина<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, З.С. Смирнова<sup>1</sup>, В.П. Краснов<sup>2</sup>, Г.Л. Левит<sup>2</sup>,  
В.В. Мусияк<sup>2</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>, В.М. Бухман<sup>1</sup>, З.С. Шпрах<sup>1</sup>, М.М. Давыдов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» УрО РАН;  
Россия, 620990, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22

**Контакты:** Сапрыкина Нина Семеновна Saprikina.nin@yandex.ru

**Цель исследования** — изучить *in vivo* противоопухолевую активность лекарственной формы нового препарата из класса нитроалкилмочевин «Ормустина» (алкилнитрозокарбамоил производного аминокислоты L-орнитин) на мышах с перевиваемыми лимфолейкозами.

**Материалы и методы.** Оценку потенциальной противоопухолевой активности ормустина проводили на мышах B6D2F1 с асцитными (L1210, L1210 / араноза, L1210 / нитруллин и P388) и солидными (P388) формами лимфолейкозов. В работе были использованы препараты из группы производных нитроалкилмочевины: ормустин, араноза и лизомустин. Лечение животных начинали через 24 ч после прививки лейкозов внутрибрюшинно и через 48 ч после прививки P388 подкожно. Препараты в широком диапазоне доз вводили мышам однократно внутривенно. Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили увеличение продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными и их излечение.

**Результаты** Исследована противоопухолевая активность нового препарата класса нитроалкилмочевин «Ормустин». Влияние ормустина изучено *in vivo* на рост перевиваемых штаммов лимфолейкозов мышей: L1210 (асцитный вариант) и P388 (асцитный и солидный варианты). Препарат эффективно ингибировал рост экспериментальных лейкозов, вызывая излечение значительной части мышей с лимфолейкозами. На L1210 и P388 установлена терапевтическая доза ормустина (125 мг / кг) при однократном внутривенном его введении.

**Выводы.** Выявленная активность характеризует ормустин как потенциальный противоопухолевый препарат.

**Ключевые слова:** ормустин, нитроалкилмочевины, противоопухолевые препараты, перевиваемые лимфолейкозы мышей

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-24-31

### ANTITUMOR ACTIVITY OF ORMUSTINE AGAINST TRANSPLANTED LEUKEMIA IN MICE

N.S. Saprykina<sup>1</sup>, L.M. Borisova<sup>1</sup>, M.P. Kiseleva<sup>1</sup>, Z.S. Smirnova<sup>1</sup>, V.P. Krasnov<sup>2</sup>, G.L. Levit<sup>2</sup>,  
V.V. Musiyak<sup>2</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1</sup>, V.M. Bukhman<sup>1</sup>, Z.S. Shprakh<sup>1</sup>, M.M. Davydov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences;  
22 S. Kovalevskaya St., Ekaterinburg, 620041, Russia

**Objective:** Evaluation of antitumor activity of a novel alkyl nitrosourea derivative Ormustine (an alkyl nitrosocarbamoyl L-ornithine) in mouse lymphoid leukemia models.

**Materials and methods.** Antitumor activity of Ormustine has been evaluated in B6D2F1 mice with ascites form of leukemia (L1210, L1210/arenosa, L1210/citrullin and P388) and the solid (P388) form. In this study we used preparations from the alkyl nitrosourea group: Ormustine, Aranoza and Lizomustine. Treatment of animals was started 24 hours after inoculation of leukemia intraperitoneally, and 48 hours after inoculation subcutaneous P388.

Drugs in a wide range of doses were administrated once intravenously. The follow up period of the animals continued until their death. Criteria of antitumor effect were increasing life expectancy and cure. Evaluation criteria of antitumor effect was the increase in life of experimental mice compared to control ones.

**Results.** Antitumor activity of a novel alkyl nitrosourea derivative, Ormustine has been studied *in vivo* on the growth of transplanted lymphoid leukemia, such as L1210 (ascites version) and P388 (ascites and solid tumor). Effective dose of single intravenous injection Ormustine against lymphoid leukemia L1210 and P388 was 125 mg/kg.

The drug effectively inhibited growth of experimental leukemia. The significant part of the mice with limfoleukemia has been cured. We have also established the single intravenous therapeutic dose of Ormustine on L1210 and P388 leukemia — 125 mg/kg of body weight.

**Conclusion.** The data obtained characterizes Ormustine as a promising anticancer drug.

**Key words:** Ormustine, alkyl nitrosourea, antitumor drugs, transplanted murine leukemia

### Введение

Производные нитроалкилмочевины (НАМ) — одна из наиболее высокоэффективных групп противоопухолевых препаратов, однако низкая избирательность и высокая отсроченная и кумулятивная токсичность значительно лимитируют их эффективность. Поэтому столь актуально введение в арсенал противоопухолевых средств новых производных НАМ, менее токсичных и действующих более избирательно [1, 2]. Поиск новых противоопухолевых препаратов из класса НАМ перспективен, так как для этих соединений характерны широкий спектр противоопухолевой активности, различия в молекулярных механизмах действия у близких по структуре соединений и отсутствие полной перекрестной устойчивости с алкилирующими соединениями [3, 4].

Известно, что при развитии опухолевого процесса увеличивается содержание аминокислот в опухоли и возрастает скорость их проникновения через клеточные мембраны [1, 5]. Данный факт позволил обосновать рациональность использования остатков аминокислот и олигопептидов в качестве молекул-носителей цитотоксических фрагментов для создания соединений с высокой избирательностью действия [1].

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН разработаны оригинальные методы синтеза большой группы алкилнитрозокарбамоил-производных аминокислот, в которых цитотоксическая N-алкил-N-нитрозомочевинная группировка находится в боковой цепи аминокислоты,

а  $\alpha$ -амино- и карбоксильная группы, определяющие основные биохимические свойства аминокислот и являющиеся важными для активного транспорта через клеточные мембраны, сохранены [1, 6, 7]. При разложении таких соединений *in vivo* возможно образование не только характерных для биологического действия НАМ алкилирующих и карбамоилирующих частиц, но и производных  $\alpha$ -аминокислот — потенциальных антиметаболитов, за счет чего можно ожидать расширения спектра их противоопухолевой активности по сравнению с известными НАМ [1]. Указанная группа соединений имеет большой потенциал для создания высокоэффективных противоопухолевых агентов, так как у многих синтезированных веществ выявлено наличие более высокой специфической активности по сравнению с применяемыми в клинике препаратами группы нитрозомочевин. На основе 2-хлорэтилнитрозоуреидопроизводного аминокислоты L-лизина был создан отечественный противоопухолевый препарат «Лизомустин» (рис. 1), который разрешен к медицинскому применению для лечения злокачественной меланомы и мелкоклеточного рака легкого, хорошо переносится, обладает антиметастатическим действием [3, 8–10]. Не менее перспективен в плане создания нового противоопухолевого средства его близкий аналог, получивший название «Ормустин» (рис. 1) [10].

Ормустин представляет собой смесь изомеров положения нитрозогруппы: N<sup>δ</sup>-нитрозо-N<sup>δ</sup>-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 1) и N<sup>δ</sup>-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 2).

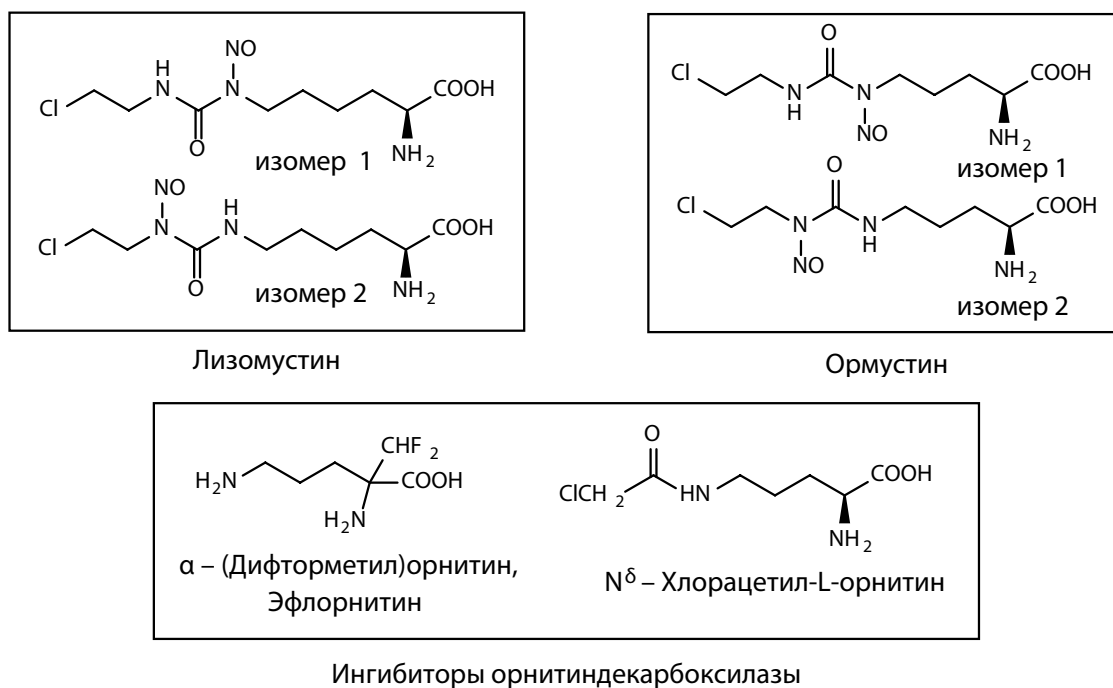


Рис. 1. Структура лизомустина, ормустина и ингибиторов орнитиндекарбоксилазы

нитрозо-N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 2). При развитии опухоли усиливается метаболизм полиаминов, а непротеиногенная аминокислота орнитин является основным источником синтеза полиаминов [11–14]. Следовательно, можно предположить, что использование L-орнитина в качестве молекулы-носителя может не только повысить избирательность доставки цитотоксической группировки в опухолевые клетки, но и воздействовать на их метаболизм [11, 15, 16], тем более что производное орнитина  $\alpha$ -(дифторметил)орнитин (DFMO, эфлорнитин) вошло в клиническую практику как противопаразитарное средство против *Trypanosoma brucei gambiense* (West African Sleeping Sickness) [17]. Но первоначально DFMO рассматривался как потенциальное противоопухолевое средство, так как он необратимо ингибирует орнитиндекарбоксилазу (высоко активный в опухолевых клетках ключевой фермент синтеза полиаминов) [17]. Было установлено, что DFMO оказывает антипролиферативное действие на некоторые опухоли человека, имеет проапоптотические, антиинвазивные и антиметастатические свойства [16, 18]. Как правило, DFMO обладает обратимым цитостатическим действием. При монотерапии его противоопухолевые эффекты незначительны, и на II фазе клинических испытаний он был признан недостаточно активным [19]. Несмотря на это, исследования DFMO в онкологии продолжаются, так как у него выявлен значительный потенциал для химиопрофилактики опухолевых заболеваний, основанный на его способности в малых дозах, которые нетоксичны при длительном использовании, понижать уровни полиаминов в слизистой оболочке толстого кишечника [17, 19].

Недавно М.М. Medina-Enríquez и соавт. показали, что другой ингибитор орнитиндекарбоксилазы N<sup>δ</sup>-хлорацетил-L-орнитин (рис. 1) селективно тормозит рост клеток опухолей человека по сравнению с нормальными клетками и вызывает их гибель [20]. Кроме того, возможно, производные L-орнитина будут эффективны в существенно меньших дозах, так как данные ряда исследований указывают на то, что ингибирование синтеза полиаминов сопровождается повышением чувствительности клеток к действию нитрозомочевин BCNU (1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина), ACNU (1-(4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил-3-(2-хлорэтил)-3-нитрозомочевина) и CCNU (1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина) [15, 21–23].

Ранее была выявлена высокая противоопухолевая активность фармацевтической субстанции ормустина *in vitro* на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека *Mel Kor* и Т-лимфобластного лейкоза человека *Jurkat* и *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей LLC, В-16 и лимфолейкозе Р388 [24]. При сравнении на линии клеток меланомы человека *Mel Z*

цитотоксического действия различных лекарственных форм ормустина (синоним OR-2011) и разрешенных для клинического применения производных НАМ (араноза и лизомустин) было выявлено, что наиболее активным является ормустин [25].

Цель наших исследований состояла в оценке *in vivo* противоопухолевой активности лекарственной формы ормустина — «Ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» — на мышах с перевиваемыми лимфолейкозами.

#### Материалы и методы

В работе были использованы мыши-гибриды первого поколения (C57Bl/6 × DBA/2) F1 (B6D2F1) массой 18–25 г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Мыши содержались в экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на брикетированном корме, с постоянным доступом к воде и в помещении с дневным освещением и контролем температуры и влажности воздуха.

Все экспериментальные процедуры с мышами проводились в соответствии с принятыми в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России правилами работы с животными, которые соответствуют международным и российским нормам.

Штаммы опухолей лимфолейкоз L1210 и лимфолейкоз Р388 были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Штаммы сублиний лимфолейкоза L1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L1210/араноза) или нитруллину (новое название — «Лизомустин») (L1210/нитруллин) были получены Н.М. Перетолчиной в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ЭДиТО) ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и любезно предоставлены автором для проведения данного исследования. Субштаммы L1210/араноза и L1210/нитруллин описаны и охарактеризованы в ряде публикаций [3, 26–27]. Штаммы перевиваемых опухолей поддерживались *in vivo* на мышах линии D2. В опытах использовались 2–10-й пассажи.

Оценку потенциальной противоопухолевой активности ормустина проводили на мышах B6D2F1 с асцитными (L1210, L1210/араноза, L1210/нитруллин и Р388) и солидными (Р388) формами лимфолейкозов. Опухоли перевивали лабораторным животным по стандартным методикам [17]. Затем методом случайного выбора формировали контрольную (8–12 животных) и опытные группы (по 6–8 мышей).

В работе были использованы препараты из группы производных НАМ:

— «Ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» (лекарственная форма

создана в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [28]);

— «Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

— «Лизомустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,1 г» производства ООО «Компания «Деко»» (Москва).

Растворы препаратов в глюкозе (декстроза 5 % раствор для инфузий производства ООО «МОСФАРМ», Россия) готовили *ex tempore*.

Лечение мышей начинали через 24 ч после прививки лейкозов внутрибрюшинно и через 48 ч после прививки Р388 подкожно согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств» [17]. Препараты в широком диапазоне доз вводили мышам с лимфолейкозами однократно внутривенно (в вену хвоста по 0,1–0,35 мл раствора / мышь), т. е. в соответствии с режимом, который применяется в клинической практике для данной группы противоопухолевых соединений [2]. В ряде экспериментов параллельно определяли влияние растворителя на рост перевиваемых опухолей: всем мышам из этой группы в том же режиме (однократно внутривенно) вводили 5 % раствор глюкозы в объеме, равном максимальному объему (0,2–0,35 мл) раствора препарата, который был инъецирован животному, леченному максимальной для данного опыта дозой ормустина.

Критериями оценки количества асцитной жидкости и внутрибрюшинных опухолевых узлов при асцитной форме лимфолейкоза Р388 являлись:

— количество асцита: 1,0–1,5 мл+++; 0,5–1,0 мл++ и 0,1–0,5 мл+;

— масса опухолевых узлов: 1,5–2,5 г+++; 1,0–1,5 г++ и 0,5–1,0 г+.

Наблюдение за животными продолжали до их гибели.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных мышей в сравнении с контрольными и их излечение.

Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле

$$\text{УПЖ} = [(\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_x) / \text{СПЖ}_x] \times 100,$$

где  $\text{СПЖ}_x$  и  $\text{СПЖ}_0$  — средняя продолжительность жизни животных в днях в контрольной и опытной группах, соответственно. Минимальным критерием активности является УПЖ 50 % и более [29]. СПЖ и УПЖ рассчитывали только для животных, проживших менее 90 дней.

Излеченными считали мышей, которые прожили 90 дней после прививки им опухоли и у которых при вскрытии не выявлено признаков опухолевого процесса [29].

Критериями оценки противоопухолевого эффекта препарата также служили объем асцитной жидкости и масса внутрибрюшинных опухолевых узлов при асцитном варианте лимфолейкоза.

Токсичность препаратов оценивали по гибели мышей в опытной группе по сравнению с гибелью животных в контрольной группе и макроскопической картине внутренних органов, а также по снижению массы тела более чем на 20 %.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel, Statistica v. 6.0; использовали t- и непараметрический критерий Колмогорова — Смирнова. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Анализ прогностической значимости используемых для скрининга моделей показал, что, несмотря на ряд ограничений, перевиваемые лимфолейкозы L1210 и Р388 мышей, дополненные другими *in vivo* и *in vitro* моделями, позволяют выявлять большинство потенциально эффективных препаратов для лечения онкологических больных. Поэтому они продолжают оставаться значимыми для скрининга потенциальных противоопухолевых соединений [30, 31].

Оценку противоопухолевой активности ормустина проводили на мышах В6D2F1 с асцитными вариантами лимфолейкозов Р388 и L1210 (чувствительного и субштаммов с индуцированной устойчивостью: L1210/араноза, L1210/нитруллин) и солидной формой Р388.

Была выявлена высокая противоопухолевая активность ормустина при лечении мышей с перевиваемыми лимфолейкозами (табл. 1–4). Как видно из табл. 1, однократное внутривенное введение ормустина в диапазоне доз от 50 до 175 мг/кг мышам-самкам В6D2F1 с лимфолейкозом L-1210 вызывало не только высокое дозозависимое увеличение продолжительности их жизни, но и привело к излечению части животных. Так, если в дозе 50 мг / кг ормустина вызывал только УПЖ на 70 %, то при дозах препарата 100–125 мг/кг выявлено и сильное УПЖ (242–346 %), и излечение большей части (50–67 %) мышей. В более высоких (135–175 мг/кг) дозах ормустина вызывал хотя и значительное излечение (в 44–75 % случаев) мышей с лимфолейкозом L-1210, но и их гибель в 22–25 % случаев, т. е. выявленный на этой модели опухоли интервал терапевтических доз ормустина является узким (табл. 1).

Аналогичные результаты были получены и при исследовании влияния ормустина в широком диапазоне

**Таблица 1.** Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с L-1210

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***	Асцит	Узлы
Контроль	—	7,1 ± 1,1	—	—	—	+	++
5% раствор глюкозы	0,2 мл	7,3 ± 1,4	3	0/8	0/8	+	++
Ормустин	50	12,1 ± 1,4	70	0/8	0/8	+	++
	100	24,3 ± 9,0	242	4/8 (50)*	0/8	+	++
	125	31,7 ± 13,3	346	6/9 (67)*	0/9	++	++
	135	—	—	6/9 (67)*	2/9 (22)	++	++
	150	—	—	4/9 (44)*	2/9 (22)	++	++
	175	—	—	6/8 (75)*	2/8 (25)	0	0

\*  $p < 0,05$  (достоверность различий с контрольной группой —  $t$ -критерий);

\*\*в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент излеченных животных;

\*\*\*в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.

Здесь и в табл. 2: СПЖ — средняя продолжительность жизни животных, УПЖ — увеличение продолжительности жизни животных.

**Таблица 2.** Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с P388 (асцитный вариант)

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***	Асцит	Узлы
Контроль	—	9,7 ± 1,0	—	—	—	+++	+++
5% раствор глюкозы	0,35 мл	9,9 ± 2,1	3	0/9	0/9	+++	+++
Ормустин	50	18,2 ± 1,8	90	0/9	0/9	++	++
	100	26,7 ± 6,7	178	2/9 (22)	0/9	++	++
	125	26,3 ± 2,7	174	3/9 (33)*	0/9	++	++
	135	26,4 ± 4,0	175	3/9 (33)*	1/9 (10)	++	++
	150	25,4 ± 2,9	165	2/8 (25)*	2/8 (25)	++	++
	175	38,0 ± 3,3	186	3/9 (33)*	2/9 (22)	++	++

\*  $p < 0,05$  (достоверность различий с контрольной группой —  $t$ -критерий);

\*\*в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент излеченных животных;

\*\*\*в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.

**Таблица 3.** Изменение массы тела мышей с P388 (асцитный вариант) после однократного введения ормустина

Доза, мг/кг	Масса тела**, г			Гибель от токсичности***
	исходная	после лечения		
		на 6-й день	на 8-й день	
Контроль	19,7 ± 1,4	21,0 ± 1,5	19,9 ± 2,2	0/9
50	21,4 ± 1,9	20,0 ± 1,0	20,8 ± 1,0	0/9
100	20,1 ± 0,6	19,7 ± 0,8	19,7 ± 0,8	0/9
125	19,0 ± 1,3	19,0 ± 1,3	19,0 ± 0,8	0/9
135	18,5 ± 1,1	16,4 ± 1,2 (13)	18,5 ± 1,3	1/9 (10)
150	21,1 ± 1,6	16,4 ± 1,8 (22)*	17,6 ± 2,2	2/8 (25)
175	19,9 ± 0,7	15,1 ± 1,1 (24)*	17,2 ± 1,7	2/9 (22)

\*  $p < 0,05$  (достоверность различий с контрольной группой —  $t$ -критерий)

\*\*уменьшение средней массы тела мышей в группе по отношению к исходной средней массе тела, в скобках указано в процентах;

\*\*\*в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.



**Таблица 4.** Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с P388 (солидный вариант)

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***
Контроль	—	17,5 ± 1,7	—	—	—
Ормустин	75	37,2 ± 10,5*	112	1/7 (14)	0/7
	100	44,8 ± 9,0*	156	3/7 (43)	0/7
	125	40	—	6/7 (86)	0/7

\*  $p \leq 0,05$  (достоверность различий с контрольной группой по критерию Колмогорова—Смирнова);

\*\*в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент излеченных животных;

\*\*\*в числителе дано число погибших от токсичности мышей, в знаменателе — общее число животных в группе.

доз (от 50 до 175 мг / кг) на рост лимфолейкоза P388, привитого мышам-самкам B6D2F1 (C57Bl/6 x DBA/2) внутрибрюшинно (табл. 2). Как и в случае с лимфолейкозом L-1210, была выявлена зависимость терапевтического эффекта от дозы препарата: в более низкой дозе (50 мг / кг) отмечено только УПЖ на 90 %, в дозах 100—125 мг/кг — высокий уровень УПЖ и излечение значительной части мышей. Высокая противоопухолевая активность ормустина в дозах 135 мг/кг и выше сопровождалась дозозависимой гибелью животных с признаками токсического действия препарата (табл. 2 и 3).

Проявления токсического действия ормустина оценивались при сравнении сроков гибели животных и динамики изменения средних масс тела мышей в контрольной и опытных группах (табл. 1—3). Данные, представленные в табл. 3, показывают, что однократное внутривенное введение мышам с асцитным вариантом P388 ормустина в дозах 50—125 мг/кг не вызывало более ранней, чем в контрольной группе, гибели животных, а изменения средней массы тела в этих группах были практически сходными с таковыми в контрольной группе. Масса тела мышей с P388 при внутривенном однократном введении ормустина в дозе 135 мг/кг, вызывающей гибель 10 % животных, упала на 6-й день наблюдения на 2,1 г, а к 8-му дню восстановилась. Ормустин в дозах 150 мг/кг и выше имел выраженное токсическое действие: в 22—25 % случаев более ранняя, чем в контрольной группе, гибель мышей, резкое падение средней массы тела на 4,6—4,8 г (22—24 % по сравнению с исходной) к 6-му дню после окончания введения препарата и постепенное ее увеличение к 8-му дню.

Таким образом, при однократном внутривенном введении ормустина мышам с перевиваемыми асцитными лимфолейкозами доза 125 мг/кг является терапевтической, 135 мг/кг — максимально переносимой ( $LD_{10}$ ), а 150 мг/кг — летальной ( $LD_{25}$ ).

Ормустин проявил высокий противоопухолевый эффект и при лечении мышей-самцов B6D2F1 с лимфолейкозом P388 (солидный вариант). При введении препарата также показана зависимость продолжи-

тельности жизни опытных мышей от дозы препарата (табл. 4). В контрольной группе у всех животных развились подкожные опухолевые узлы, и к 20-м сут опыта все мыши погибли при явлениях генерализованного опухолевого процесса. При этом не представлялось возможным оценить активность препарата при сравнении средних объемов подкожных опухолевых узлов в контрольной и опытных группах, так как ормустин не только значительно увеличивал латентное время развития опухоли, но и сдерживал развитие опухолевых узлов у значительной части мышей в опытных группах в течение 90 дней наблюдения. Эти мыши считались излеченными [29].

Так как для препаратов из группы производных НАМ показано достаточно быстрое развитие резистентности к их действию и отсутствие полной перекрестной устойчивости, особый интерес вызывает способность новых соединений преодолевать подобные осложнения [3, 26, 27]. Было исследовано противоопухолевое действие ормустина на мышках-самцах BDF1 с перевиваемым лимфолейкозом L-1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L-1210/араноза) и L-1210, нарабатанной устойчивостью к лизомустину (L-1210 / нитруллин), которые имеют различные механизмы устойчивости [26].

В условиях организма для НАМ характерна реакция гидролитического распада с образованием алкилирующих и карбамоилирующих частиц. Взаимодействие этих частиц с макромолекулами, такими как ДНК, РНК, ДНК- и РНК-полимеразы, цитоплазматические и ядерные белки, белковые компоненты клеточных мембран, обуславливают молекулярные механизмы биологического действия НАМ. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что образование в ДНК аддуктов  $O^6$ -алкилгуанина и длительность существования этой модификации в значительной степени определяют цитотоксичность НАМ [30].

ДНК-репарирующий акцепторный белок  $O^6$ -алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза ( $O^6$ -метилгуанин-ДНК метилтрансфераза, MGMT; EC 2.1.1.63) репарирует аддукты  $O^6$ -алкилгуанина в ДНК, и уровень его активности коррелирует с чувствительностью

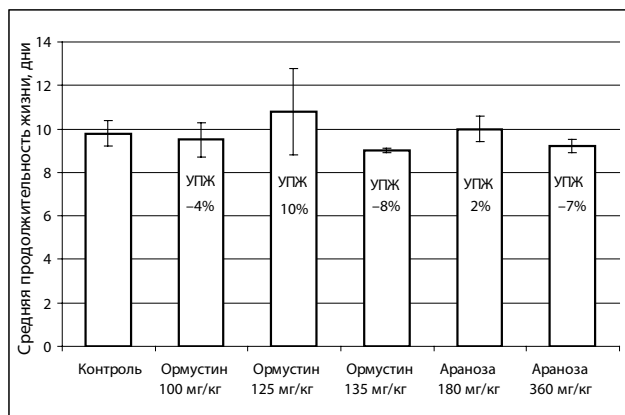


Рис. 2. Влияние ормустина на продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом L1210/араноза

клеток к цитотоксическому действию НАМ. Существует множество экспериментальных и клинических данных о том, что высокий уровень экспрессии MGMT в клетках опухоли приводит к резистентности химиотерапии НАМ [4].

Было выявлено значительное увеличение уровня MGMT в субштамме L-1210 / араноза по сравнению с чувствительным штаммом L-1210, которое, по-видимому, играет существенную роль в возникновении индуцированной устойчивости к аранозе [9].

Но существенных различий в уровнях MGMT в клетках чувствительного штамма L-1210 и клетках субштамма L-1210 / нитруллин не выявлено, и было признано маловероятным, что эти различия ответственны за возникновение устойчивости к нитруллину [26]. В клетках субштамма L-1210/нитруллин было обнаружено менее глубокое, чем в клетках чувствительного штамма L-1210, ингибирование и существенно более быстрое восстановление синтеза ДНК и РНК, повышение активности основного фермента репарации ДНК полимеразы  $\beta$ , увеличение уровня SH-групп. Такие различия в скорости репарации повреждений ДНК и могут обуславливать возникновение лекарственной устойчивости к нитруллину [26].

Араноза, которая обладает высоким противоопухолевым эффектом при лечении мышей с чувствительным штаммом L-1210 [2], ни в дозе 180 мг/кг (1/2 максимальной переносимой дозы, МПД), ни в дозе 360 мг/кг (близкой к МПД) не увеличивала продолжительности жизни мышей с L-1210/араноза (рис. 2). Ормусти́н в дозах 100–135 мг/кг также не проявил противоопухолевой активности у мышей с L-1210/араноза (рис. 1).

Лизомустин, который обладает высоким противоопухолевым эффектом при лечении мышей с чувствительным штаммом L-1210 [3, 26], ни в дозе 80 мг/кг (доза, которая была использована при индукции устойчивости [12]), ни в МПД (150 мг/кг) не оказал влияния на продолжительность жизни мышей

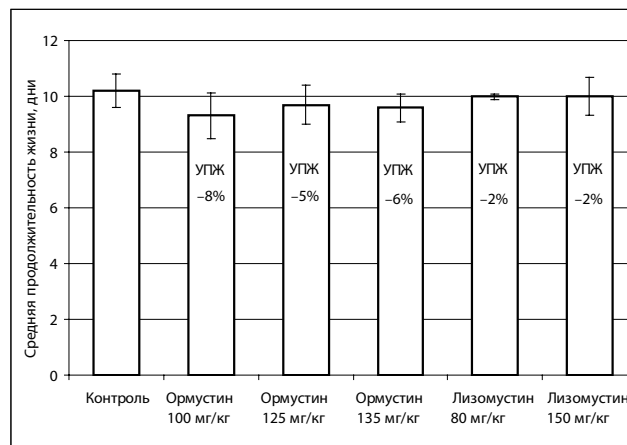


Рис. 3. Влияние ормустина на продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом L1210/нитруллин

с L-1210/нитруллин (рис. 3). Ормусти́н в дозах 100–135 мг/кг также не проявил противоопухолевой активности у мышей с L-1210 / нитруллин.

Таким образом, ормусти́н в изученных дозах и режиме введения не проявил противоопухолевой активности при лечении мышей с лейкозами с индуцированной устойчивостью к аранозе или лизомустину. Ранее было показано [3, 26, 27], что противоопухолевое действие лизомустина на этих субштаммах тоже невысоко (отсутствие такового при L1210/нитруллин, а при L1210 / араноза — только незначительное УПЖ) [3]. Возможно, что такое снижение эффективности лизомустина на этом субштамме (по сравнению с чувствительным штаммом L1210) обусловлено высоким уровнем экспрессии MGMT в L1210 / араноза [26].

Полученные результаты позволяют предположить, что механизмы развития лекарственной устойчивости к ормусти́ну и лизомустину сходны.

### Заключение

Проведенные исследования показали высокую дозозависимую противоопухолевую активность ормустина на асцитных формах лимфолейкозов L1210 и P388 с излечением мышей в 67 и 33 % случаев соответственно. Ормусти́н проявляет еще более высокий противоопухолевый эффект при лечении мышей с солидной формой лимфолейкоза P388 — излечение наблюдается в 86 % случаев. Кроме того, на L1210 и P388 установлена терапевтическая доза ормустина, которая составляет 125 мг/кг при однократном внутривенном его введении.

Однако выявлена перекрестная устойчивость ормустина на мышах с перевиваемым лимфолейкозом L1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L1210/араноза) и L1210 с наработанной устойчивостью к лизомустину (L-1210/нитруллин), которые обладают разным механизмом устойчивости.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Краснов В.П., Чупахин О.Н., Левит Г.Л. и др. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003:135–46.
2. Переводчикова Н.И. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой и В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015:37–48.
3. Перетолчина Н.М., Герасимова Г.К., Белоусова А. К., Барышников А.Ю. Доклиническое изучение противоопухолевой активности и механизма действия лизомустина. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003: 147–60.
4. Сыркин А.Б., Горбачева Л.Б. Биохимические механизмы действия N-алкил-N-нитрозомочевин. Возможные причины лекарственной устойчивости к этим соединениям. Экспериментальная и клиническая фармакология 1996;59(2):69–75.
5. Poschke I., Mao Y., Kiessling R. et al. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. *J Transl Med* 2013;16:11:290. doi: 10.1186/1479-5876-11-290. PMID:24237611.
6. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П. и др. N $\omega$ -Алкилнитрозокарбамоил- $\alpha$ ,  $\omega$ -диаминокарбоновые кислоты. II. Синтез и противоопухолевая активность нитрозопроизводных N $\omega$ -(2-хлорэтил)-карбамоил- $\alpha$ , $\omega$ -диаминокарбоновых кислот. Химико-фармацевтический журнал 1996;30(4):15–7.
7. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П. и др. N $\omega$ -Алкилнитрозокарбамоил- $\alpha$ ,  $\omega$ -диаминокарбоновые кислоты. III. Синтез и противоопухолевая активность N $\epsilon$ -нитрозо-N $\epsilon$ -[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизина и N $\epsilon$ -[N'-(2-хлорэтил)-N'-нитрозокарбамоил]-L-лизина. Химико-фармацевтический журнал 1996;30(5):23–5.
8. Горбунова В.А., Манзюк Л.В., Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Лизомустин — отечественный препарат из группы производных нитрозомочевин в лечении меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):55–6.
9. Горбунова В.А., Семина О.В., Кадагидзе З.Г. и др. Нитруллин — новый оригинальный отечественный препарат из группы нитрозомочевин. Вопросы онкологии 2001;6:680–3.
10. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышникова М.А. и др. Нитрозомочевин на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат Лизомустин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):46.
11. Majumdar R., Shao L., Minocha R. et al. Ornithine: The Overlooked Molecule in the Regulation of Polyamine Metabolism. *Plant Cell Physiol* 2013;54(6):990–1004. doi: 10.1093/pcp/pct053. Epub 2013 9. PMID:23574701.
12. Pegg A.E., Casero R.A. Current status of the polyamine research field. *Methods Mol Biol* 2011;720:3–35. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8\_1. PMID:21318864.
13. Seidenfeld J., Sprague W.S. Comparisons between sensitive and resistant human tumor cell lines regarding effects of polyamine depletion on chloroethylnitrosourea efficacy. *Cancer Res* 1990; 1;50(3):521–6. PMID:2137022.
14. Webber M.M., Buffkin D.C., Juillard G.J-F. et al. Ornithine metabolism in normal subjects and patients with cancer. *J Nucl Med* 1980;21(12):1194–6. PMID:6777468.
15. Ikeguchi Y., Mackintosh C.A., McCloskey D.E., Pegg A.E. Effect of spermine synthase on the sensitivity of cells to anti-tumour agents. *Biochem J* 2003; 1;373(Pt 3):885–92. PMID:12737625.
16. Manni A., Washington S., Mauger D et al. Cellular mechanisms mediating the anti-invasive properties of the ornithine decarboxylase inhibitor alpha-difluoromethylornithine (DFMO) in human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(5):461–7. PMID:15672871.
17. Casero R.A., Woster P.M. Recent Advances in the Development of Polyamine Analogues as Antitumor Agents. *J Med Chem*. 2009; 13;52(15):4551–73. doi: 10.1021/jm900187v. PMID: 19534534.
18. O'Shaughnessy J.A., Demers L.M., Jones S.T. et al.  $\alpha$ -Difluoromethylornithine as Treatment for Metastatic Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 1999;5(11):3438–44. PMID:10589756.
19. Raul F. Revival of 2-(difluoromethyl)ornithine (DFMO), an inhibitor of polyamine biosynthesis, as a cancer chemopreventive agent. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 2):353–5. PMID:17371277.
20. Medina-Enriquez M.M., Alcántara-Farfán V., Aguilar-Faisal L. et al. N- $\omega$ -chloroacetyl-L-ornithine, a new competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, induces selective growth inhibition and cytotoxicity on human cancer cells versus normal. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2015;30(3):345–53. doi: 10.3109/14756366.2014.926342. Epub 2014 Jun 18. PMID:24939101.
21. Hung D.T., Oredsson S.M., Pegg A.E. et al. Potentiation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity in 9L rat brain tumor cells by methylglyoxal-bis(guanylhydrazine), an inhibitor of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1984;20(3):417–20. PMID:6538500.
22. Hunter K.J., Deen D.F., Pellarin M., Marton L.J. Effect of alpha-difluoromethylornithine on 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cis-diamminedichloroplatinum(II) cytotoxicity, DNA interstrand cross-linking, and growth in human brain tumor cell lines in vitro. *Cancer Res*. 1990; 1;50(9):2769–72. PMID:2109657.
23. Wolff S., Feeney L., Afzal V. Depletion of cellular polyamines by alpha-difluoromethylornithine increases 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-induced sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1993;289(1):107–14. PMID:7689156.
24. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитроалкиломочевин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):8.
25. Грищенко И.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):49–54.
26. Горбачева Л.Б., Дедерер Л.Ю. Исследование механизмов лекарственной устойчивости к нитруллину (лизомустину). Российский биотерапевтический журнал 2005;4(3):42–7.
27. Перетолчина Н.М., Семина О.В. Араноза — новый отечественный противоопухолевый препарат из группы нитрозомочевин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003:201–14.
28. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):113.
29. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012:640–54.
30. Bibby M.C. Making the most of rodent tumour systems in cancer drug discovery. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1633–40. PMID:10206270
31. Marsh J.C., Shoemaker R.H., Suffness M. Stability of the in vivo P388 leukemia model in evaluation of antitumor activity of natural products. *Cancer Treat Rep* 1985;69(6):683–5. PMID:4016772.