



УДК 577.175.82.05:612.112.94

## СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА МИЕЛОПЕПТИДА МП-1

© 2012 г. Л. А. Фонина\*, Е. М. Трещалина\*\*\*, Р. Г. Белевская\*, А. А. Азьмуко\*\*,  
М. А. Ефремов\*, Л. А. Седакова\*\*\*, Е. А. Кирилина\*,#

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*НИИ экспериментальной кардиологии

Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ

\*\*\*НИИ экспериментальной терапии и диагностики опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Поступила в редакцию 17.11.2011 г. Принята к печати 18.11.2011 г.

Классическими методами пептидной химии в растворе проведен синтез костномозгового пептида Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr (МП-1) и изучены его противоопухолевые свойства. Показано, что пептид МП-1 усиливает эффективность цитостатической терапии лимфолейкоза Р388, увеличивает латентный период прививаемости лимфолейкоза Р388 у облученных мышей, а также снижает рецидивирование аденокарциномы молочной железы (Ca-755) у мышей после операции.

*Ключевые слова:* миелопептид МП-1, синтез, противоопухолевая активность, иммунодепрессия.

### ВВЕДЕНИЕ

Гексапептид Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr относится к группе эндогенных регуляторных пептидов (миелопептидов – МП), продуцируемых клетками костного мозга, и назван миелопептидом-1 (МП-1). Изучение биологической активности и механизмов действия индивидуальных миелопептидов показало, что каждый из 6 выделенных к настоящему времени пептидов направленно действует на определенный тип иммунокомпетентных клеток, реализуя свои иммунокорректирующие эффекты по природным механизмам [1, 2].

Ранее было показано, что МП-1 является иммуномодулятором, нормализующим антителообразование у животных с иммунодефицитами различной этиологии, вызванных, в частности радиацией, цитостатиками или антибиотиками [3–5].

Создание у мышей направленных дефицитов *in vivo* путем избирательной элиминации Т- или В-клеток показало, что иммунокорректирующее действие МП-1 осуществляется через популяцию Т-клеток [4]. Изучение связывания флуоресцеин-

меченного МП-1 с поверхностью лимфоидных клеток методом двойного флуоресцентного окрашивания позволило установить, что клеткой-мишенью данного регуляторного пептида является CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцит, т.е. Т-хелпер [6]. В основе механизма иммунокорректирующего действия МП-1 лежит его способность нормализовать нарушенный баланс CD4/CD8-клеток (Т-хелперы/Т-супрессоры), результатом чего является восстановление уровня антителообразования [7].

Поскольку ранее было показано, что МП-1 нормализует нарушенный баланс основных регуляторных субпопуляций клеток CD4/CD8, что характерно, в том числе, для роста опухоли, представлялось интересным изучить способность этого пептида оказывать противоопухолевое действие: тормозить рост различных опухолей в условиях иммунодефицита, вызванного радиационным облучением или постоперационным стрессом.

Целью данной работы было изучение иммунокорректирующих и противоопухолевых свойств гексапептида МП-1 в условиях иммунодефицита, индуцированного как радиацией или операционным стрессом, так и развитием злокачественных опухолей.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид МП-1 Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr синтезировали классическими методами пептидной химии в растворе по схеме (3+3). N- и C-Конце-

Сокращения: МП-1 – миелопептид-1; ЦП – цисплатин; ТРО – торможение роста опухоли; СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – удлинение продолжительности жизни; п/к – подкожно; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; DMF – N,N-диметилформамид.

# Автор для связи: тел.: (495) 330-72-56; эл. почта: kirilinaelen@yandex.ru.

**Таблица 1.** Эффективность моно- и комбинированного применения МП-1 и цисплатина (ЦП) на мышах с подкожным лимфолейкозом Р-388

Препарат	Доза, г/мышь	Vcp (мм <sup>3</sup> )&	ТРО, %&	СПЖ, сут	УПЖ, %
Контроль	—	461; 2948; 6348	—	21.1	—
МП-1	$1 \times 10^{-8}$	73; 1132; 2111	84*; 62*; 67*	21.5	
ЦП	$8 \times 10^{-8}$	60; 362; 993	86*; 91*; 86*	24.7	28*
ЦП	$1.6 \times 10^{-7}$	39; 175; 750	91*; 94*; 88*	27.8	31*
ЦП + МП-1	$8 \times 10^{-8} + 1 \times 10^{-8}$	9; 66; 367	98**; 97**; 94**	32.8	32*
ЦП + МП-1	$1.6 \times 10^{-7} + 1 \times 10^{-8}$	2; 79; 335	99**; 97**; 95**	33.7	39*

& Три цифры соответствуют последовательно результату на 11-е, 14-е и 18-е сутки после перевивки опухоли.

Примечание: при 10-кратном курсе МП-1 интервал между инъекциями составлял 24 ч; отличие от контроля: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Vcp (мм<sup>3</sup>) — средний объем опухоли в мм<sup>3</sup>; СПЖ — средняя продолжительность жизни; УПЖ — удлинение продолжительности жизни.

вые трипептиды получали последовательным наращиванием пептидных цепей по N-концу методом активированных N-оксисукцинимидных эфиров. Полученные трипептиды конденсировали карбодиимидным методом. Для блокирования  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот использовали Вос- и Z-заместители, карбоксильные группы защищали солеобразованием, C-концевую карбоксильную группу треонина защищали амидированием. Целевой гексапептид МП-1 выделяли и очищали методом обращенно-фазовой хроматографии, он охарактеризован данными аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии и секвенирования.

В первой серии экспериментов изучали влияние МП-1 на рост и развитие лимфолейкоза Р388, а также эффективность применения данного пептида в сочетанной цитостатической противоопухолевой терапии. Для оценки эффективности противоопухолевого действия МП-1 в качестве положительного контроля использовали цитостатик цисплатин (ЦП), используемый в клинической практике.

Противоопухолевую активность МП-1 и ЦП оценивали *in vivo* на различных типах перевиваемых мышинных опухолей (лимфолейкоз Р388, аденокарцинома молочной железы Са 755), полученных из банка опухолевых штаммов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина.

Опыты проводились на мышах с подкожно (п/к) перевитым лимфолейкозом Р-388. Цисплатин вводили однократно внутривентриально в дозах 8 и 4 мг/кг, вызывающих существенную иммунодепрессию. Лечение ЦП начинали через 24 ч после перевивки опухоли. МП-1 вводили п/к в разовой дозе  $1 \times 10^{-8}$  г/мышь ежедневно со 2-го по 11-й дни после перевивки опухоли. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 1.

Показано, что в монотерапии МП-1 вызывал значимое торможение роста опухоли (ТРО) на

84% сразу после окончания курса лечения без существенного влияния на продолжительность жизни мышей. ЦП в монотерапии в дозах  $8 \times 10^{-8}$  и  $1.6 \times 10^{-7}$  г/мышь был практически равноэффективен МП-1 и вызывал максимальное ТРО, равное 86–94%, которое удерживалось в течение недели на уровне 86–88%; продолжительность жизни мышей при этом возрастала на 28–31%. В группах с комбинированной терапией при введении ЦП (в дозах  $8 \times 10^{-8}$  и  $1.6 \times 10^{-7}$  г/мышь) и МП-1 (в разовой дозе  $1 \times 10^{-8}$  г/мышь в течение 10 дней), к концу первой недели после отмены лечения ТРО возросло до 94–95%. Продолжительность жизни мышей в этих группах увеличилась на 32 и 39%, т.е. была практически в 1.5 раза больше, чем при монотерапии ЦП. Таким образом очевидно, что комплексная терапия лимфолейкоза Р-388 с использованием ЦП и МП-1 оказывает более выраженное действие не только на прививаемость опухоли, но и на продолжительность жизни животных в отличие от монотерапии как МП-1, так и ЦП.

Далее было изучено противоопухолевое и профилактическое действие МП-1 на рост и развитие лимфолейкоза Р-388 в условиях иммуносупрессии, вызванной радиационным облучением. Мышам линии BDF<sub>1</sub> в течение 5 дней (с промежутком 24 ч) вводили МП-1 в диапазоне доз  $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-5}$  г/мышь. Затем облучали в дозе 4.5 Гр и через 24 ч подкожно прививали  $10^3$  клеток лимфолейкоза Р-388, продолжая введение МП-1 на протяжении еще 5 дней после перевивки. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Из данных таблицы видно, что в контрольной группе опухоли появлялись у мышей на 15-й день (латентный период), в экспериментальных группах № 2–4 опухоли также возникали на 15-е сутки, но у меньшего количества животных, при этом в группе 4 опухоли начали появляться еще и позже (17-й день). Десятидневное введение МП-1

Таблица 2. Влияние МП-1 на прививаемость лимфолейкоза Р-388 в условиях радиационного стресса (4.5 Гр)

Номер группы	Доза МП-1, г/мышь	Дни после введения Р-388 (гибель животных, %)											
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	— (контрольная группа)*	0	60	70	90	100							
2	$1 \times 10^{-5}$	0	44	56	67	100							
3	$1 \times 10^{-6}$	0	40	50	70	80	90	90	90	100			
4	$1 \times 10^{-7}$	0	30	40	50	60	90	90	90	90	100		
5	$1 \times 10^{-8}$	0	0	0	40	40	60	60	60	70	80	100	

\* Введение физиологического раствора.

Таблица 3. Влияние МП-1 на спонтанное рецидивирование Са-755 молочной железы у мышей в условиях иммунодепрессии, вызванной операционным стрессом

Введение МП-1, $1 \times 10^{-8}$ г/мышь	Количество мышей (всего)	Количество мышей с рецидивом	Рецидивирование, %
— (контрольная группа)*	34	22	65
2–11 день после операции	28	13	46
по 5 дней до и после операции	32	14	44*

\* Введение физиологического раствора ежедневно в течение 10 дней. \*  $p < 0.05$ .

задерживало появление опухолей до 22–24 дней. Максимальная задержка прививаемости лейкоза составила 6 дней (33–35%) при разовой дозе МП-1, равной  $1 \times 10^{-8}$  г/мышь, что весьма существенно с учетом короткой продолжительности жизни мышей с этой опухолью.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что МП-1 обладает профилактическим эффектом: его введение достоверно замедляет возникновение опухолей, продлевает срок жизни подопытных животных и снижает уровень радиационной иммунодепрессии у мышей.

Во второй серии экспериментов исследовали противоопухолевое и профилактическое действие МП-1 на возникновение спонтанных и искусственных рецидивов опухолей в условиях иммунодепрессии, вызванной операционным стрессом — удалением аденокарциномы молочной железы Са-755 у мышей. Известно, что послеоперационный стресс сопровождается стимуляцией метастазирования и рецидивирования опухолей. Наступление экспоненциальной фазы роста опухоли, при которой происходит резкое увеличение размеров опухоли в краткие сроки, соответствует преодолению иммунологического надзора организма, т.е. выраженной иммунодепрессии [8].

Опухолевые клетки Са-755 (50 мг/мышь) перививали подкожно мышам-самкам гибридов BDF1. Когда опухоли достигали среднего объема 700–900 мм<sup>3</sup>, их удаляли под тиопенталовым наркозом. Мыши, у которых на 10-е сутки после операционного удаления опухоли, появлялись подкожные рецидивы, составляли группу “спонтанного рецидивирования”. При изучении влияния спонтанного рецидивирования опухоли Са-755 молочной железы одна из опытных групп мышей получала МП-1 в дозе  $1 \times 10^{-6}$  г/мышь со 2-го по 11-й день после операции (1-я схема). Второй опытной группе МП-1 вводили профилактически в дозе  $1 \times 10^{-8}$  г/мышь за 5 дней до операции и в течение 5 дней после операции (2-я схема). Таким образом, обе опытные группы получали МП-1 в течение 10 дней, различие между группами заключалось в том, что в 1-й схеме изучался только лечебный эффект МП-1, в то время как во 2-й схеме исследовали и профилактическое воздействие пептида на спонтанное рецидивирование Са-755 молочной железы. Контрольной группе вместо пептида вводили физиологический раствор. Измерения размеров рецидива Са-755 проводили у мышей на 10-е сутки после операции по удалению опухоли. Результаты представлены в табл. 3.

**Таблица 4.** Влияние МП-1 на искусственное рецидивирование Са-755 молочной железы у мышей в условиях иммунодепрессии, вызванной операционным стрессом

Введение МП-1, $1 \times 10^{-8}$ г/мышь	Количество мышей (всего)	Количество мышей с рецидивом	Рецидивирование, %
– (контрольная группа)*	15	15	100
ежедневно с 2-го-по 11-й день после операции	17	17	100
ежедневно по 5 дней до и после операции	18	12	67

\* Введение физиологического раствора ежедневно в течение 10 дней.

Из данных, представленных в таблице, видно, что в контрольной группе после удаления опухоли спонтанные рецидивы были отмечены в 65% случаев. В группе животных, получивших МП-1 в течение 10 дней после удаления опухоли, число спонтанных рецидивов сокращается до 46%, что в 1.4 раза меньше по сравнению с контролем (1-я схема). В группе мышей, получивших МП-1 в период максимально ожидаемой иммунодепрессии – 5 дней до операции (неoadъювантная терапия) и 5 дней после операции (адъювантная терапия) число спонтанных рецидивов достоверно уменьшалось до 44%, что практически в 1.5 раза меньше контроля.

При изучении влияния МП-1 на искусственное рецидивирование мышам через 10–11 дней после операции повторно перевивали по 50 мг/мышь опухолевой взвеси клеток Са-755. Опытные и контрольная группы мышей получали МП-1 по аналогии с предыдущей серией экспериментов. Измерения размеров рецидива Са-755 проводили у мышей на 7-е сутки после операции по прививке опухоли. Результаты представлены в табл. 4.

Проведенные эксперименты показали, что в контрольной группе искусственное рецидивирование наступало в 100% случаев после удаления опухоли. Введение МП-1 с лечебной целью (2–11-й день после операции) не привело к снижению числа рецидивов. В то же время пептид, введенный с профилактической целью в период максимально ожидаемой иммунодепрессии (5 дней до и 5 дней после операции) уменьшил число искусственных рецидивов опухоли Са-755 молочной железы до 67% (на 33% меньше рецидивов по сравнению с контролем).

Таким образом, изучение влияния МП-1 на прививаемость опухолей в условиях радиационной иммунодепрессии и при возникновении рецидивов в условиях операционного стресса показало, что МП-1 проявляет профилактический иммунокорректирующий эффект. Пептид достоверно продлевал срок жизни подопытных животных,

снижал уровень радиационной иммунодепрессии, увеличивал сроки прививаемости опухолей у мышей, а также снижал рецидивирование опухоли при ее оперативном удалении.

Профилактический эффект МП-1, проявляющийся в послеоперационный период, связан, очевидно, с его иммунокорректирующим действием при иммунодепрессии, возникающей у животных при операционном стрессе. Послеоперационная иммунодепрессия способствует возобновлению опухолевого роста, а МП-1, обеспечивая восстановление иммунитета, снижает вероятность рецидива. Полученные данные указывают на перспективность использования МП-1 в комплексной терапии рака в качестве иммунокорректора для профилактики рецидивов у онкологических больных, перенесших операционное вмешательство, интенсивную лучевую или химиотерапию. МП-1 – эндогенный низкомолекулярный иммунорегуляторный пептид с расшифрованной первичной структурой и механизмом действия представляет перспективную основу для разработки лекарственных средств нового поколения, направленно действующих на поврежденные звенья иммунитета, и не оказывающих при этом побочных эффектов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия, Fluka, Швейцария) или производные, полученные по стандартным методикам. Индивидуальность полученных соединений на промежуточных стадиях синтеза проверяли с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем фирмы “Merk” (Германия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (А); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 5 : 3 : 1 (Б); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 15 : 4 : 1 (В); *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 3 : 1 : 1 (Г); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 9 : 1 : 0.5 (Д). Вещества обнаруживали с помощью нингидрина или *o*-толидина.

**Аналитическую ВЭЖХ** проводили с использованием хроматографической системы LC-10ADvp (Shimadzu, Япония) на колонке Ультрасфера C18 (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте (0–80%, 32 мин). Скорость элюции 1.6 мл/мин, детектирование при длине волны 214 и 280 нм.

**Препаративную ВЭЖХ** конечных и промежуточных пептидов выполняли на колонке (50 × 250 мм) Диасорб С 16-Т в градиенте буфера В в буфере А (10–50%, 120 мин; буфер А – 0.01 М CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, буфер В – 80% ацетонитрила в буфере А). Скорость потока 50 мл/мин, детекция при 226 нм. Фракции, соответствующие основному пику, объединяли, ацетонитрил упаривали, полученный раствор разбавляли водой и лиофилизовали.

**Синтез – Н-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (МП-1). Н-Leu-Gly-OH × TFA.** К раствору 1.65 г (0.022 моль) глицина в 22 мл 1 М NaOH, добавляли 60 мл DMF и 6.58 г (0.02 моль) Вос-Leu-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали, остаток растворяли в 100 мл воды, экстрагировали диэтиловым эфиром (3 × 30 мл). Водный слой подкисляли 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, экстрагировали целевое вещество этилацетатом (2 × 50 мл). Этилацетатный раствор промывали водой до pH 5 и упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 70 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали при комнатной температуре 1 ч, кислоту отгоняли в вакууме, остаток растирали в эфире и отфильтровывали. Полученный осадок сушили в эксикаторе над KOH. Выход 5.44 г (90% в расчете на Вос-Leu-ONSu)

**Z-Phe-Leu-Gly-OH (1).** Раствор 5.44 г (0.018 моль) Н-Leu-Gly-OH × TFA в 60 мл DMF, прибавляли к 2 мл (0.018 моль) N-метилморфолина и 7.15 г (0.018 моль) Z-Phe-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали 50 мл 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и водой (3 × 50) до pH 5. Этилацетатный раствор упаривали и кристаллизовали из диэтилового эфира. Выход 7.97 г (93%).

**Н-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> × TFA.** К раствору 4.6 г (0.022 моль) Н-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> в 60 мл DMF прибавляли 6.26 г (0.020 моль) Вос-Pro-ONSu и перемешивали 12 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, экстрагировали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 мл) и 5% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 × 50 мл). Этилацетатный раствор промывали водой до pH 5 и этилацетат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 70 мл TFA, выдерживали 1 ч при 20°C, упаривали и затирали с диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе над KOH. Выход 7.96 г (95%).

**Вос-Phe-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub>.** К раствору 7.96 г (0.019 моль) Н-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> в 60 мл DMF прибавляли 2.1 мл (0.019 моль) N-метилморфолина 6.9 г (0.019 моль) Вос-Phe-ONSu и перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 мл) и 5% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 × 50 мл). Этилацетатный раствор промывали водой до pH 5, упаривали и кристаллизовали из диэтилового эфира. Выход 9.38 г (89%).

**Н-Phe-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> × TFA (2).** Раствор 9.38 г (0.017 моль) Вос-Phe-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> в 70 мл TFA, выдерживали 1 ч при 20°C, упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром и отфильтровывали. Фильтрат сушили в эксикаторе над KOH. Выход 9.62 г (99.9%).

**Z-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub>.** К раствору 9.62 г (0.017 моль) пептида (2) в 100 мл DMF добавляли 7.97 г (0.017 моль) пептида (1), 1.9 мл N-метилморфолина и 1.04 г (0.009 моль) HONSu. Полученный раствор охлаждали до –25°C и прибавляли при перемешивании 3.68 г (0.178 моль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь выдерживали 12 ч при 8°C. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отфильтровывали. DMF упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл смеси этилацетата и бутанола 1 : 1, промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 мл) и 5% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 × 50 мл). Этилацетатно-бутанольный раствор промывали водой до pH 5, упаривали и кристаллизовали из эфира. Выход 13.06 г (85%).

**Н-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>.** Z-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> (13.06 г, 0.0145 моль) растворяли в 100 мл метилового спирта и гидрировали над 10% Pd/C до исчезновения исходного соединения по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали. Целевой пептид очищали методом ВЭЖХ на колонке (50 × 250 мм) Диасорб С-16-Т, в градиенте концентрации (0–50%, 120 мин) буфера Б в буфере А. Скорость потока 50 мл/мин, детекцию проводили при 226 нм. Ацетонитрил упаривали, полученный раствор разбавляли водой и лиофилизовали. Выход амида МП-1 6.16 г (62%).

**Молекулярная масса МП-1**, определенная масс-спектрометрически на приборе Thermo Bioanalysis Vision 2000 (Англия), составляет 681.

**Оценка противоопухолевой эффективности МП-1** проведена на мышах с подкожно перевитыми клетками лимфолейкоза Р-388. МП-1 вводили п/к в разовой дозе 1 × 10<sup>-5</sup> г/мышь ежедневно с 2-го по 11-й дни после перевивки опухоли. В экспериментах по совместному противоопухолевому действию МП-1 в качестве цитостатика был использован цисплатин (ЦП). ЦП вводили одно-

кратно внутрибрюшинно в дозах 8 и 4 мг/кг, вызывающих существенную иммунодепрессию. Лечение ЦП начинали через 24 ч после перевивки опухоли. Оценка эффективности лечения в обоих случаях проведена по традиционным показателям: торможение роста опухоли (ТРО) в процентах и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) в процентах. Эти показатели свидетельствуют о действии препаратов на размеры опухоли и на продолжительность жизни мышей.

$$\text{ТРО} = \frac{V_{\text{к}} - V_{\text{оп}}}{V_{\text{к}}} \times 100, \text{ где } V_{\text{к}} \text{ и } V_{\text{оп}} - \text{объем опухоли}$$

в контроле и в опыте

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{ПЖ}_{\text{к}} - \text{ПЖ}_{\text{оп}}}{\text{ПЖ}_{\text{к}}} \times 100, \text{ где } \text{ПЖ}_{\text{к}} \text{ и } \text{ПЖ}_{\text{оп}} -$$

продолжительность жизни мышей в контроле и в опыте.

**Облучение мышей** (тотальная доза составила 4.5 Гр) проводили на установке “Стебель–3А”, мощность дозы составляла 5 Гр/мин.

**Профилактическое действие** МП-1 на онкогенез в условиях иммунодефицитного состояния, индуцированного облучением (4.5 Гр), оценивали по времени задержки 100%-й прививаемости лейкоза в сравнении с контрольной группой (необлученными животными). В качестве прививаемой опухоли использовали клетки лимфолейкоза Р-388, способные образовывать хорошо прощупываемые опухоли под кожей на раннем этапе развития. Исследования проводили на мышцах BDF<sub>1</sub>, которым подкожно вводили 10<sup>3</sup> клеток лимфолейкоза Р-388 в объеме 0.2 мл через 24 ч после облучения. В каждой группе было не менее 8 животных. МП-1 вводили подкожно в физиологическом растворе, начиная за 5 дней до прививки опухоли и в течение последующих 5 дней после прививки в диапазоне разовых доз от 1 × 10<sup>-8</sup> до 1 × 10<sup>-5</sup> г/мышь.

**Профилактическое и лечебное действие** МП-1 на рецидивирование опухолей в условиях операционного стресса оценивали на модели солидной нематастазирующей аденокарциномы молочной железы Са-755. Схема эксперимента включала подкожную перевивку мышам-самкам линии BDF<sub>1</sub> взвеси опухолевых клеток Са-755 по 50 мг/мышь. Далее в эксперимент отбирали мышей с опухолями среднего объема 700–900 мм<sup>3</sup>, которые удалялись под тиопенталовым наркозом. Отработывали две схемы эксперимента по рецидивированию: спонтанный рецидив (образование опухолевых узлов в месте операционной раны на 10-е сутки после удаления первичной опухоли у мышей) и искусственный рецидив - образование опухолевых узлов в результате повторной прививки (через 10–11 дней после удаления первичного узла) 50 мг/мышь клеток опухолевой взвеси Са-

755. С учетом этих схем были сформированы 6 групп мышей по 15–34 в каждой.

**Спонтанное рецидивирование.** На 10-е сутки после удаления первичной опухоли у мышей образовывались опухолевые узлы в месте операционной раны. МП-1 вводили подкожно в разовой дозе 1 × 10<sup>-8</sup> г/мышь ежедневно со 2-го по 11-й день после операции (схема 1) или 5 дней до и 5 дней после операции (схема 2) и через 10 дней контролировали на ощупь появление новых узлов. Контрольные группы мышей получали подкожные инъекции физиологического раствора со 2-го по 11-й день после удаления первичной опухоли.

**Искусственное рецидивирование** – повторная прививка клеток Са-755 на фоне введения МП-1. МП-1 вводили подкожно ежедневно в разовой дозе 1 × 10<sup>-8</sup> г/мышь по схеме 1 или 2 (см. выше). Через 7 дней после повторной прививки клеток Са-755 контролировали выход опухолевых узлов.

**Статистическую обработку данных** проводили с помощью пакета компьютерных программ STAT-GRAPH и пакета функций для статистической обработки программы Excel.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А. // Российский химический журнал. 2005. Т. XLIX. № 1. С. 55–63.
2. Mikhailova A.A., Fonina L.A., Kirilina E.A., Gur'yanov S.A., Efremov M.A., Petrov R.V. // Regulatory Peptides. 2003. V. 114. P. 183–187.
3. Mikhailova A.A., Fonina L.A., Kirilina E.A., Shanurin S.Yu., Gur'yanov S.A., Malakhov A.A., Nesmeyanov V.A., Petrov R.V. // Regulatory Peptides. 1994. V. 53. P. 203–209.
4. Шанурин С.Ю., Гурьянов С.А., Михайлова А.А. // Иммунология. 1993. № 2. С. 17–19.
5. Шанурин С.Ю. // Радиобиология. 1994. Т. 34. С. 4–5.
6. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Kirilina E.A. // Folia Biologica (Praha), 1994. № 40. P. 455–461.
7. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А. // Иммунология. 1998. № 4. С. 26–29.
8. Козлов А.М., Перетолчина Н.М., Киселев С.М., Сапрыкина Н.С., Михайлова Л.М. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 669–681.

## Synthesis and Anti-Tumor Properties of Mylopeptide MP-1

L. A. Fonina\*, E. M. Treshchalina\*\*\*, R. G. Belyovskaya\*, A. A. Az'muko\*\*, M. A. Efremov\*,  
L. A. Sedakova\*\*\*, and E. A. Kirilina\*,#

#Phone: (495) 330-72-56; e-mail: kirilinaelen@yandex.ru

\*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research and Production Association,  
Russian Agency of Public Health and Social Development

\*\*\*Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

We have studied anti-tumor properties of bone marrow derived peptide Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr (MP-1) synthesized by classical methods. It was shown that MP-1 enhanced the effect of cytostatic therapy of lymphatic leukemia P388 and increased latent growth period of P388 tumors implanted in irradiated mice. MP-1 also decreased metastasis of mouse breast adenocarcinoma Ca-755 after surgery.

*Keywords: mielo peptide MP-1, synthesis, anti-tumor activity, immunodepression.*