

На правах рукописи



**Чепанова Арина Александровна**

**Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в качестве  
сенситизаторов действия ингибитора топоизомеразы 1**

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

Новосибирск, 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научные руководители:**

**Лаврик Ольга Ивановна**, д.х.н., профессор, академик РАН  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, заведующая  
лабораторией биоорганической химии ферментов.

**Захаренко Александра Леонидовна**, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук, с.н.с.

**Официальные оппоненты:**

**Меркулова Татьяна Ивановна**, д.б.н., профессор, Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт  
цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», заведующая  
лабораторией регуляции экспрессии генов.

**Кирсанов Кирилл Игоревич**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.  
Н. Блохина» Минздрава России, заведующий лабораторией канцерогенных веществ.

**Дымова Майя Александровна**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук, с.н.с.

Защита состоится «2» декабря 2022 г. в 10:00

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика  
Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН

<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/events/defence/chepanova>

Автореферат разослан «02» ноября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент Коваль В.В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Онкологические заболевания представляют собой обширный класс заболеваний, включающий как доброкачественные, так и злокачественные новообразования. Злокачественные новообразования являются второй причиной смертности (после сердечно-сосудистых заболеваний) как в России, так и во всем мире, и входят в перечень социально значимых заболеваний, определенных постановлением Правительства РФ [1]. Снижение смертности — ключевая цель борьбы с онкологическими заболеваниями. Для этого предлагаются различные стратегии улучшения терапии онкологических заболеваний. Одной из таких стратегий является поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК. Повреждающие ДНК препараты и ионизирующее излучение применяют во многих схемах лечения различных онкозаболеваний. Однако, активная работа системы репарации ДНК может обуславливать устойчивость раковых клеток к химио- и радиотерапии [2–4], поэтому селективное воздействие, направленное на ингибирование ферментов репарации ДНК, может быть основой как монотерапии, так и эффективной сопровождающей терапии [4–9].

Одной из перспективных мишеней – белков репарации ДНК является тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент, препятствующий накоплению ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 (Top1) с ДНК за счет гидролиза 3'-фосфотирозильной связи [10].

Топоизомераза 1 – фермент, отвечающий за изменение топологии ДНК во время репарации, репликации, транскрипции и сегрегации хромосом. Ферментативная активность Top1 включает в себя образование одноцепочечного разрыва ДНК, который позволяет 5'-концу ДНК в разрыве вращаться вокруг неповрежденной цепи, тем самым снимая суперспирализацию ДНК. При этом фермент образует ковалентный комплекс с 3'-концом ДНК [11]. Затем Top1 катализирует лигирование концов ДНК и высвобождается из комплекса. Ингибиторы Top1 стабилизируют промежуточный ковалентный комплекс Top1-ДНК. Невозможность восстановить структуру ДНК приводит к образованию одноцепочечных разрывов, которые могут превратиться в более токсичные двуцепочечные, что приведет к клеточной гибели. На данный момент два производных камптотецина (СРТ), топотекан и иринотекан, стабилизирующие комплекс Top1-ДНК, применяются в клинической практике для лечения ряда онкологических заболеваний [12,13].

Tdp1 расщепляет 3'-фосфодиэфирную связь между остатком Top1 и 3'-концом ДНК, а также удаляет другие повреждения с 3'-конца ДНК [14,15]. Таким образом, Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, которые являются достаточно эффективными противораковыми препаратами [7,12,16], и является возможной причиной лекарственной устойчивости некоторых видов рака [2,17–19]. Следовательно, применение ингибиторов Tdp1 может увеличить эффективность терапии и/или снизить число и интенсивность побочных эффектов традиционных препаратов.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является поиск ингибиторов Tdp1 среди производных природных биологически активных веществ и изучение их способности сенсibilизировать опухоли к действию ингибитора Top1 топотекана – противоопухолевого препарата, используемого в клинике. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести скрининг ингибиторной активности производных хрома, адамантана и усниновой кислоты в отношении Tdp1 и определить значения концентраций полумаксимального ингибирования для соединений.
2. Изучить цитотоксичность наиболее активных соединений – ингибиторов Tdp1 в отношении ряда перевиваемых линий клеток, представляющих клеточные модели различных видов рака.
3. Проанализировать влияние нетоксичной концентрации наиболее активных ингибиторов Tdp1 на цитотоксический эффект топотекана – способность

сенсibilизировать действие топотекана в отношении ряда перевиваемых линий опухолевых клеток.

4. Оценить уровень повреждения ДНК под действием наиболее эффективных сенсibilизаторов отдельно и в комбинации с топотеканом методом ДНК-комет в щелочных условиях.
5. Изучить проапоптотическое влияние ингибиторов Tdp1 – лидеров отдельно и в комбинации с топотеканом методом проточной цитометрии.
6. Исследовать влияние соединения – лидера на рост карциномы Льюис мышей в виде монопрепарата и в комбинации с топотеканом.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.** В рамках данной работы в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены соединения на основе природных биологически активных веществ. Исходные соединения обладают широким диапазоном биологической активности и имеют доступную сырьевую базу, однако нативные соединения не подавляют активность Tdp1 [20], поэтому, чтобы улучшить их ингибиторные характеристики в отношении Tdp1, были выполнены различные модификации исходных соединений. Впервые в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены производные хромена, адамантана, а также цианопроизводные усниновой ксилоты (УК), фураноновые и гидразонотиазольные производные УК с различными заместителями. Было показано, что многие соединения среди изученных классов обладают высокой ингибирующей активностью в отношении Tdp1. Так, производные хромена, адамантана и цианопроизводные УК подавляют активность Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций (величины  $IC_{50}$  0,64–15 мкМ), а фураноновые и гидразонотиазольные производные УК ингибируют Tdp1 в наномолярных концентрациях (значения  $IC_{50}$  от 10 нМ).

В данной работе также была изучена цитотоксичность наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. Было показано, что соединения на основе хромена, адамантана и УК обладают умеренной цитотоксичностью или нетоксичны, что позволило выбрать нетоксичные концентрации ингибиторов для изучения их влияния на цитотоксический эффект топотекана. Наиболее эффективными сенсibilизаторами опухолевых клеток к действию топотекана оказались гидразонотиазольные производные УК. Было показано, что соединения **9e** и **20d** усиливают действие топотекана в 4,7 и 7,5 раз, соответственно.

Впервые методом ДНК-комет было показано увеличение количества повреждений ДНК при совместном использовании соединений **9e** или **20d** с топотеканом, при сравнении с применением только топотекана. При этом сами по себе соединения не вызывали накопления повреждений ДНК. Это может косвенно указывать на то, что молекулярной мишенью исследуемых соединений в живой клетке является Tdp1.

В данной работе методом проточной цитометрии показано, что соединение **20d** при совместном использовании с топотеканом увеличивает количество апоптотических клеток, что позволяет использовать топотекан в более низких концентрациях.

Впервые было показано, что ингибитор Tdp1 на основе УК **20d** в комбинации с топотеканом усиливает антиметастатический эффект последнего *in vivo* на модели карциномы Льюис мышей.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Производные природных биологически активных веществ на основе хромена, адамантана и усниновой кислоты (УК) подавляют активность Tdp1. Наиболее эффективными ингибиторами являются производные усниновой кислоты.
2. Изученные соединения на основе хромена, адамантана и усниновой кислоты являются нетоксичными или умеренно токсичными в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток, а также некоторые из этих производных значительно усиливают цитотоксическое действие топотекана.

3. Гидразонотиазольные производные УК **9e** и **20d** усиливают накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, и про-апоптотический эффект топотекана.
4. Производное УК **20d** усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана *in vivo*.

**Вклад автора.** Автором были получены данные об ингибиторной активности производных хромена, адамантана и УК в отношении Tdp1, исследована собственная цитотоксичность соединений и их влияние на цитотоксический эффект топотекана. Автором получены данные о влиянии соединений на накопление повреждений ДНК и проапоптотический эффект топотекана. Автор участвовал в исследовании соединений *in vivo* и в обработке, оформлении и апробации полученных результатов.

Производные хромена, адамантана и УК были синтезированы и любезно предоставлены сотрудниками Отдела медицинской химии НИОХ СО РАН.

Биосенсор для изучения активности Tdp1 был разработан в Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН Рашидом Октамовичем Анарбаевым и синтезирован в Лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН.

Молекулярное моделирование связывания соединений с Tdp1 было выполнено Jóhannes Reynisson (Университет Окленда, Новая Зеландия) и Лихацкой Галиной Николаевной (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН).

Клеточные работы были выполнены под руководством Ольги Дмитриевны Захаровой (ИХБФМ СО РАН).

Исследования сенсibiliзирующего эффекта производных УК *in vivo* были выполнены совместно с группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны.

Благодарность за помощь в постановке метода ДНК-комет Чернышовой Ирине Алексеевне.

Благодарность за помощь в обсуждении результатов, полученных *in vivo*, Корниенко Татьяне Евгеньевне.

#### **Апробация и публикация результатов.**

По результатам исследования опубликовано 14 работ, из них 8 статей в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК и 6 тезисов конференций (докладчик – А.А.Чепанова).

#### **Структура и объём диссертации.**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка используемой литературы и приложения. Работа (без приложения) изложена на 154 страницах, включает 53 рисунка и 9 таблиц. Список литературы содержит 244 литературных источника. Приложение на 32 страницах включает 9 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Исследование влияния производных биологически активных соединений на активность Tdp1 *in vitro***

В ходе нашей работы были получены данные об ингибиторной активности в отношении очищенного фермента Tdp1 для 140 производных хромена, адамантана и производных усниновой кислоты (УК), относящихся к подклассам цианопроизводных УК, арилиденфураноновых и гидразонотиазольных производных УК. Все использованные в работе соединения были синтезированы сотрудниками НИОХ СО РАН.

Для изучения ингибирующей способности соединений в отношении очищенного рекомбинантного фермента Tdp1 была использована тест-система, основанная на способности Tdp1 удалять различные аддукты, в том числе флуорофоры, с 3'-конца ДНК [21–23]. В качестве субстрата для Tdp1 был использован 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на

3'-конце ДНК и флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце ДНК. В результате удаления ВНQ1 с 3'-конца ДНК за счет активности Tdp1 интенсивность флуоресценции (5,6)-FAM на 5'-конце растёт, что даёт возможность детектировать её с помощью флуориметра. Интенсивность флуоресценции напрямую связана с количеством отщепленного тушителя, которое в свою очередь связано со скоростью реакции. Таким образом, можно определять активность Tdp1 в режиме реального времени [24]. Реакция отщепления ВНQ1, катализируемая Tdp1, проводилась при добавлении различных концентраций изучаемых ингибиторов, растворённых в ДМСО. Эффективность ингибиторов в отношении очищенного фермента Tdp1 оценивали с помощью расчёта концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ).

Параметр ( $IC_{50}$ ) рассчитывался следующим образом:

1 Определяли начальную скорость ферментативной реакции как тангенс угла наклона линейного участка кинетических кривых при различных концентрациях ингибиторов (Рис. 1А)

2 Из построенного графика зависимости начальной скорости реакции от используемой концентрации ингибитора находили значение  $IC_{50}$  (Рис. 1Б)

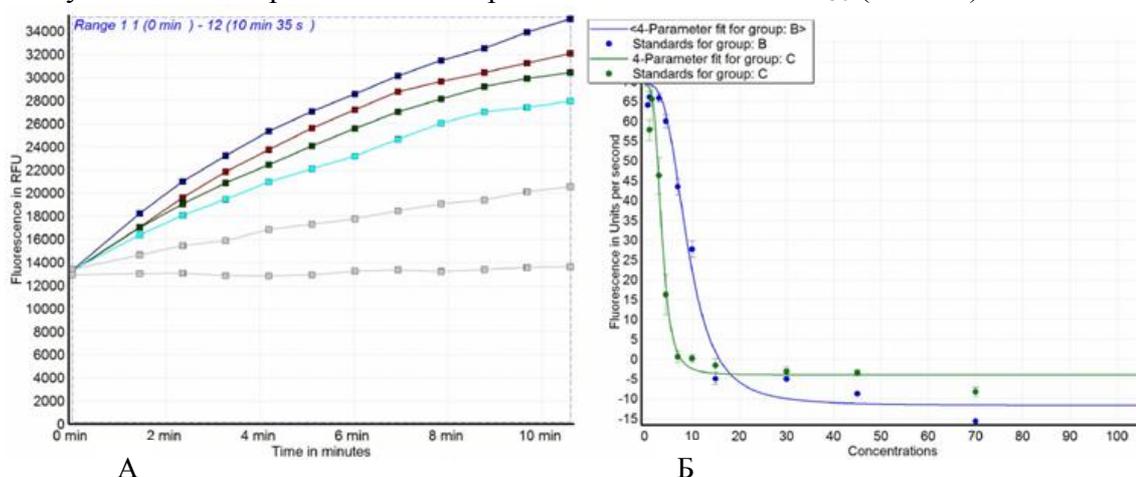


Рис. 1. Вид полученных графиков: (А) – типичный вид кинетических кривых, полученных при различных концентрациях ингибитора; (Б) – типичные кривые зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора OL7-43(зеленый), OL9-9 (синий).

### Производные хромена

Октагидро-2Н-хромен представляет собой кислородсодержащий гетероцикл с тетрагидропирановой составляющей. Соединения, содержащие хроменовый остов, обладают широким спектром биологической активности и вариативностью модификации [25,26].

Была изучена ингибирующая активность амидных производных октагидрохромена (Была изучена ингибирующая активность амидных производных октагидрохромена (Рис. 2). Показано, что диастериомеры **8(S)(R)** с нитро- и **9(S)(R)** амино- группами не обладают ингибирующей активностью в отношении Tdp1 ( $IC_{50} > 15$ ). Большей активностью обладают производные **10(S)(R)** с метильной и **12(S)(R)** фенильной группами, значения  $IC_{50}$  находятся в диапазоне 2,9-5,8 мкМ. Наиболее высокую ингибирующую активность показали соединения с **11(S)(R)** трифторметилом и **13(S)(R)** адамантановым фрагментом, значения  $IC_{50}$  находятся в диапазоне 1,24-4 мкМ. Абсолютная конфигурация С4-стереоцентра и заместители в амидной группе не оказали существенного влияния на величину  $IC_{50}$ . Нафтальные производные октагидрохромена (соединения **4If**, **4Ie**, рис. 2) проявляли сравнимую ингибирующую активность в отношении Tdp1 с  $IC_{50}$  около 2,0 мкМ. Ни конфигурация гидроксильной группы в положении С-4, ни место присоединения карбоксильной группы к нафталиновому остову существенно не влияют на активность этих соединений.

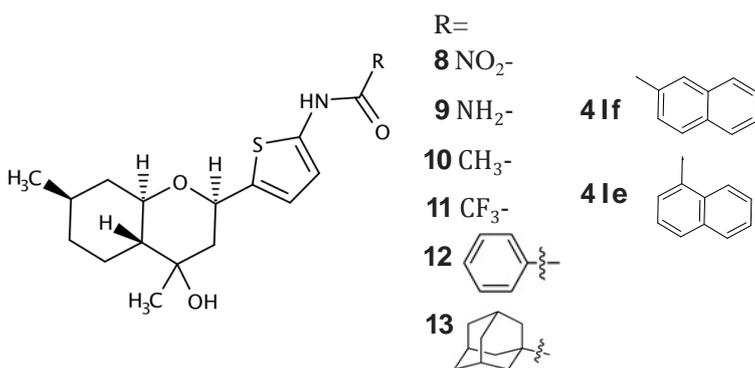


Рис. 2. Структурные формулы производных октагидро-2H-хромена.

МТТ тест показал, что производные хромена не токсичны для клеток линии А-549 во всем диапазоне исследуемых концентраций (до 100 мкМ), за исключением **4R If** (CC<sub>50</sub> 20 мкМ), но не оказали сенсibiliзирующего влияния на цитотоксический эффект топотекана (Рис. 3.).

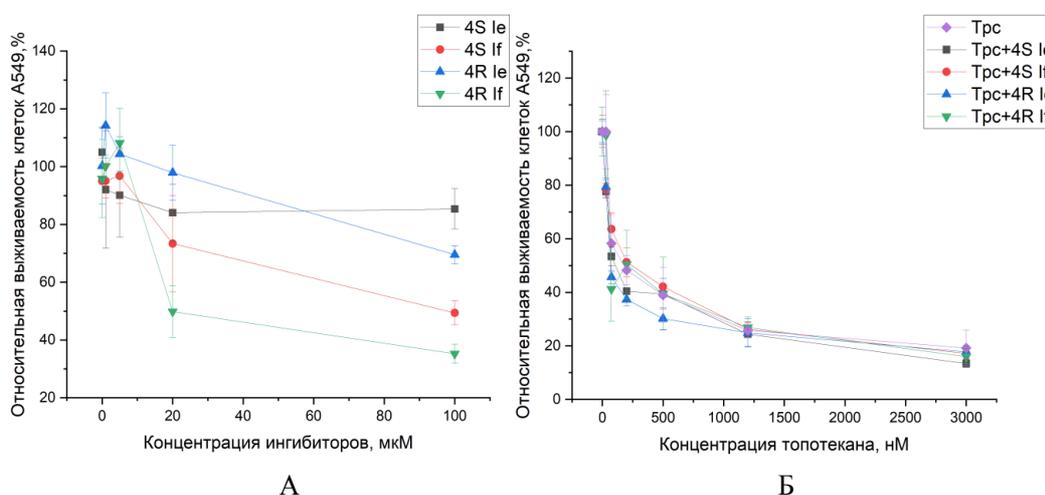


Рис. 3. Влияние производных хромена на выживаемость перевиваемых линий опухолевых клеток и на цитотоксический эффект топотекана. (А) Дозозависимое влияние производных хромена на выживаемость клеток А-549 (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с производными хромена на выживаемость клеток А-549.

Таким образом несмотря на то, что соединения на основе хромена подавляли активность Tdp1 в микромолярном диапазоне и были не токсичны в отношении клеток А-549, они не оказали сенсibiliзирующего влияния на цитотоксический эффект топотекана. Поэтому дальнейшие исследования этих соединений как сенсibiliзаторов действия топотекана были нецелесообразны.

### Производные адамантана

Производные адамантана находят широкое применение в медицинской химии и клинической практике. Изучение их биологической активности и фармакологических свойств показало наличие среди них соединений, обладающих выраженной нейротропной, психотропной, антикаталептической, антипаркинсонической, антибактериальной, противовирусной и противоопухолевой активностями [27].

Изученные производные 2-адамантанкарбоновой кислоты оказались более активными по сравнению с соединениями, полученными из 1-адамантанкарбоновой кислоты. Так среди 1-адамантанзамещенных производных амиды были неактивны в отношении Tdp1, тогда как 2-адамантанзамещенные амиды ингибировали Tdp1 при 5,2 и 2,5 мкМ. При сравнении активности амидов и тиоамидов показано, что замена атома кислорода на серу приводит к повышению активности соединений в отношении Tdp1, значения IC<sub>50</sub> составляют 5,2 мкМ для амида и 0,64 мкМ для тиоамида.

Исследование цитотоксичности адамантановых производных с амидной и тиоамидной группами показало, что эти соединения являются малотоксичными в отношении перевиваемой опухолевой линии А-549 ( $CC_{50} > 80$  мкМ) (Рис. 4А).

Большинство соединений обладали слабым сенсibiliзирующим эффектом, либо сенсibiliзирующий эффект отсутствовал вовсе. Наиболее выраженный сенсibiliзирующий эффект показало соединение **46a** (Рис. 4Б), тиоамид 2-аминоадамантана, которое в нетоксичной концентрации 5 мкМ значительно усиливало действие топотекана на клетки линии А-549.

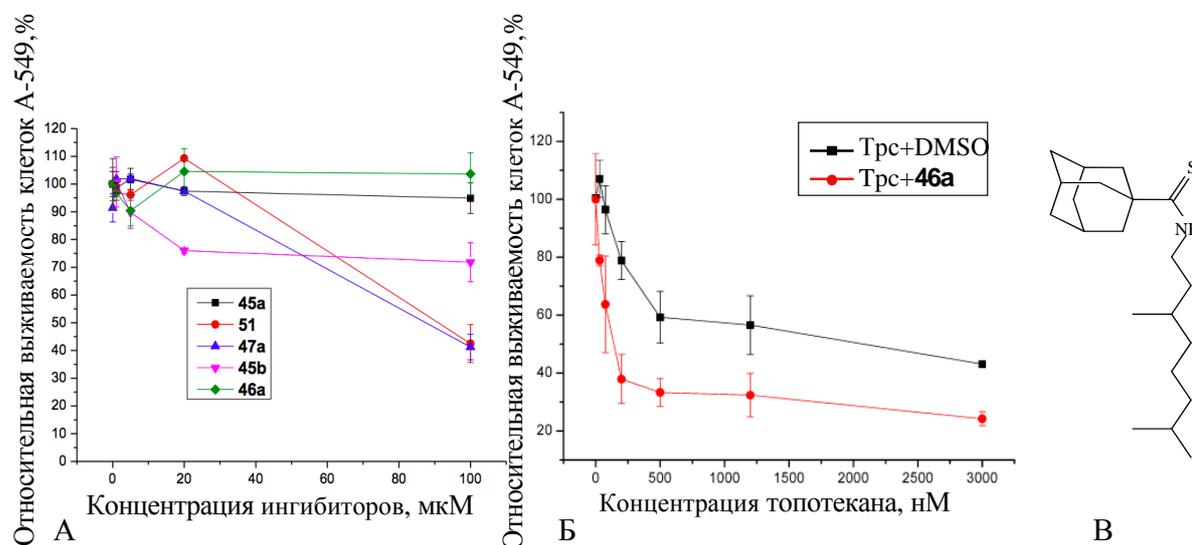


Рис. 4. Влияние производных адамантана на выживаемость клеток линии А-549 и на цитотоксический эффект топотекана. (А) Дозозависимое влияние производных адамантана на выживаемость клеток А-549. (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с производным адамантана **46a** на выживаемость клеток А-549. (В) Структурная формула соединения **46a**.

Таким образом, было показано, что тиоамиды более активны в отношении Tdp1, чем их амидные аналоги; 2-адамантанзамещенные производные более активны по сравнению с 1-адамантанзамещенными изомерами. Также все эти соединения демонстрируют низкую собственную цитотоксичность в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток, и соединение **46a** способно усиливать действие топотекана *in vitro*. Несмотря на это, данный класс соединений значительно менее активен в отношении Tdp1 по сравнению с изученными далее производными УК, поэтому в дальнейшей работе производные адамантана не использовались.

### Производные усниновой кислоты

Усниновая кислота (УК) – это вторичный метаболит различных видов лишайников, обладающий широким диапазоном биологической активности (противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой и т.д.). УК является липофильной слабой кислотой, способной диффундировать через биологические мембраны [20].

### Цианопроизводные усниновой кислоты

Нами были протестированы производные УК, содержащие цианогруппы. Показано, что введение цианогрупп заметно повышает ингибиторную активность соединений ( $IC_{50}$  10–15 мкМ) по сравнению с исходной УК (**UA**) ( $IC_{50} > 50$  мкМ). Наибольшее влияние на ингибиторные характеристики соединений оказали модификации остова УК наряду с введением цианогрупп (Рис. 5). Так, фураноновое производное УК (**MR-150-3**) ингибирует Tdp1 в микромолярном диапазоне ( $IC_{50}$  11 мкМ), а присоединение к этому соединению двух цианогрупп (**OL8-44**) приводит к значительному улучшению ингибиторной активности ( $IC_{50}$  1,6 мкМ). Наличие пиразольного цикла (**OL7-43**), связанного с кольцом С, наряду с двумя цианогруппами в кольце А также повышает

ингибиторную активность ( $IC_{50}$  2,86 мкМ) по сравнению производным **MR-137-1** с двумя цианогруппами, но без пиразольного цикла ( $IC_{50}$  15,6 мкМ).

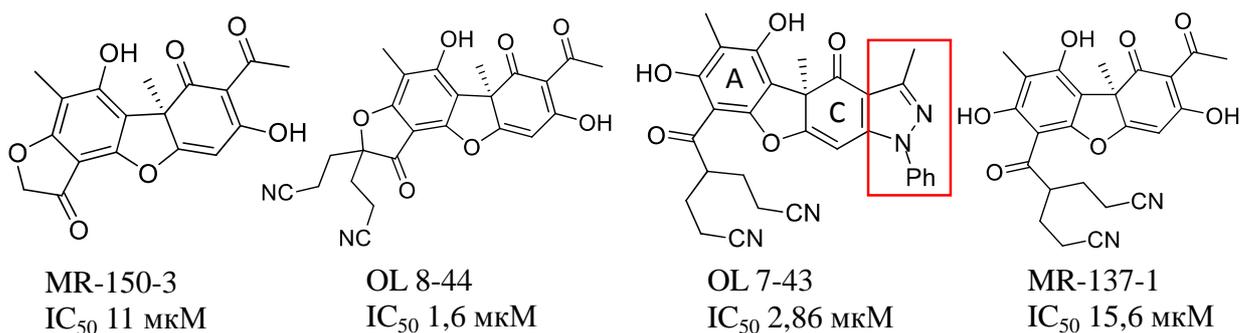


Рис. 5. Структуры цианопроизводных УК **MR-150-3**, **OL8-44**, **OL7-43**, красной рамкой обозначен остаток пиразольного цикла, связанного с кольцом С УК, **MR-137-1**.

Далее нами была изучена цитотоксичность соединений, активных в отношении очищенного фермента Tdp1. Анализ цитотоксичности цианопроизводных УК проводили на линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Рис. 6).

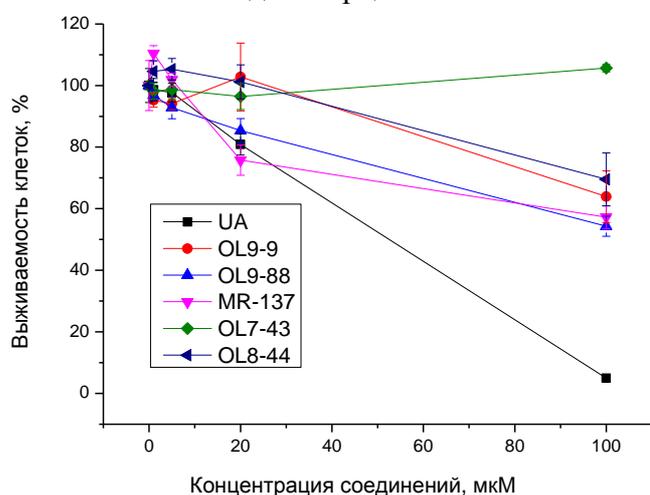


Рис. 6. Дозозависимое влияние цианопроизводных производных УК на выживаемость клеток линии MCF-7.

Наиболее токсичной оказалась исходная УК ( $CC_{50} \sim 55$  мкМ). Остальные изученные соединения были значительно менее токсичными. Наибольший эффект снижения токсичности обеспечивает пиразольный фрагмент в кольце С соединения **OL7-43** (токсичность отсутствует во всём диапазоне исследованных концентраций до 100 мкМ). Несмотря на это данный класс соединений оказался значительно менее активен в отношении Tdp1 по сравнению с изученными далее производными УК, поэтому в дальнейшей работе цианопроизводные УК не использовались.

### Арилиденфураноновые производные УК

Эти производные УК продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 в субмикромольной и наномольной концентрации. Соединения, содержащие незамещенный фенильный или тиофеновый остаток, продемонстрировали субмикромольную активность ( $IC_{50}$  0,72; 0,9 мкМ). Введение атома брома как в различные положения фенильного остатка соединения, так и в тиофеновый остаток привело к увеличению ингибиторной активности бромсодержащих соединений ( $IC_{50}$  0,063 - 0,23 мкМ). Наиболее эффективным ингибитором Tdp1 из этой серии производных УК было соединение **6m** (Рис. 7) (значение  $IC_{50}$  25 нМ), содержащее крупный 3,5-ди-*tert*-бутил-2-гидроксифенильный заместитель.

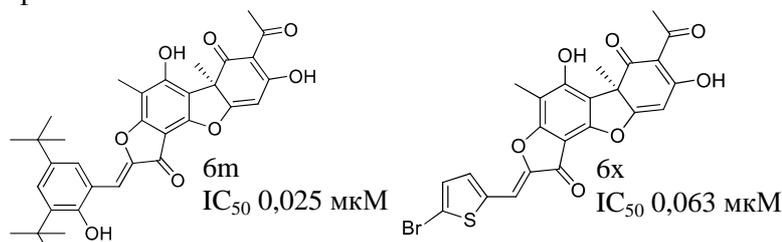


Рис. 7. Структурные формулы соединений **6m**, **6x**.

Далее мы изучили цитотоксичность соединений на клетках аденокарциномы легкого человека А-549 (Рис. 8А) и линии клеток из почек эмбриона НЕК-293 (Рис. 8Б). На Рис. 8. приведены данные для наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 **6m** и **6x**. Соединения оказались умеренно токсичными для клеток (значения  $CC_{50}$  в диапазоне от 4,6 до 20 мкМ).

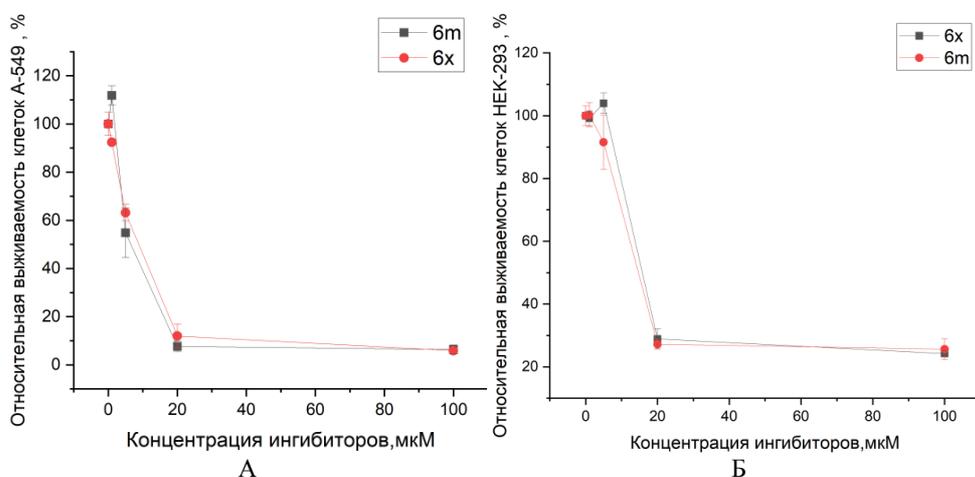


Рис. 8. Влияние фураноновых производных УК на выживаемость клеточных линий (А) А-549 и (Б) НЕК-293.

Основываясь на полученных данных о цитотоксичности соединений, была выбрана нетоксичная концентрация ингибиторов (1 мкМ) для изучения их влияния на цитотоксический эффект топотекана. Наиболее эффективное в отношении очищенного фермента Tdp1 соединение **6m** не влияло на цитотоксичность топотекана (Рис. 9А). Арилиденфураноновое производное УК **6x** приблизительно в два раза усиливает цитотоксичность топотекана в отношении как А-549, так и НЕК-293 (Рис. 9А,Б).

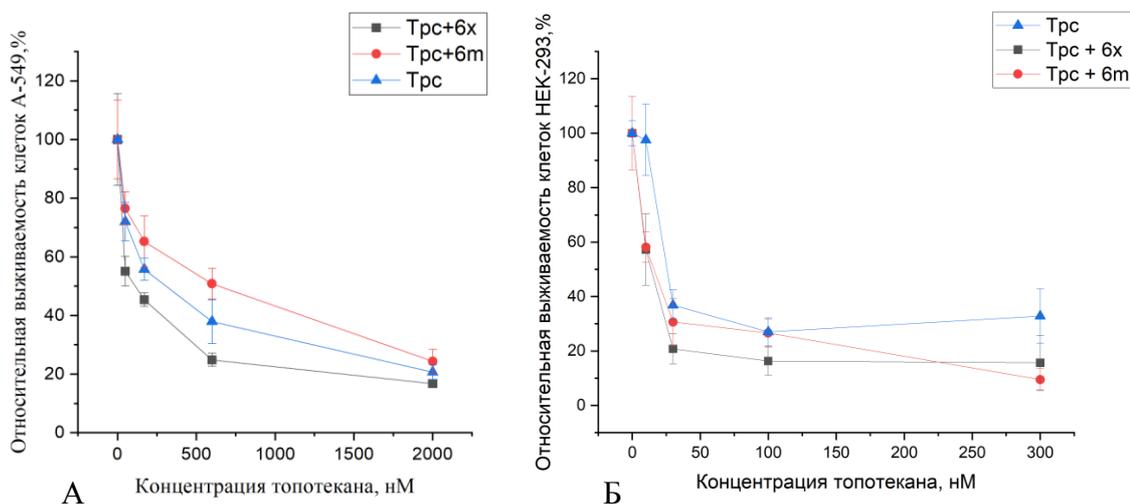


Рис. 9. Влияние арилиденфураноновых производных УК на цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточных линий (А) А-549 и (Б) НЕК-293.

Таким образом, среди фураноновых производных УК наиболее перспективным соединением оказалось **6x**, которое является эффективным ингибитором Tdp1, обладает умеренной цитотоксичностью и в нетоксичной концентрации усиливает цитотоксическое действие топотекана. Однако арилиденфураноновые производные УК, несмотря на свою эффективность, плохо растворялись в системе вода-ДМСО, что затрудняет их применение, поэтому дальнейшего развития данный класс соединений не получил.

### Тиазольные, аминотиазольные и гидразонотиазольные производные УК

Соединения, содержащие тиазольный или аминотиазольный фрагмент и объемный заместитель в тиазольном фрагменте (Рис. 10), **18a-c** и **19a-d**, продемонстрировали ингибирование Tdp1 в низком микромолярном диапазоне концентраций ( $IC_{50}$  около 1 мкМ). Наличие или отсутствие аминогруппы между тиазольным фрагментом и объемным заместителем не повлияло на ингибиторные характеристики соединений. Важнее оказалось наличие объемного заместителя в тиазольном кольце, так как его отсутствие приводило к снижению ингибиторной активности: значения  $IC_{50}$  увеличивались с ~1 мкМ до ~5 мкМ.

Рис. 10. Общие структурные формулы серии соединений **18a-c**, **19a-d** и **20a-i**



18a R=Me	19a R=NH <sub>2</sub>	20a R=H	20e R=4-OH
18b R=Ph	19b R=NHMe	20b R=4-F	20f R=4-OMe
18c R=3-Py	19c R=NHPh	20c R=4-Cl	20g R=3-OMe
	19d R=NHAlI	20d R=4-Br	20h R=4-NO <sub>2</sub>
			20i R=3-NO <sub>2</sub>

### Арилиденгидразонотиазольные производные УК

Значительно более активными, по сравнению с соединениями, содержащими тиазольный или аминотиазольный фрагмент, в отношении Tdp1 были соединения **20a-i** (Рис. 10), содержащие тиазольный цикл с арилгидразоновым заместителем (значения  $IC_{50}$  от 26 до 450 нМ). Среди соединений **20a-i** наибольшей активностью обладают *para*-замещенные производные с бром- (**20d**) (значение  $IC_{50}$  26 нМ) и нитрозаместителем (**20h**) (значение  $IC_{50}$  35 нМ). Для соединения **20d**, проявившего высокую ингибирующую активность в тесте *in vitro* на очищенном ферменте, было проведено исследование цитотоксичности на ряде опухолевых клеточных линий НСТ-116, МСF-7, А-549, в качестве примера на рисунке 11А приведены данные, полученные на линии А-549, и выбрана нетоксичная концентрация (1 мкМ) этого соединения для изучения его влияния на цитотоксический эффект топотекана.

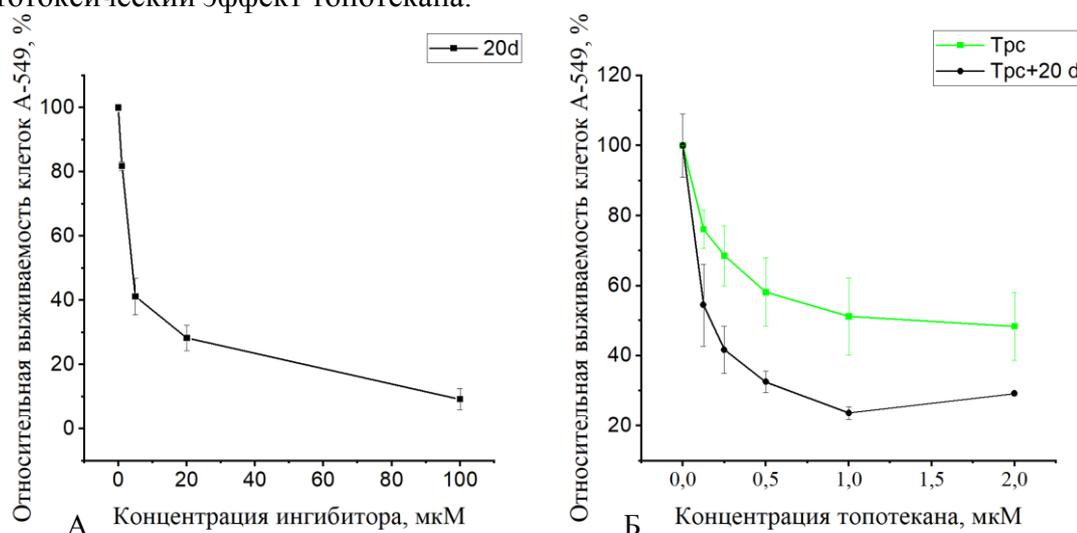


Рис. 11. Дозозависимое влияние производного УК **20d** на выживаемость перевиваемых линий опухолевых клеток и на цитотоксический эффект топотекана.

Соединение **20d** оказалось достаточно токсично в отношении изученных клеточных линий (диапазон значений  $CC_{50}$  3,9 – 9,3 мкМ), но при этом в нетоксичной концентрации усиливало эффект топотекана примерно в 7,5 раз для всех изученных линий опухолевых клеток, в качестве примера на рисунке 11Б приведены данные полученные на линии А-549.

Суммируя данные об ингибирующем действии и токсичности производного УК **20d**, его можно рассматривать как наиболее перспективный для дальнейшего изучения ингибитор Tdp1, так как он подавляет активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций и демонстрирует выраженный сенсibiliзирующий эффект действия топотекана в отношении опухолевых линий.

### Гетарилиденгидразонотиазольные производные УК

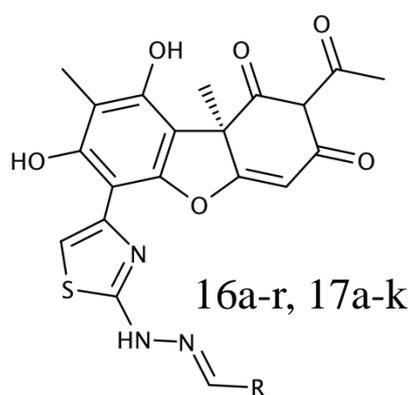


Рис. 12. Общая структурная формула соединений **16a-r** и **17a-k**.

Среди гидразонотиазольных производных УК с гетероарилиденовым фрагментом **16a-16r** (Рис. 12) были обнаружены высокоэффективные ингибиторы Tdp1 (значения  $IC_{50}$  0,021-0,2 мкМ). Соединения, содержащие протонированный атом азота, оказались несколько худшими ингибиторами Tdp1 со значениями  $IC_{50}$  0,16 – 1,7 мкМ.

Также в этой серии были изучены соединения с удлиненными заместителями в арилиденгидразоновом фрагменте (**17a-17k**). Этот ряд соединений продемонстрировал высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 (значения  $IC_{50}$  0,018-0,12 мкМ).

Далее была изучена цитотоксичность наиболее эффективных гетарилиденгидразонотиазольных производных УК в отношении клеточных линий HeLa (Рис. 13А) и А-549. Производные УК с арилиденом обладают низкой цитотоксичностью ( $CC_{50} > 50$  мкМ). Гетероарилиденовые производные УК (+)- и (-)-**16f**, содержащие остаток бромтиофена, также обладают низкой цитотоксичностью ( $CC_{50} \sim 80$  мкМ), в то время как пара (+)(-)**16d**, содержащая нитрогруппу, подавляла рост клеток при концентрации 20 мкМ. На основании этих данных была выбрана концентрация 5 мкМ для исследования влияния соединений на цитотоксический эффект топотекана. Гетарилиденгидразонотиазольные производные увеличивали цитотоксический эффект топотекана примерно в 2–3 раза (Рис. 13Б), то есть, значения  $CC_{50}$  топотекана снижались с 6 мкМ до 2–3 мкМ.

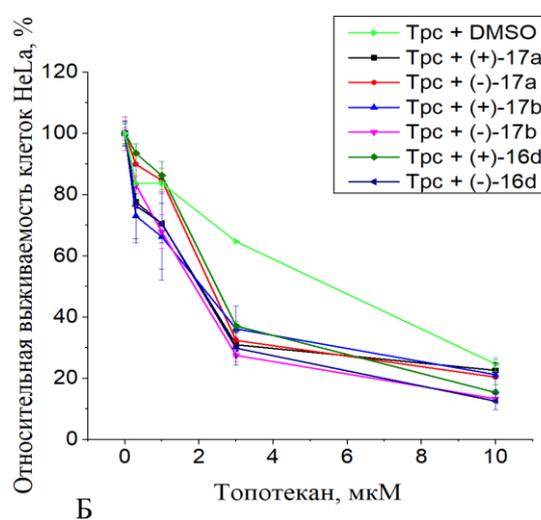
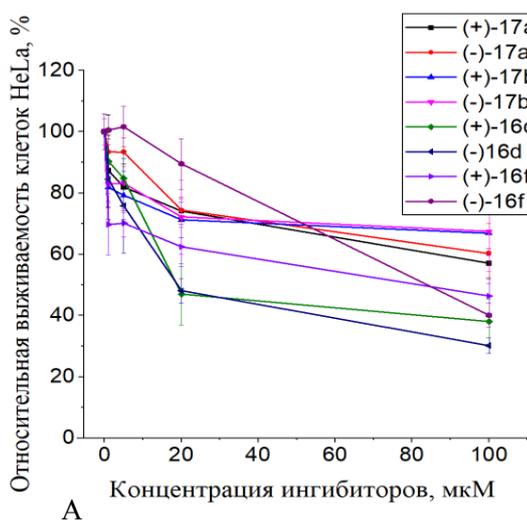


Рис. 13. (А) Дозозависимое влияние гидразонотиазольных производных УК на выживаемость клеток HeLa. (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с гидразонотиазольными производными УК на выживаемость клеток HeLa.

Таким образом, большинство из изученных производных УК, содержащих гетарилиденогидразонотиазольный фрагмент, являются высокоэффективными ингибиторами Tdp1 с величинами  $IC_{50}$  в низком наномолярном диапазоне концентраций, обладают низкой или умеренной токсичностью и усиливают цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточной линии HeLa. Исходные вещества для синтеза соединений этого подкласса гетарилиденовых производных УК коммерчески недоступны, были получены от другого коллектива и требовали дополнительных стадий синтеза, что приводило к уменьшению выхода и удорожанию синтеза, поэтому в дальнейшей работе они не использовались.

#### Терпеногидразонотиазольные производные УК

Далее были изучены производные УК, содержащие монотерпеновые фрагменты, присоединенные через гидразонотиазольный линкер (Рис. 14).

Производные УК с фрагментами монотерпеноидов (**9a-9h**) продемонстрировали высокую ингибирующую активность: значения  $IC_{50}$  в диапазоне 0,01 – 0,14 мкМ. Производные с бициклическими заместителями **9f-h** имели в 3-5 раз более высокие значения  $IC_{50}$  (45-31 нМ), чем соединения с ациклическими заместителями **9a, 9b** (значения  $IC_{50}$  10,3 и 16,4 нМ, соответственно). Введение полярной гидроксильной группы в цитронеллиловый остаток (**9c** по сравнению с **9b**) приводило к значительному снижению активности соединений (значения  $IC_{50}$  139 и 16 нМ соответственно).

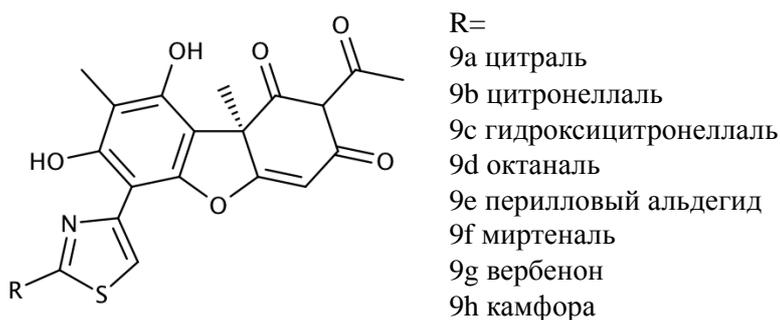


Рис 14. Общая структурная формула производных УК, содержащих монотерпеновые фрагменты.

Была изучена цитотоксичность гидразонотиазольных производных УК с монотерпеновыми фрагментами в отношении клеточных линий карциномы шейки матки HeLa, рака легких A-549, глиобластомы человека T98G. Наиболее токсичными в отношении трех клеточных линий оказались соединения **9g** и **9h**. Соединение **9f**, содержащее остаток миртеналя, наоборот, оказалось не токсичным во всем диапазоне изученных концентраций (до 100 мкМ). Для клеточной линии HeLa производные УК, за исключением **9g, 9h** и **9f**, были умеренно токсичны (значения  $CC_{50}$  от 33 до 77 мкМ) (Рис. 15А). Далее была изучена способность соединений сенсibilизировать действие топотекана. Для этого были использованы нетоксичные концентрации ингибиторов Tdp1 (5 мкМ) и различные концентрации топотекана. Наиболее эффективными сенсibilизаторами клеток к действию топотекана оказались соединения **9b** и **9e** (Рис. 15Б).

Таким образом, производные УК, содержащие монотерпеновые фрагменты, подавляют активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций. Многие производные были слабо или умеренно токсичны для исследуемых клеток, и в разы усиливали цитотоксичность топотекана.

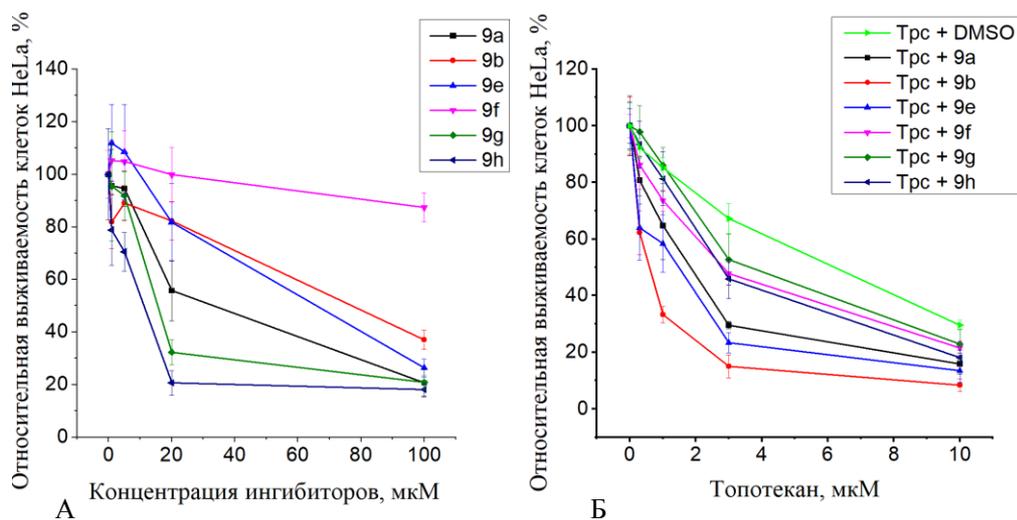


Рис. 15. (А) Дозозависимое влияние гидразинотиазольных производных УК на выживаемость клеток HeLa. (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с гидразинотиазольными производными УК на выживаемость клеток HeLa.

Среди всех изученных производных УК гидразинотиазольные производные УК показали себя наиболее эффективными ингибиторами Tdp1. Эти соединения подавляют активность Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций и на сегодняшний день являются наиболее эффективными ингибиторами Tdp1 в мире.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что модификации молекул исходных биологически активных веществ приводят к заметному усилению ингибирующего воздействия соединений на очищенный фермент. Многие изученные соединения показали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1. Однако производные хромена и адамантана не оказали сенсibiliзирующего влияния на цитотоксический эффект топотекана, поэтому дальнейшие исследования этих соединений в качестве сенсibiliзаторов нецелесообразны. Арилиденфураноновые производные УК, несмотря на свою эффективность, плохо растворялись в системе вода-ДМСО, что затрудняет их применение. Соединения класса гидразинотиазольных производных УК показали себя наиболее эффективными ингибиторами, подавляющими активность Tdp1 в наномолярных концентрациях.

Среди класса гидразинотиазольных производных УК было выбрано два соединения для дальнейшего изучения: **20d** и **9e**. *Para*-бромзамещенное соединение **20d** ингибирует Tdp1 со значением  $IC_{50}$  26 нМ, обладает умеренной цитотоксичностью в отношении различных перевиваемых опухолевых линий и способно в нетоксичных концентрациях в 7 раз усиливать цитотоксический эффект топотекана. Соединение **9e**, содержащее остаток периллового альдегида, ингибирует Tdp1 со значением  $IC_{50}$  27 нМ. Это соединение обладает умеренной цитотоксичностью и в нетоксичных концентрациях усиливает действие топотекана в 4,4 раза, для клеточной линии HeLa. Данное соединение менее эффективно по сравнению с соединением **9b** ( $IC_{50}$  16 нМ), содержащим остаток цитронеллала, которое усиливает действие топотекана в 9,7 раз. Выбор соединения **9e** обусловлен тем, что соединение **9b** является смесью диастереомеров, что осложняет интерпретацию данных о его биологической активности и возможное дальнейшее продвижение этого соединения в качестве терапевтического агента.

## 2. Исследование влияния производных УК на накопление повреждений ДНК методом Alkaline Comet assay

Для изучения влияния производных УК на накопление повреждений ДНК под действием топотекана было выбрано два соединения-лидера: **20d** и **9e**. Оба соединения эффективно подавляют активность Tdp1 и являются производными модифицированной по А-кольцу УК, содержащими тиазольный цикл и гидразоновый линкер.

Нами было показано, что оба производных УК сами по себе незначительно увеличивают количество поврежденной ДНК, по сравнению с контрольной группой клеток. При этом соединение **9e** не влияет на количество повреждений ДНК в концентрациях до 100 мкМ.

В случае совместного применения топотекана и ингибиторов Tdp1 на основе УК **9e** и **20d** количество поврежденной ДНК значимо росло по сравнению с применением одного топотекана с 14% до 28% для соединения **20d**, и с 36% до 60% - для соединения **9e** (Рис. 16). При этом для соединения **9e** наблюдалась концентрационная зависимость. Количество повреждений ДНК, вызванное совместным применением топотекана с **9e**, увеличивалось с 55% до 60% при увеличении концентрации **9e** с 5 мкМ до 20 мкМ. Для соединения **20d** при совместном применении с топотеканом концентрационной зависимости не наблюдалось. Количество повреждений ДНК, вызванное совместным применением топотекана с **20d**, было выше при использовании **20d** в концентрации 5 мкМ (28%), чем при использовании **20d** в концентрации 20 мкМ (25%).

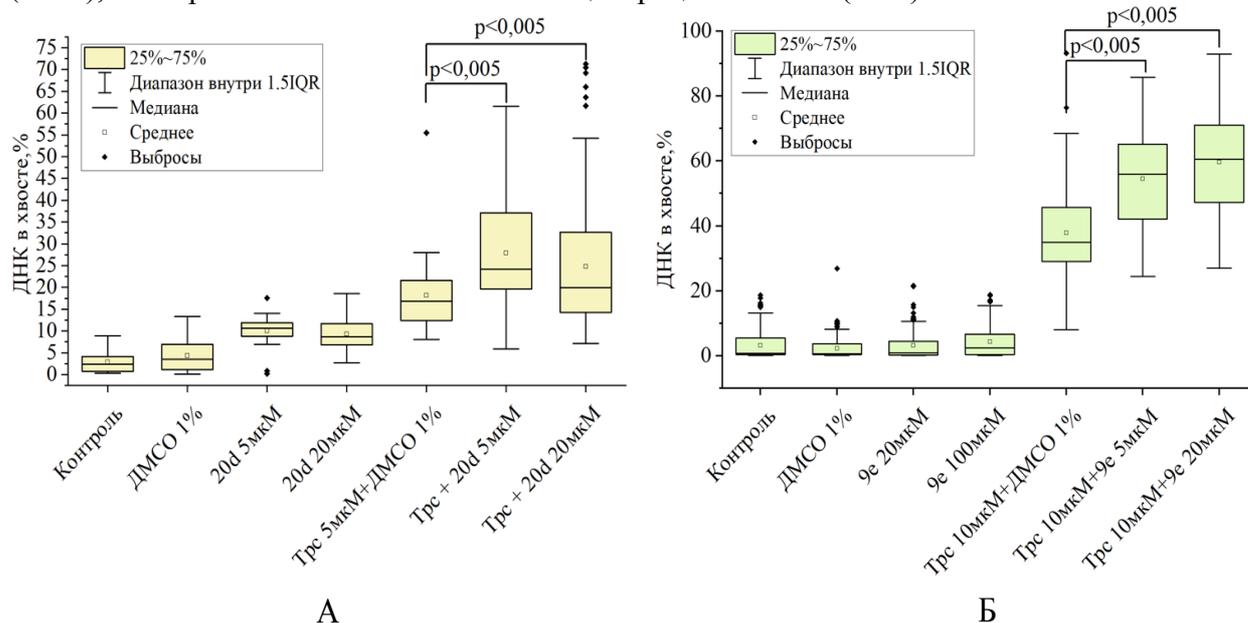


Рис.16. Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения **20d** (А) и **9e** (Б) в различных концентрациях на действие топотекана.

Таким образом, было показано, что совместное использование топотекана с ингибиторами Tdp1 **9e** и **20d** позволяет увеличить эффективность топотекана. Так как известно, что Tdp1 является единственной мишенью для топотекана, а из полученных результатов видно, что сами по себе ингибиторы незначительно увеличивают количество поврежденной ДНК, то рост повреждений ДНК при совместном использовании ингибиторов и топотекана может быть связан с действием ингибиторов на Tdp1. Это косвенно указывает на то, что Tdp1 действительно может являться молекулярной мишенью исследуемых ингибиторов.

### 3. Исследование проапоптотического действия ингибитора Tdp1 **20d**

Тип клеточной гибели при совместном применении гидразонотиазольного производного УК **20d** и топотекана исследовали методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток Аннексином V- FITC, результаты приведены на Рисунке 17.

Из полученных результатов (Рис. 17) видно, что контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 14 часов, содержали 75% живых клеток, 4% клеток в стадии раннего апоптоза, 13% клеток в стадии позднего апоптоза и 6% клеток в стадии некроза. При инкубации клеток с топотеканом в концентрации 2 мкМ популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличилась до 26%, что в два раза больше по

сравнению с контрольной группой клеток. При инкубации клеток с топотеканом в концентрации 5 мкМ популяция позднеапоптотических клеток увеличилась до 37%, что примерно в три раза больше по сравнению с контрольной группой клеток. Также до 13% (p-value <0,005) увеличивалась популяция клеток с признаками некроза при инкубации клеток с 5 мкМ топотеканом, что в два раза больше по сравнению с контрольной группой. (Рис. 17).

Инкубация клеток с производным УК **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ приводила к увеличению популяции клеток с признаками раннего апоптоза до ~9%, что на ~5% больше, чем в контрольной группе. Популяция клеток с признаками позднего апоптоза также увеличилась на ~5%, по сравнению с контрольной группой и составила 18,7% для **20d** в концентрации 5 мкМ и 17,4% для **20d** в концентрации 20 мкМ. Популяция некротических клеток сравнима с контрольной группой при инкубации клеток с **20d** в концентрации 5 мкМ и 20 мкМ. Следовательно, повышение концентрации ингибитора **20d** не вело к значительному увеличению гибели клеток.

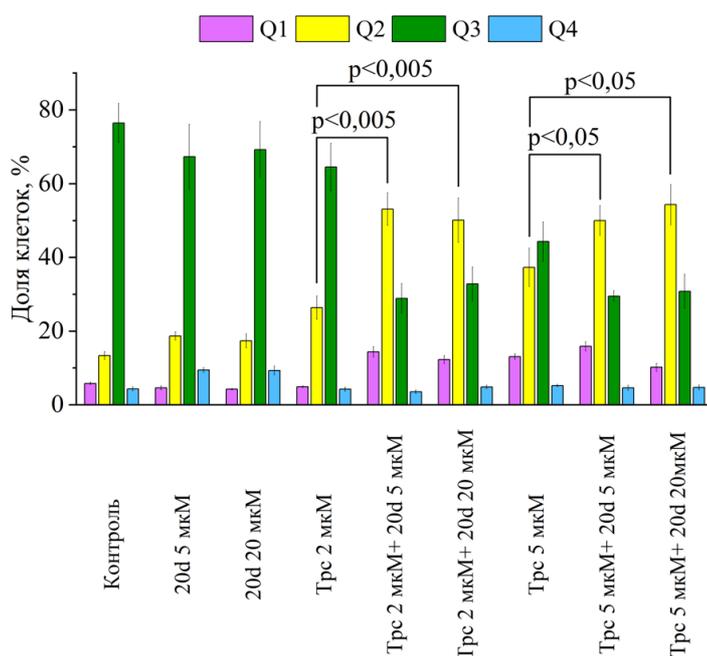


Рис. 17. Анализ типа клеточной гибели в клетках MCF7, обработанных **20d**, топотеканом и их комбинацией. Клетки с топотеканом в концентрациях 2 и 5 мкМ, ингибитором в концентрациях 5 и 20 мкМ и их комбинацией, инкубировали в течении 14 часов

Q1 – (фиолетовый) некротическая популяция, Q2 – (желтый) поздняя апоптотическая популяция, Q3 (зеленый) – живые клетки, Q4 (голубой) – ранняя апоптотическая

В результате совместного применения 2 мкМ топотекана и производного УК **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличивалась до 53% и 50%, соответственно. Это значимо больше по сравнению с использованием только 2 мкМ топотекана. При повышении концентрации топотекана до 5 мкМ в присутствии ингибитора **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличивалась до 50% и 54%, соответственно. Таким образом, повышение доли позднеапоптотических клеток под действием топотекана в присутствии **20d** позволяет сделать вывод, что их совместное использование увеличивает эффективность топотекана и позволяет использовать его в более низких концентрациях.

#### 4. Изучение влияния соединений на противоопухолевый эффект топотекана *in vivo*

Для исследования сенсibiliзирующего эффекта производных УК *in vivo* была использована перевиваемая опухоль мышей - солидная карцинома лёгких Льюис (LLC). Этот штамм перевиваемой опухоли был получен из Банка клеточных штаммов Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия), и поддерживается у мышей в качестве трансплантированных опухолей. Работы были выполнены совместно с группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны, результаты приводятся с ее разрешения.

Работы были выполнены совместно с группой лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦИГ СО РАН под руководством Поповой Нэлли Александровны, результаты приводятся с ее разрешения.

Мышиная модель LLC является наиболее широко используемой моделью мелкоклеточного рака легкого человека. Опухоль обладает высокой туморогенностью (при трансплантации солидные опухолевые узлы развиваются у 100% самок и самцов мышей) и способностью метастазировать в легкие, что и является причиной гибели животных. Трансплантация опухолевых клеток производится внутримышечно в правое бедро, в итоге на месте прививки образуется первичный опухолевый узел [28].

При выборе концентраций производных УК опирались на данные базы RTECS (RTECS - регистр токсических эффектов химических соединений) о токсичности УК. По данным регистра пероральная токсичность (50% летальная доза; LD<sub>50</sub>) УК для мышей составляет 836 мг/кг (75 мг/кг при подкожном введении и 25 мг/кг при внутривенном введении), при этом данные о токсичности и биодоступности производных УК *in vivo* отсутствуют [29]. Поэтому мы использовали дозы 80-100 мг/кг при внутрижелудочном введении ингибитора Tdp1. Топотекан мышам вводили внутривентрально, так как внутривентральный способ введения лекарственных препаратов мышам считается аналогом внутривенного введения препаратов у человека. Доза топотекана подбиралась таким образом, чтобы при кратном введении не излечить опухоль и выявить сенсibilизирующий эффект ингибиторов Tdp1 [30]. Группы мышей содержали по 5-7 особей.

*Противоопухолевое и антиметастатическое действие гидразонотиазольного производного УК 20d в монорежиме и в сочетании с топотеканом в отношении опухоли LLC*

В этом эксперименте была изучена способность соединения **20d** сенсibilизировать противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана на опухоль LLC. Лечение животных топотеканом и соединением **20d** проводилось четырежды на 4, 5, 7 и 9 дни после трансплантации опухоли.

- **Группа 1** – контрольная – мыши этой группы получали внутрижелудочно смесь 15% ДМСО и 10% Твин-80 (контроль растворителя);
- **Группа 2** получала топотекан внутривентрально в разовой дозе 1,5 мг/кг. Выбранная доза топотекана неэффективна против первичной опухоли при четырехкратном введении, но достаточна для выявления сенсibilизирующего эффекта ингибитора Tdp1;
- **Группа 3** получала одновременно внутривентрально топотекан в дозе 1,5 мг/кг и ингибитор Tdp1 **20d** внутрижелудочно в разовой дозе 100 мг/кг в виде суспензии в ДМСО/Твин-80 (0,3 мл/мышь);
- **Группа 4** получала внутрижелудочно в виде суспензии только ингибитор Tdp1 **20d** в разовой дозе 100 мг/кг в ДМСО/Твин-80 (0,3мл/мышь).

Действие препаратов оценивали в конце эксперимента на 17-й день по весу опухолей, массе тела и внутренних органов (печень и селезенка), а также подсчитали количество метастазов в лёгких всех животных. Конечной точкой эксперимента считалась смерть мышей или один-два дня до расчетного времени смерти мышей в контроле

К моменту окончания эксперимента вес тела мышей контрольной группы увеличился на 4,4%, что было связано с ростом опухоли. После вычета массы опухоли вес животных в контрольной группе был на 10% меньше исходного. В экспериментальных группах вес тела мышей после удаления опухоли так же снижался примерно на 10%, и достоверных различий между экспериментальными группами и контрольной не было выявлено. Ни в одной группе мышей не было отмечено значительного уменьшения массы селезенки или увеличения печеночного индекса. На рисунке 18 приведены данные об изменении веса мышей.

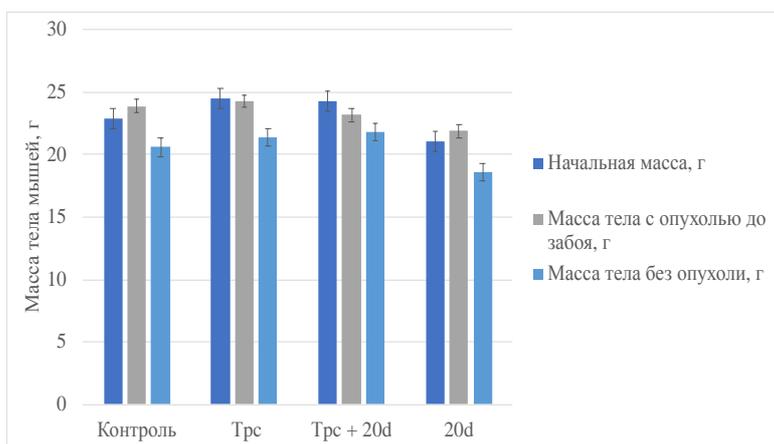


Рис.18. Изменение веса мышей под действием топотекана и соединения **20d**.

При введении в монорежиме соединение **20d** не влияло на вес опухоли, но в комбинации с топотеканом значительно усиливало его противоопухолевое действие, снижая массу опухоли на 58% по сравнению с контролем (Рис. 19А). Что касается метастазов, лечение топотеканом снизило их количество примерно в 2 раза по сравнению с контрольной группой мышей. Применение топотекана в комбинации с ингибитором Tdp1 **20d** снизило количество метастазов примерно

в 6 раз (Рис. 19Б), по сравнению с использованием топотекана в монорежиме. Количество метастазов в группе мышей, получавшей только ингибитор **20d**, было незначительно больше, чем в контрольной группе. Подсчёт метастазов в легких животных осуществляли под микроскопом МБИ-3 при четырехкратном увеличении после фиксации легких в 10% формалине.

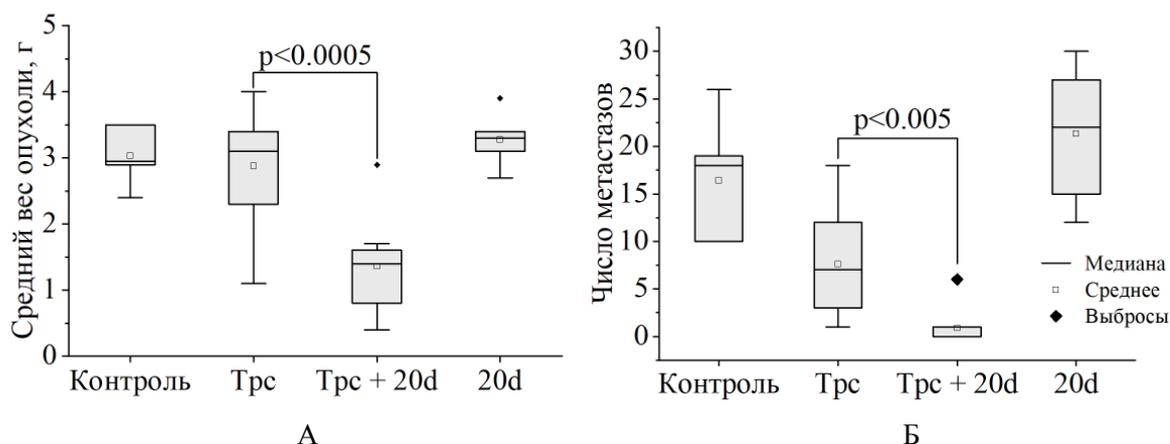


Рис. 19. Диаграммы влияния соединения **20d** на противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана. (А) Влияние **20d** на массу опухоли через 17 дней после трансплантации. (Б) Влияние **20d** на количество метастазов в легких на 17-е сутки после внутримышечной трансплантации LLC.

Таким образом, ингибитор Tdp1, гидразонотиазольное производное УК **20d** не усиливает общетоксическое действие топотекана и не влияет на вес опухоли и количество метастазов в монорежиме, но при сочетанном применении значительно усиливает противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана. Таким образом, это соединение **20d** является перспективным кандидатом для дальнейшей разработки в качестве сенсibilизатора действия топотекана.

На сегодняшний день только наш коллектив исследовал ингибиторы Tdp1 на перевиваемых опухолях мышей и в предварительных экспериментах показал, что использование их совместно с топотеканом действительно повышает эффективность терапии топотеканом *in vivo*.

### Заключение

Данная работа представляет собой систематическое исследование, в результате которого были обнаружены высокоэффективные ингибиторы Tdp1 на основе

производных хромена, адамантана и усниновой кислоты. Изучена их собственная цитотоксичность и способность сенсibilизировать действие топотекана на клеточных линиях, представляющих модели различных видов рака. Так же показано влияние соединений на накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, и на усиление про-апоптотического эффекта топотекана при совместном использовании с ингибитором **20d**. Показано, что совместное применение ингибитора Tdp1 с топотеканом усиливает противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана *in vivo*.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2020-773).

## ВЫВОДЫ

1. Производные хромена, адамантана и цианопроизводные усниновой кислоты ингибируют фермент репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1 (Tdp1) в диапазоне значений  $IC_{50}$  1-15 мкМ, арилиденфураноновые и гидразонотиазольные производные усниновой кислоты – в диапазоне  $IC_{50}$  0,01-6,7 мкМ. Наиболее эффективными ингибиторами Tdp1 среди изученных соединений являются гидразонотиазольные производные усниновой кислоты, ингибирующие Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций.
2. Большинство исследуемых соединений умеренно токсичны или нетоксичны в отношении изученных клеточных линий. Так, производные хромена, адамантана и цианопроизводные усниновой кислоты обладают  $CC_{50} > 50$  мкМ, цитотоксическая активность арилиденфураноновых и гидразонотиазольных производных усниновой кислоты варьировала в диапазоне от 3 мкМ до 50 мкМ.
3. Ряд соединений среди производных адамантана и усниновой кислоты усиливает цитотоксическое действие топотекана в отношении различных перевиваемых линий опухолевых клеток, то есть проявляет сенсibilизирующий эффект. Наиболее эффективными сенсibilизаторами оказались гидразонотиазольные производные усниновой кислоты.
4. Совместное использование топотекана и гидразонотиазольного производного усниновой кислоты **9e** или **20d** усиливает накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, при этом сами по себе соединения **9e** и **20d** не вызывают значительного накопления повреждений ДНК.
5. Производное усниновой кислоты **20d** не индуцирует апоптоз, но усиливает проапоптотический эффект топотекана.
6. Соединение **20d** усиливает противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на модели карциномы Льюис мышей.

### Список публикаций по теме диссертации

1. **Chepanova A.**, Mozhaitsev E., Munkuev A., Suslov E., Korchagina D, and Zakharova O, Zakharenko A, Patel J, Ayine-Tora, Daniel M. and Reynisson J, Ivanhoe K, Volcho K, Salakhutdinov N, and Lavrik O. “Combination of Monoterpene and Adamantine Moieties via Amide or Thioamide Bridges,” *Appl. Sci.* 2019, Vol. 9, Page 2767, vol. 9, no. 13, p. 2767, Jul. 2019, doi: 10.3390/APP9132767.
2. **Chepanova A.**, Li-Zhulanov N, Sukhikh A, Zafar A, Reynisson J, Zakharenko A, Zakharova O, Korchagina D, Volcho K, Salakhutdinov N, Lavrik O. “Effective Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Based on Monoterpenoids as Potential Agents for Antitumor Therapy,” *Russ. J. Bioorganic Chem.*, vol. 45, no. 6, pp. 647–655, Nov. 2019, doi: 10.1134/S1068162019060104.
3. Li-Zhulanov N, Zakharenko A, **Chepanova A.**, Patel J, Zafar A., Volcho K., Salakhutdinov N, Reynisson J., Leung IKH., Lavrik O. “A Novel Class of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors That Contains the Octahydro-2H-chromen-4-ol Scaffold”. *Molecules.* 2018 Sep 26;23(10):2468. doi: 10.3390/molecules23102468.
4. Filimonov A., **Chepanova A.**, Luzina O., Zakharenko A., Zakharova O., Ilina E., Dyrkheeva N., Kuprushkin M., Kolotaev A., Khachatryan D., Patel., Leung IKH, Chand R, Ayine-Tora DM, Reynisson J, Volcho KP, Salakhutdinov NF, Lavrik OI. “New hydrazinotiazole derivatives of usnic acid as potent TDP1 inhibitors,” *Molecules*, vol. 24, no. 20, pp. 1–34, Oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203711.
5. Luzina O., Filimonov A., Zakharenko A., **Chepanova A.**, Zakharova O., Ilina E., Dyrkheeva N., Likhatskaya G., Salakhutdinov N., Lavrik O. Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors. *J Nat Prod.* 2020 Aug 28;83(8):2320-2329. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01089.
6. Zakharenko A., Luzina O., Sokolov D., Zakharova O., Rakhmanova M., **Chepanova A.**, Dyrkheeva N., Lavrik O., Salakhutdinov N. Usnic acid derivatives are effective inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Russ J Bioorg Chem* 43, 84–90 (2017). doi.org/10.1134/S1068162017010125
7. Zakharova O., Luzina O., Zakharenko A., Sokolov D., Filimonov A., Dyrkheeva N., **Chepanova A.**, Ilina E, Ilyina A., Klabenkova K., Chelobanov B., Stetsenko D., Zafar A., Eurtivong C, Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2018 Aug 15;26(15):4470-4480. doi: 10.1016/j.bmc.2018.07.039.
8. Zakharenko A., Luzina O., Sokolov D., Kaledin V., Nikolin V., Popova N., Patel J., Zakharova O., **Chepanova A.**, Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung IKH., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models. *Eur J Med Chem.* 2019 Jan 1; 161:581-593. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.055

### Список литературы

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 1–250 р.
2. Dexheimer T. et al. // *Anticancer. Agents Med. Chem.* Bentham Science Publishers Ltd., 2012. Vol. 8, № 4. P. 381–389.
3. Hengel S.R. et al.// *Cell Chemical Biology.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 24, № 9. P. 1101–1119.
4. Abbotts R. et al.// *Cancer Manag. Res.* Cancer Manag Res, 2014. Vol. 6, № 1. P. 77–92.
5. Захаренко А.Л., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. // *Биоорганическая химия.* Akademizdatcenter Nauka, 2018. № 1. P. 3–21.
6. Laev S.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 24, № 21. P. 5017–5027.
7. Brettrager E.J., van Waardenburg R.C.A.M. // *Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.)*. 2019. Vol. 2. P. 1153–1163.
8. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. // *Medicinal Research Reviews.* John Wiley and Sons Inc., 2019. Vol. 39, № 4. P. 1427–1441.
9. Cuya S.M., Bjornsti M.-A., van Waardenburg R.C.A.M. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* Cancer Chemother Pharmacol, 2017. Vol. 80, № 1. P. 1–14.
10. Yang S.W. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. Vol. 93, № 21. P. 11534–11539.
11. Stewart L. et al. // *Science (80-. )*. 1998. Vol. 279, № 5356. P. 1534–1541.
12. Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group, 2006. Vol. 6, № 10. P. 789–802.
13. Pommier Y. // *Chem. Rev. NIH Public Access*, 2009. Vol. 109, № 7. P. 2894–2902.
14. Interthal H. et al.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 21. P. 12009–12014.
15. Comeaux E.Q., Van Waardenburg R.C.A.M. // *Drug Metab. Rev.* 2014. Vol. 46, № 4. P. 494–507.
16. Pommier Y. et al. // *Chemistry and Biology.* Cell Press, 2010. Vol. 17, № 5. P. 421–433.
17. Beretta G. et al. // *Curr. Med. Chem.* Bentham Science Publishers Ltd., 2010. Vol. 17, № 15. P. 1500–1508.
18. Wang J.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3, № 6. P. 430–440.
19. Alagoz M. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 5. P. 3089–3103.
20. Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. // *Биоорганическая химия.* Akademizdatcenter Nauka, 2016. Vol. 42, № 2. P. 129–149.
21. Interthal H. et al. // *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2005. Vol. 280, № 43. P. 36518–36528.
22. Dexheimer T.S. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol. 38, № 7. P. 2444–2452.
23. Antony S. et al. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2007. Vol. 35, № 13. P. 4474–4484.
24. Zakharenko A. et al. // *Bioorganic Med. Chem.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 23, № 9. P. 2044–2052.
25. Il'ina I. et al. // *Med. Chem. Res.* 2017 267. Springer, 2017. Vol. 26, № 7. P. 1415–1426.
26. Nazimova E. et al. // *Med. Chem. Res.* 2016 257. Springer, 2016. Vol. 25, № 7. P. 1369–1383.
27. Wanka L. et al. // *Chemical Reviews.* Chem Rev, 2013. Vol. 113, № 5. P. 3516–3604.
28. Zhu H. et al. // *React. Oxyg. species (Apex, N.C.).* React Oxyg Species (Apex), 2018. Vol. 5, № 14. P. 118–125.
29. Shtro A.A. et al. // *Antivir. Chem. Chemother.* Antivir Chem Chemother, 2015. Vol. 24, № 3–4. P. 92–98.
30. Turner P. V et al. // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* American Association for Laboratory Animal Science, 2011. Vol. 50, № 5. P. 600–613.