Российская Академия наук Сибирское отделение Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

# Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в качестве сенсибилизаторов действия ингибитора топоизомеразы 1

Чепанова Арина Александровна

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна к.х.н. Захаренко Александра Леонидовна

Новосибирск 2022

Оглавление	2
Список сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Литературный обзор	16
1.1 Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1	16
1.1.1 Комплекс Тор1–ДНК - основной субстрат Tdp1	19
1.1.3 Каталитический механизм Tdp1	24
1.1.5 Различные субстраты Tdp1	27
1.2 Роль Tdp1 в системе репарации ДНК	31
1.2.1 Восстановление одноцепочечных разрывов ДНК	31
1.2.2 Эксцизионная репарация оснований	33
1.2.3 Репарация двуцепочечных разрывов ДНК	36
1.3. Tdp1 как мишень противораковой терапии	39
1.3.1 История исследования игибиторов Tdp1	40
1.3.1.1 Неорганические ингибиторы	40
1.3.1.2 Аминогликозидные антибиотики и ингибиторы рибосом	40
1.3.1.3 Фурамидин и диамидины	41
1.3.1.4. Производные стероидов	43
1.3.1.5 Миметики фосфотирозина	44
1.3.1.6 Инденоизохинолины	45
1.3.1.7 Производные варацина	48
1.3.1.8 Производные адамантана	49
1.3.1.9 Производные карена	54
1.3.1.10 Производные дезоксихолевой кислоты	55
1.3.1.11 Производные кумарина	59
1.3.1.12 Нуклеозиды	61
1.3.1.13 Производные смоляных кислот	62
1.3.1.14 Берберины	66
Глава 2. Материалы и Методы	71
2.1 Материалы исследования	71
2.2 Оборудование	72
2.3 Растворы	72

# оглавление

2.4 Методы
2.2.1 Наработка, выделение и очистка рекомбинантного белка Tdp173
2.2.2 Исследование активности белка Tdp1 и определение параметров
IC <sub>50</sub> флуоресцентным методом в режиме реального времени
2.2.3 Клеточные культуры75
2.2.4 Анализ цитотоксической активности с помощью МТТ-теста
2.2.5 Исследование влияния исследуемых соединений на эффективность
репарации ДНК щелочным методом ДНК-комет
2.2.6 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под
действием соединения 20d методом окрашивания клеток Annexin V-
FITC/PI77
2.2.7 Лабораторные животные и модель опухоли 77
Глава З. Результаты и обсуждение 79
3 1 Исследование в пидния произволных биологически активных
соелинений на активность Tdn1 in vitro 70
3 1 1 Произволные хромена 81
3 1 2 Производные адамантана 84
3 1 3 Производные усниновой киспоты
3 1 3 1 Цианопроизволные VK 90
3 1 3 2 Арилиленфураноновые произволные VK 92
3 1 3 3 Тиазольные аминотиазольные и гидразонотиазольные
произволные VK 99
3.2 Исследование влияния производных УК на накопление
повреждении днк методом Alkaline Comet assay 114
3.3 Исследование проапоптотического действия ингибитора Tdp1 20d
3.4 Изучение влияния ингибитора Tdp1 на противоопухолевый эффект
топотекана in vivo125
3.4.1 Противоопухолевое и антиметастатическое действие
гидразонотиазольного производного УК 20d в монорежиме и в сочетании
с топотеканом в отношении опухоли LLC 126
Заключение
Выволы
Снизом ниторотуры 100 130
Список литературы 138
Приложение 155

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АП-сайт апуриновый/апиримидиновый сайт
- ДМСО диметилсульфоксид (англ. DMSO)
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПАРП1 поли–(АДФ-рибозо)-полимеразы 1 (англ. PARP 1)
- УК усниновая кислота

ACV – ацикловир

АРЕ1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1

АРТХ – апратаксин

Ara-C – цитарабин

AZT – зидовудин

BER – эксцизионная репарация оснований;

BSA – бычий сывороточный альбумин

СС<sub>50</sub> – средняя цитотоксическая концентрация, вызывающая гибель 50% клеток

CNDAC – сапацитабин

СРТ – камптотецин

DSBs – двуцепочечные разрывы ДНК

FBS – сыворотка крови крупного рогатого скота

FDA – управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (англ. Food and Drug Administration)

HKD – гистидин (H), лизин (K), аспарагиновая кислота (D), консервативный мотив в активном центре семейства фосфолипаз D

HKN – гистидин (H), лизин (K), аспарагин (N), консервативный мотив в активном центре Tdp1

HRR – гомологичная рекомбинация

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования, вызывающая снижение активности фермента на 50%

МНС – главный комплекс гистосовместимости

MMR – репарация ошибочно спаренных нуклеотидов

- MMS метилметансульфонат
- MMS метилметансульфонат;
- MNNG метилнитронитрозогуанин;
- NER эксцизионная репарация нуклеотидов
- NHEJ негомологичное соединение концов
- РАR поли(АДФ-рибоза)
- PBS натрий-фосфатный буфер
- PLD суперсемество фосфолипаз D
- PNКР полинуклеотидкиназа фосфатаза
- $Pol\beta ДHК$ -полимераза  $\beta$
- SCAN1 спиноцеребеллярная атаксия с аксональной нейропатией
- SSB одноцепочечные разрывы ДНК
- Tdp1 тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1
- Тdp2 тирозил ДНК фосфодиэстераза 2
- TMZ темозоломид
- ТМZ темозоломид
- Тор1 топоизомераза 1
- Трс топотекан

#### **ВВЕДЕНИЕ**

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. По данным ВОЗ от 2018 года, показатель смертности от онкологических заболеваний в России составил 108,6 на 100 тыс. населения — это 24-е место по смертности от онкологических заболеваний среди стран мира [1]. Снижение смертности ключевая цель борьбы с онкологическими заболеваниями. Для этого предлагаются различные стратегии повышения эффективности терапии онкологических заболеваний. Одним из таких направлений 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 может обусловливать устойчивость раковых клеток к химио- и радиотерапии [2–4]. Селективное воздействие, направленное на ингибирование ферментов репарации ДНК, может быть основой как монотерапии, так и эффективной сопровождающей терапии [4-11].

Примером успешного воздействия на ферменты системы репарации являются ингибиторы поли–(АДФ-рибозо)-полимеразы 1 (англ. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1)) олапариб, рукапариб, нирапариб, велипариб и талазопариб, одобренные для лечения рака молочной железы, яичников и других.

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 [12].

Топоизомераза 1 – фермент, отвечающий за изменение топологии ДНК во время репликации, транскрипции и сегрегации хромосом. Ферментативная активность Тор1 включает в себя внесение одноцепочечного разреза с 3'конца ДНК, который позволяет 5'-концу разрыва вращаться вокруг неповреждённой цепи, тем самым снимая суперспирализацию цепи ДНК. При этом фермент образует ковалентный комплекс с 3'-концом разреза ДНК через остаток тирозина-723 [13]. Затем Тор1 катализирует лигирование концов ДНК высвобождается из комплекса. Ингибиторы Top1 стабилизируют И промежуточный ковалентный комплекс Тор1–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 Тор1–ДНК, применяются в клинической практике для лечения ряда онкологических заболеваний [14,15].

Тdp1 расщепляет 3'-фосфодиэфирную связь между остатком тирозина-723 Top1 и 3'-концом ДНК [16,17]. Таким образом, Tdp1 удаляет тройной комплекс Top1–ДНК–СРТ, тем самым Tdp1 противостоит ингибиторам Top1 [8,14,18] и является возможной причиной лекарственной устойчивости некоторых видов рака [2,19–22]. Следовательно, применение ингибиторов Tdp1 может увеличить эффективность терапии традиционных препаратовингибиторов Top1.

На данный момент в мире ингибиторы Tdp1 систематически разрабатываются двумя научными коллективами: группой молекулярной фармакологии Ива Поммье (Yves Pommier), Национальный институт рака, США, и нашим коллективом. Группой Ива Помье был обнаружен ряд ингибиторов Tdp1 с низкой и средней эффективностью [23–26]. В последние годы ими был разработан ряд двойных Tdp1/Top1 и даже тройных Tdp1/Tdp2/Top1 ингибиторов. Такие соединения могут одновременно вызывать повреждение ДНК и препятствовать ее восстановлению [27–34].

Однако, данные соединения обладают высокой собственной цитотоксичностью, что затрудняет их использование в комплексе с другими противоопухолевыми препаратами и подбор оптимальной дозировки.

В последние годы коллективом исследователей из ИХБФМ СО РАН совместно с сотрудниками НИОХ СО РАН и ИЦиГ СО РАН был выявлен и изучен ряд ингибиторов Tdp1, который включал в себя производные биологически активных веществ различного происхождения: усниновой кислоты (УК) [35–38], кумарина [39,40], адамантанов [41–46], тиенопиридинов [47], нуклеозидов [48–50], каренов [51], желчных кислот [52–54], берберинов [55,56], смоляных кислот [57,58], бензопентатиепинов [59].

Значительная часть обнаруженных соединений не проявила токсичности на перевиваемых культурах клеток, что является преимуществом с точки зрения отсутствия дополнительных побочных эффектов терапии. Среди выявленных ингибиторов Tdp1 обнаружены соединения, повышающие эффективность топотекана как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом не ясен точный механизм воздействия ингибиторов Tdp1 на опухолевые клетки, а именно, влияние этих соединений на образование и накопление продуктов повреждения клеточной ДНК, не известен тип клеточной гибели под действием ингибиторов Tdp1.

Целью настоящей работы является поиск ингибиторов Tdp1 среди производных природных биологически активных веществ и изучение их способности сенсибилизировать 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 хромена, 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.
- Проанализировать влияние нетоксичной концентрации наиболее активных ингибиторов Tdp1 на цитотоксический эффект топотекана – способность сенсибилизировать действие топотекана в отношении ряда перевиваемых линий опухолевых клеток.
- Оценить уровень повреждения ДНК под действием наиболее эффективных сенсибилизаторов отдельно и в комбинации с топотеканом методом ДНК-комет в щелочных условиях.
- Изучить проапоптотическое влияние ингибиторов Tdp1 лидеров отдельно и в комбинации с топотеканом методом проточной цитометрии.
- Исследовать влияние соединения лидера на рост карциномы Льюис мышей в виде монопрепарата и в комбинации с топотеканом.

Научная новизна полученных результатов. 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 [60,61], 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, также цианопроизводные (УК), фураноновые производные УК и a 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<sub>50</sub> 0,64–15 мкМ), а фураноновые и гидразонотиазольные производные УК ингибируют Tdp1 в наномолярных концентрациях (значения IC<sub>50</sub> от 10 нМ).

В данной работе также была изучена цитотоксичность наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 на основе природных биологически активных соединений 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 сенсибилизаторами 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 его антиметастатический эффект *in vivo*.

#### Практическая значимость работы.

Подавление активности Tdp1 может увеличить цитотоксичность различных противоопухолевых препаратов, направленных на повреждение опухолевой ДНК, а также помочь в борьбе с лекарственно устойчивыми опухолями.

Терапевтическим эффектом от совместного применения таких веществ и ингибиторов Tdp1 может быть более активное подавление роста раковых клеток и/или снижение дозы традиционных препаратов.

## Положения, выносимые на защиту

- Производные природных биологически активных веществ на основе хромена, адамантана и усниновой кислоты (УК) подавляют активность Tdp1. Наиболее эффективными ингибиторами являются производные усниновой кислоты.
- Изученные соединения на основе хромена, адамантана и усниновой кислоты являются нетоксичными или умеренно токсичными в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток, некоторые из этих производных значительно усиливают цитотоксическое действие топотекана.
- 3. Гидразонотиазольные производные УК 9е и 20d усиливают накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, и усиливают проапоптотический эффект топотекана.
- 4. Производное УК **20d** усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана *in vivo*.

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

# Статьи

 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. 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.
Li-Zhulanov N, Zakharenko A, Chepanova A., Patel J, Zafar A., Volcho K.,

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-4ol 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 hydrazinothiazole 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.

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.

 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

# Тезисы

A. A. Chepanova, A. L. Zakharenko, O. D. Zakharova et al. / Development of Tdp1 inhibitors based on natural biologically active compounds // Systems Biology of DNA Repair Processes and Programmed Cell Death (SbPCD-2018): Symposium, Novosibirsk, 20–22 августа 2018 года. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – P. 11. – DOI 10.18699/SbPCD-2018-05. – EDN FJRVBY.

А.А. Чепанова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, Е.С. Ильина, Т.М. Хоменко, Е.С. Можайцев, Е.В. Суслов, Н.С. Ли-Жуланов, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов Tdp1, природных биологически активных соединениях// V основанных на конференция биотехнологов, Международная молодых ученых: молекулярных биологов и вирусологов — 2018 : Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2018. С.391 A. A. Chepanova, A. L. Zakharenko, A. S. Filimonov et al. / Development of Tdp1 inhibitors based on natural biologically active compounds as prototypes of antitumor drugs // Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2019): The Eleventh International Young Scientists School, Novosibirsk, 24–28 июня 2019 года – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – P. 13. – DOI 10.18699/SBB-2019-06. – EDN ALETPA.

А.А. Чепанова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов TDP1 на основе

производных усниновой кислоты, как потенциальных противораковых препаратов // Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021 – 4-9 июля 2021, Новосибирск. С. 205

**А.А. Чепанова**, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, А.С. Филимонов, О.А. Лузина, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик / Разработка ингибиторов Tdp1 на основе производных усниновой кислоты // Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины – Новосибирск 22 - 24 ноября 2021, ИХБФМ СО РАН, 2021. С.47

**Чепанова А.А,** Захаренко А.Л., Захарова О.Д., Филимонов А.С., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. / Ингибиторы Tdp1 на основе производных усниновой кислоты, как прототипы лекарственных препаратов // Синтетическая биология и биофармацевтика: Материалы всероссийской конференции, Новосибирск, 24–28 июля 2022 года. – Новосибирск: ООО «Офсет-TM», 2022. – С. 239. – EDN UMNMMU.

Структура и объем 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.

Личный 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 учавствовал 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 в ЛФР ИХБФМ СО РАН.

Исследования сенсибилизирующего 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 Чернышовой Ирине Алексеевне.

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

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

# ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 1.1 Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) впервые была обнаружена в дрожжах Saccharomyces cerevisiae как фермент, гидролизующий ковалентную связь между остатком тирозина и 3'-фосфатной группой ДНК. Поскольку единственным известным ферментом, формирующим 3'-фосфотирозильную связь *in vivo*, является ДНК-топоизомераза I (Top1), то предположили, что обнаруженная активность вовлечена в репарацию повреждений ДНК, возникающих в результате образования необратимых комплексов Тор1–ДНК [12]. Далее относительно открытой аминоксилотной последовательности Tdp1 S. cerevisiae было проведено выравнивание последовательностей малоизученных белков других организмов, которое показало наличие гомологов Tdp1 у широкого спектра организмов, включая человека [16].

В настоящее время известно, что ген, кодирующий Tdp1 у человека, находится в 14 хромосоме (14q32.11), а сам фермент состоит из 608 аминокислот и имеет массу 68,5 кДа [16].

С-концевые области ортологов Tdp1, начиная от 148 аминокислоты Tdp1 человека, имеют высокую гомологию. В то же время, N-концевые области ортологов Tdp1 обладают низкой гомологией и имеют существенные отличия по длине. Так, первые 148 аминокислот человеческого Tdp1 в N-концевой области могут быть удалены без изменения каталитических свойств *in vitro* [16]. Наиболее консервативными участками человеческого белка являются последовательности аминокислот 262–289 и 492–522 [16]. В этих участках была выявлена консервативная последовательность, характерная для суперсемества фосфолипаз D (PLD), содержащая остатки гистидина, лизина и аспартата (HxK(x)<sub>4</sub>D) [62]. Однако, гомологи Tdp1 обладают уникальным мотивом HKD, который отличается от других членов семейства PLD тем, что в нем отсутствует консервативный аспартат, но в другой позиции содержится консервативный аспарагин (мотивы HKN для человека:  $H_{263}K_{265}N_{283}$  и

H<sub>493</sub>K<sub>495</sub>N<sub>516</sub>, Рис. 1.1А) [16,63]. На основании особенностей консервативного мотива НКN ортологи Tdp1 были выделены в отдельный класс [16].

Общая третичная структура человеческой Tdp1 имеет структурное сходство с ферментами бактерий группы *Streptomyces* [64] и бактериальной нуклеазой (Nuc) [65]. Кристаллографическое исследование показало, что Tdp1 является мономером и состоит из двух топологически сходных доменов α-β-α, каждый домен несет консервативный мотив HKN (Puc. 1.1) [66,67]. Мотивы в доменах расположены достаточно близко, образуя каталитический сайт, расположенный внутри узкого асимметричного субстрат-связывающего канала, который имеет положительный заряд для связывания одноцепочечной ДНК (Puc. 1.1Б) [66,67].

Для изучения каталитического центра Tdp1, фермент кристаллизовали с  $[VO4]^{3-}$ , оксоанионом ванадата имитирующим фосфатную группу, присоединенную к каталитическому остатку тирозина Top1, шестимерным олигонуклеотидом (5'-AGAGTT-3') и пептидом с последовательностью (NH2-Lys-Leu-Asn-Tyr-Leu-Asp-Pro-Arg-COOH), которая соответствует 720-727 аминокислотному участку Top1. Оба HKN каталитических мотива стабилизируют ванадат шестью водородными связями между атомами азота мотивов HKN и атомами кислорода ванадата (Рис. 1.1Б) [66,68].



Рис. 1.1. Кристаллическая структура комплекса Tdp1 с оксоанионом ванадата [VO<sub>4</sub>]<sup>3-</sup> [63,66]

(A) Схематичное изображение доменной структуры Tdp1. Консервативные каталитические остатки выделены желтым цветом.

(Б) Кристаллическая структура Tdp1 в виде молекулярной поверхности. Белок представлен светло-розовым цветом, каталитические остатки - желтым, ДНК - синим, пептид - зеленым. (PDB ID 1NOP)

(В) Подробные контакты между субстратом и аминокислотными остатками в каталитическом центре Tdp1. Каталитические остатки – желтые, мотивы HKN выделены красной рамкой; остатки, участвующие в полярных взаимодействиях – голубые; остатки, участвующие в гидрофобных взаимодействиях – пурпурные, палочки окрашены по элементам (N-синий; О-красный; P- оранжевый; V- серый).

Аспарагиновые остатки активного сайта (N283 и N516) стабилизируют соседнюю боковую цепь лизина за счет водородных связей между атомами кислорода их боковой цепи и β-аминогруппами лизинов. Одноцепочечная ДНК удерживается на месте сетью полярных взаимодействий, вовлекающих 5'-фосфатные группы трех прилегающих к фосфотирозильной связи нуклеотидов (T-1, T-2 и G-3, Puc. 1.1.В) и аминокислотные остатки S400, S403, K469, S518, K519 и A520. Стабилизация ДНК осуществляется посредством как гидрофобных, так и полярных взаимодействий, поэтому Tdp1 способна распознавать субстрат независимо от последовательности нуклеотидов. Это

согласуется с тем фактом, что комплексы Top1–ДНК могут образовываться на разных последовательностях, и Tdp1 должна проводить эффективный катализ независимо от нуклеотидного состава этой последовательности [63,66].

# 1.1.1 Комплекс Тор1–ДНК - основной субстрат Тdр1

Образование комплекса Top1–ДНК необходимо для снятия локального напряжения с ДНК. В ходе процессов транскрипции и репликации изменяется топология ДНК, что приводит к сверхспирализации ДНК, а также к образованию «узлов» ДНК [69]. Топоизомеразы решают такие топологические проблемы, разрезая и заново сшивая нуклеиновые кислоты без помощи дополнительных ферментов. Принцип действия топоизомеразы (topoisomerase 1 – Top1) представлен на рисунке 1.2 [63]. Подвергшийся частичной протеолитической деградации ковалентный комплекс Top1–ДНК, стабилизированный, например, ингибитором Top1, является основным субстратом для Tdp1 [69].



Рис. 1.2. Механизм действия топоизомеразы. (А) суперскрученная ДНК. (Б) Топоизомераза 1 обратимо расщепляет цепь ДНК, образуя ковалентную связь между ферментом и 3'-концом разорванной ДНК, что позволяет разорванной цепи вращаться вокруг неповрежденной цепи. (В) Религирование цепи ДНК.

Механизм работы Top1 состоит из нескольких этапов (Рис. 1.2). На первом этапе Top1 нековалентно связывается с ДНК, предпочитая суперскрученные участки [13,70].

На втором этапе происходит расщепление цепи ДНК с помощью реакции трансэтерификации. В ходе реакции гидроксильная группа тирозина-723 (у человека) Тор1 (Рис 1.2Б) связывается с 3'-фосфатом, освобождая 5'- гидроксильную группу с образованием одноцепочечного разрыва цепи ДНК, образуя при этом переходный ковалентный комплекс Тор1–ДНК [13].

На третьем этапе свободный конец ДНК вращается вокруг ковалентного комплекс Top1–ДНК до тех пор, пока топологическое напряжение не будет снято (Рис. 1.2Б). Механизм раскручивания ДНК с помощью Top1 является чрезвычайно эффективным. Скорость вращения молекулы составляет около 600 об/мин, что позволяет полностью снять напряжение в суперскрученной ДНК [71].

На последнем этапе происходит вторая реакция трансэтерификации и образуется 5'-3'-фосфодиэфирная связь. По завершении каталитического процесса Top1 восстанавливает целостность ДНК и диссоциирует (Рис. 1.2В). В нормальных условиях скорость реакции лигирования значительно выше, чем скорость расщепления [13,71].

Модификации перед сайтом разрезания, такие как метилирование цитозина, нуклеотидные замены, неправильно спаренные пары оснований, приводят либо к снижению каталитической активности Top1 из-за позиционных изменений сайта разрезания, либо к образованию стабильного ковалентного комплекса Top1–ДНК [72,73]. Нарушения, представленные в Таблице 1.1, ведут к стабилизации комплекса Top1 – ДНК, что может приводить к клеточной гибели, поскольку блокируются процессы репликации и транскрипции [63].

Таблица 1.1. Повреждения, приводящие к стабилизации комплекса Top1 – ДНК\*\_\_\_\_\_

Эндогенные повреждения	Источники возникновения
ДНК	
Ошибочные основания	Ошибки полимеразы
АП-сайты	BER**
8-Оксогуанин	Свободные радикалы
5-Гидроксицитозин	Свободные радикалы
Одноцепочечные разрывы	Свободные радикалы; BER**
Метилирование цитозина	Физиологические
Образование тройной спирали	Физиологические
Апоптотическая фрагментация	Апоптоз
хроматина	

Экзогенные повреждения	Источники возникновения
ДНК	
УФ излучение	Димеры и 6,4-фотопродукты
Ионизирующее излучение	Одно- и двух-цепочечные
	разрывы
Об- N7- О3-метилгуанин	Алкилирующие препараты
	(MNNG, MMS, TMZ)**
Об-dА- аддукты бенз[а]пирена	Интеркалированные
	канцерогенные аддукты
N2-dG- аддукты бенз[а]пирена	Канцерогенные аддукты с
	мелкими бороздками
N <sup>2</sup> -dG-аддукты	Интеркалированные
бензо[с]фенантрена	канцерогенные аддукты
N6-этеноаденин	Канцерогенный виниловый
	аддукт
N2-dG-этиловые аддукты	Ацетальдегид (спирт)
N2-dG-аддукты кротонового	Экзогенные и эндогенные
альдегида	канцерогены

\*Цитируется по [63]

\*\* BER: эксцизионная репарация оснований; MNNG: метилнитронитрозогуанин; MMS: метилметансульфонат; TMZ: темозоломид.

Лекарства, используемые в химиотерапии рака, например, производные СРТ, такие, как топотекан и иринотекан (Рис. 1.3.), также могут комплекс Тор1–ДНК [74]. СРТ и его стабилизировать переходный производные фармакологически уникальны. Тор1 является единственной известной мишенью для этих препаратов, что было показано на дрожжевых клетках, которые становятся полностью невосприимчивыми к СРТ, когда удаляется ген Тор1 [75-77]. Основное действие камптотецина и его производных иринотекана и топотекана направлено на опухолевые клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла [78]. Камптотецин и его производные связываются с Тор1, образуя тройной комплекс Тор1-ДНК-СРТ. Сами по себе комплексы Тор1-ДНК-СРТ обратимы и не являются токсичными. Однако при репликационной Тор1-ДНК-СРТ столкновении вилки с комплексом происходит остановка репликации, что может приводить к образованию двуцепочечного разрыва и гибели клетки [78-82]. Также действие СРТ может приводить к остановке транскрипции [83]. В работе [84] было показано, что столкновения комплекса РНК-полимеразы с обратимым комплексом Top1-ДНК-СРТ на матричной цепи транскрипции останавливают транскрипцию РНК и одновременно превращают обратимо расщепляемые комплексы Top1-ДНК-СРТ в необратимые Top1-связанные одноцепочечные разрывы [85,86].

Топотекан (Hycamtin®) используется для лечения рака яичников, мелкоклеточного рака легких, рака молочной желез. Иринотекан (Camptosar®, Campto®) представляет собой пролекарство, которое легко гидролизуется до своего активного метаболита SN-38 карбоксилэстеразой [87] и широко используется при лечении злокачественных новообразованиях желудочнокишечного тракта и других солидных опухолей [88]. Топотекан и иринотекан также используются при первичных злокачественных новообразованиях колованиях головного мозга (глиобластомы), саркомах и раке шейки матки [89–93].

Несмотря на свою мощную противоопухолевую активность, все производные СРТ имеют определенные ограничения в использовании. Помимо токсичности, ограничивающей лечебную дозу, производные СРТ быстро инактивируются в крови за счет раскрытия лактонного кольца [94–96]. Тор1 начинает выполнять свои функции в течение нескольких минут после отмены препарата, что требует длительных инфузий. Наконец, иринотекан и топотекан разработаны для внутривенного введения, перорально препараты не используются [89].



Иринотекан

Камптотецин

Топотекан

Рис 1.3. СРТ и его производные.

# Модификации комплекса Тор1–ДНК

Стабилизированный комплекс Тор1–ДНК, образовавшийся из-за перечисленных выше повреждений, может приводить к остановке репликации и транскрипции, генетической нестабильности и гибели клетки [63]. Процесс репарации комплекса Тор1–ДНК регулируется убиквитинированием и PAR-илированием/де-PAR-илированием этого комплекса [97,98]. Схема представлена на рисунке 1.4.



Рис. 1.4. Регуляция репарации комплекса Тор1–ДНК

Столкновение репликационного вилки или транскрипционного комплекса белков с Тор1–ДНК служит сигналом для убиквитинирования Тор1 – ДНК

[98–100]. Убиквитинирование индуцирует протеасомную деградацию комплекса Top1-ДНК, которая открывает доступ к фосфотирозильной связи и позволяет Tdp1 гидролизовать эту связь [63,101]. В работе [12] было показано, что Tdp1 не может гидролизовать ковалентные фосфотирозильные связи, если комплекс Top1-ДНК находится в нативной конформации.

РАR-илирование/де-РАR-илирование комплекса Тор1-ДНК не зависит от процессов репликации или транскрипции [97]. РАК-илирование Тор1–ДНК временный характер и служит сигнальным механизмом для носит рекрутирования Tdp1 к месту повреждения [102–105]. Временный характер модификации связан с тем, что молекулы PAR активируют деубиквитинирование и блокируют протеолиз Тор1-ДНК. Молекулы PAR остаются связанными с Тор1–ДНК до момента полного рекрутирования Tdp1, тем самым защищая комплекс от преждевременного протеолиза. После полного рекрутирования Tdp1 активируется процесс де-PAR-илирования, в котором основную роль играет PARG, удаляя молекулы PAR. Это активирует процесс частичной протеасомной деградации комплекса Тор1–ДНК [97], образованием после чего такой комплекс гидролизуется Tdp1 с Конфигурация образовавшегося одноцепочечного [12,98,106]. разрыва ДНК восстанавливается полинуклеотидкиназой/3'-фосфатазой разрыва (PNKP) до ДНК – 3'-OH, 5'-фосфат, после чего разрыв лигируется лигазой III (Lig III) [107–110].

### 1.1.3 Каталитический механизм Tdp1

Тdp1 способна проводить каталитический процесс независимо от кофакторов или металлов. Tdp1 осуществляет гидролиз комплекса Top1–ДНК в два этапа с образованием переходного ковалентного комплекса [16] (Рис. 1.5). Первый этап заключается в нуклеофильной атаке фосфотирозильной связи Top1–ДНК остатком His263 из N-концевого мотива HKN. Остаток His493 из противоположного мотива HKN действует как кислота и отдает

протон уходящей группе тирозина Top1 (Рис. 1.5А). Между His263 и 3'концом ДНК образуется временная ковалентная фосфоамидная связь (Рис. 1.5Б). Затем происходит нуклеофильная атака через активированную His493 молекулу воды (Рис. 1.5В) [67]. В результате образуется ДНК со свободным 3'-фосфатным концом (Рис. 1.5Г), который нуждается в дальнейшей обработке полинуклеотидкиназной фосфатазой (РNKP), и свободная Tdp1 [107,108].

Замена одного из каталитических гистидинов на аргинин (His493R) приводит к накоплению ковалентных интермедиатов Tdp1-ДНК (Рис. 1.5Д) [111]. Наличие такой гомозиготной мутации в Tdp1 приводит к редкой аутосомно-рецессивной нейродегенеративной болезни, называемой спиноцеребеллярной атаксией с аксональной нейропатией (spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy, SCAN1) [111,112]. По аббревиатуре заболевания (SCAN1) обозначается и мутантный белок.



Рис 1.5. Каталитический цикл Tdp1 [63]. (А) Нуклеофильная атака фосфодиэфирного остова атомом N2 имидазольного фрагмента His263. His493 отдает протон тирозильному фрагменту уходящей группы Top1. (Б) Ковалентный промежуточный фосфогистидин. (В) Вторая нуклеофильная атака через активированную His493 молекулу воды. (Г) Получение конечного 3'-фосфатного продукта и свободного Tdp1. (Д) Мутации SCAN-1 (H493R) приводят к накоплению интермедиата Tdp1-ДНК и нарушению скорости обмена Tdp1.

# 1.1.5 Различные субстраты Тdp1

На модельных ДНК было показано, что Tdp1 может гидролизовать 3'фосфотирозильную связь в различных структурах ДНК с предпочтением одноцепочечной ДНК. Tdp1 гидролизует 3'-фосфотирозильную связь между ДНК и пептидами с длиной в диапазоне от одного до более чем 100 остатков аминокислот. Наиболее эффективно фермент гидролизует 3'фосфотирозильную связь между длинными олигонуклеотидами и короткими пептидами (Puc. 1.6A) [109,113].

В работе [114] было показано, что Tdp1 способен гидролизовать фосфоамидную связь между пептидом и ДНК (Рис. 1.6В). Такая связь образуется при взаимодействии мутантной Tdp1 (SCAN1) и ДНК. Таким образом, Tdp1 дикого типа способна удалять повреждения, вызванные мутантной Tdp1 [114] (Рис. 1.6Б).

Также Tdp1 способна разрезать 5'-фосфотирозильные связи, хотя и гораздо менее эффективно, чем тирозил – ДНК – фосфодиэстераза 2 (Tdp2) [115,116].

Помимо фосфотирозильных и фосфоамидных связей, Tdp1 легко гидролизует широкий спектр физиологических и фармакологических 3'блокирующих повреждений (Рис. 1.6В – Д) [17]. Так, было показано, что Tdp1 способна проводить гидролиз 3'-фосфогликолятных концов и 3'дезоксирибозофосфатных концов (Рис. 1.6Д), которые являются типичными повреждениями ДНК, вызванными окислительными процессами, а также радиомиметиками, такими как блеомицин [115,117–119]. У нокаутных по Tdp1 клеток снижена способность восстанавливать окислительное повреждение ДНК, как в митохондриях, так и в ядре [120–122].

Тdp1 обладает нуклеозидазной активностью и может удалять терминальные 3'-дезоксирибонуклеотиды и 3'-рибонуклеотиды, когда они не фосфорилированы по 3'-концу (Рис. 1.6В) [114,123]. В исследовании [124] было показано, что Tdp1 удаляет широко используемые антивирусные и

противораковые нуклеозиды, такие как ацикловир (ACV), зидовудин (AZT) и цитарабин (Ara-C), сапацитабин (CNDAC) [125], абакавир [126] (Рис. 1.6Г).

Также Tdp1 может гидролизовать АП-сайты [127–129]. Эта активность особенно важна для восстановления повреждений ДНК, вызванных монофункциональными алкилирующими агентами, включая метилметансульфонат и темозоломид, и и ионизирующим излучением [22,115].

Наконец, высокоэффективная фосфодиэстеразная активность Tdp1 позволяет гидролизовать широкий спектр синтетических аддуктов ДНК, связанных с 3'-фосфатными концами, таких как биотин и различные флуорофоры [114,123,124,130,131], которые оказались полезными для создания тест-систем для скрининга ингибиторов Tdp1 (Рис. 1.6Ж).



Рис. 1.6. Субстраты Tdp1 [63]. Красные стрелки указывают сайты разрезания. (A) Классический субстрат Tdp1, в виде Top1 [12,101] и Top1 митохондриальной (Top1mt) [120]. (Б) 3'-фосфоамидные группы, которые, например, генерируются мутантной Tdp1 - SCAN-1 [114]. (В) 3'-основания (активность 3'-нуклеозидазы) [114]. (Г) Противовирусные препараты ацикловир (ACV), цитарабин (Ara-C) и зидовудин (AZT) [124], (Д) 3'-блокирующие повреждения (коричневые), возникающие в результате алкилирования оснований [22,114,115] или окисления [22,114,115], (Е) 5'-тирозильные концы [115,116], (Ж) Разнообразные 3'-субстраты используемые для скрининга ингибиторов Tdp1, такие как биотин и различные флуорофоры [114,123,124,130,131].

#### 1.2 Роль Tdp1 в системе репарации ДНК

ЛНК B живых организмов ежедневно образуется множество повреждений, и, несмотря на неотъемлемую и, несомненно, позитивную роль мутагенеза в процессе эволюционной изменчивости, повреждения ДНК приводят к нарушению процессов репликации и транскрипции, и, как следствие, к развитию онкологических, нейродегенеративных заболеваний, а старению организма. Чтобы противодействовать образованию также повреждений ДНК и сохранить целостность генетической информации, все организмы оснащены рядом механизмов репарации ДНК. В настоящее время выделяют пять основных путей репарации ДНК – эксцизионная репарация оснований (англ. Base excision repair, BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (англ. Nucleotide excision repair, NER), репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (англ. Mismatch repair, MMR), гомологичная рекомбинация (англ. Homologous recombination repair, HRR) и негомологичное соединение концов (англ. Non-homologous end joining, NHEJ) [132].

Корректная работа систем репарации ДНК играет ключевую роль в поддержании генетической стабильности в клетках. Нарушение работы систем репарации может приводить к накоплению неисправленных повреждений в ДНК, вследствие чего образуются различные мутации, ведущие к преждевременному старению и злокачественной трансформации клеток [132]. Однако, активная работа систем репарации может обусловливать устойчивость раковых клеток к химио- и радиотерапии, в связи с чем ферменты – участники и регуляторы систем репарации рассматриваются как многообещающие терапевтические мишени [11,133–135].

### 1.2.1 Восстановление одноцепочечных разрывов ДНК

Одноцепочечные разрывы ДНК (SSB) возникают с оценочной скоростью в десятки тысяч повреждений на клетку в день [136]. Образование одноцепочечных разрывов происходит в ходе различных процессов, например, SSB являются продуктами реакций между гидроксильным радикалом и сахарофосфатным оством ДНК, интермедиатами большинства

путей репарации, включая BER, и интермедиатами взаимодействия ДНК с белками, такими как топоизомераза 1 (Top1) [137,138].

Учитывая различные механизмы образования SSB, химический состав концов SSB может сильно варьировать. В их состав могут входить: 3'-5'фосфаты, З'-фосфогликоляты, З'-белки/пептиды, 5'-OH. аденозинмонофосфаты. SSB могут привести к остановке репликативных вилок и образованию односторонних DSB, а также к блокированию транскрипции [137]. Чтобы предотвратить последствия возникновения SSB, клетки снабжены специализированными ферментами, такими как АРЕ1, PNKP, Tdp1, апратаксин (APTX) и ДНК-лигазами, которые удаляют повреждения с соответствующих 3' и 5' концов. При этом различные белки служат резервными ферментами друг для друга, в то же время проявляя преимущественную активность на определенных типах повреждений. Учитывая частоту, с которой образуются SSB, предполагается, что вышеуказанные белки присутствуют на протяжении всего клеточного цикла и важны как для делящихся, так и для неделящихся клеток [101,137,139–145].

Одной из причин возникновения SSB является действие различных ДНК-повреждающих агентов. Метиметансульфонат (MMS) - алкилирующий агент, часто используемый в моделях генотоксического стресса. Данное соединение метилирует азотистые основания ДНК преимущественно в положениях  $N^7$ -дезоксигуанина и  $N^3$ -дезоксиаденина, что способствует образованию АП-сайтов [146]. В исследованиях [115] было показано, что Tdp1 участвует в репарации повреждений вызванных метилметансульфонатом (MMS). Нокаутная по Tdp1 клеточная линия DT40 (куриная клеточная линия бурсальной лимфомы) имела значительную чувствительность к MMS и умеренную чувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом внесение в эти клетки Tdp1 снижало чувствительность клеток к этим повреждающим агентам [115].

Другой препарат из группы алкилирующих агентов - темозоломид (TMZ), который метилирует пурины в ДНК, в результате чего образуются О<sup>6</sup>-метилгуанин, N<sup>7</sup>-метилгуанин и N<sup>3</sup>-метиладенин [147,148]. ТМZ широко

используется для лечения различных видов рака человека, но в первую глиобластомы [149–151]. очередь мультиформной Врожденная или приобретенная резистентность к TMZ представляет собой серьезное препятствие в лечении глиобластомы. В работе [22] было показано, что опухолевые клетки со сниженной экспрессией Tdp1 гиперчувствительны к алкилирующим агентам, и что истощение по Tdp1 сенсибилизирует резистентные к терапии клетки глиобластомы к темозоломиду. Так же в работе [152] было показано, что ингибирование Tdp1 соединениями на основе дегидроабиетил-мочевин повышает эффективности темозоломида В отношении перевиваемых клеток глиобластомы.

Также было показано, что Tdp1 участвует в удалении одноцепочечных разрывов ДНК, вызванных действием гамма-излучения [153]. Скорость (полнота) удаления повреждений напрямую зависела от наличия Tdp1 в клетках. Так, в клетках, взятых у пациентов со SCAN1, одноцепочечные повреждения, вызванные гамма-излучением, удалялись значительно менее эффективно по сравнению с клетками дикого типа. При этом такие повреждения удалялись менее эффективно, чем повреждения, вызванные действием СРТ. На основании этого было выдвинуто предложение, что в ходе облучения образуются одноцепочечные разрывы с различными продуктами на 3'-конце. Среди них около 30% составляют 3'-фосфогликоляты, которые Tdp1 гидролизует в 100 раз медленнее, чем 3'-фосфотирозины. Описанные результаты подчеркивают целесообразность ингибирования Tdp1 в ходе радиотерапии. Ингибиторы Tdp1 могут повысить эффективность радиотерапии, особенно в опухолях, которые обладают повышенным уровнем активности Tdp1 [153].

# 1.2.2 Эксцизионная репарация оснований

Эксцизионная репарация оснований исправляет различные необъемные повреждения, существенно не искажающие спираль ДНК, такие как дезаминированные, алкилированные основания, АР-сайты, окислительные

повреждения [154–157]. Эта система функционирует на всех этапах клеточного цикла [158].

Эксцизионная репарация оснований инициируется ДНК-гликозилазами, которые связываются с поврежденным основанием и катализируют расщепление N-гликозидной связи между основанием и 2'-дезоксирибозой [159,160] с последующим образованием AP-сайта, который также является цитотоксичным и должен быть подвергнут дальнейшей обработке [161,162]. Основной фермент, расщепляющий AP-сайты в клетках млекопитающих – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1). APE1 удаляет AP-сайт путём расщепления остова ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, фланкированного 3'-OH и 5'-дезоксирибозофосфатной (5'dRP-) группой [142].

Недавно было обнаружено, что Tdp1 человека так же обладает способностью гидролизовать AP-сайты, расположенные внутри цепи ДНК [127,163]. На основании это было предположено, что Tdp1 может замещать APE1 в процессе эксцизионной репарация оснований (англ. Base excision repair, BER). Это предположение подкрепляет тот факт, что Tdp1 обнаружили в комплексе с белками BER, такими как PNKP, Polβ, PARP 1, ДНК-лигазаIII/XRCC1 [2,127,163–166].

Механизм гидролиза АР-сайта с участием Tdp1 был изучен на модельной ДНК и включает несколько этапов. В начале Tdp1 связывается с 3'-концом ДНК, далее происходят конформационные изменения Tdp1, после чего она движется по ДНК в поисках АР-сайта. После того как AP-сайт был найден, цепь ДНК изгибается в месте повреждения [167]. Tdp1 вносит разрыв с образованием 5'-остатка и 3'-фосфатного конца. Далее, вероятно, 5'-дезоксирибоза самопроизвольно гидролизуется из-за своей нестабильности, и в результате реакции образуется мононуклеотидная брешь с 3'- и 5'-фосфатами [163], в отличие от APE1, которая гидролизует AP-сайт с образованием разрыва с 3'-OH- и 5'-фосфатными группами [168,169].

Также в работе [167] было показано, что скорость гидролиза 3'нуклеозидной связи и АР-сайта зависит от структуры ДНК. Так, в

одноцепочечной ДНК скорость гидролиза 3'-нуклеозидной связи и АР-сайта имеют близкие значения, тогда как в случае двухцепочечной ДНК расщепление АР-сайта происходит в два раза быстрее, чем расщепление 3'нуклеозидной связи. Следовательно, реакция расщепления АР-сайта является важной функцией Tdp1, которая может включать независимый от APE1 путь репарации AP-сайта [167].

Было показано, что способность Tdp1 гидролизовать АР-сайты зависит от структуры ДНК [128]. Фермент Tdp1 более активен в расщеплении АРсайта внутри выпетливания ДНК (bubble DNA) по сравнению с АР-сайтом, который находится в одноцепочечной ДНК (ssDNA). Tdp1 быстрее АР-сайт, расположенный напротив объемного гидролизует аддукта флуоресцеина (Flu) в двуцепочечной ДНК (dsDNA), чем АР-сайт, содержащийся в dsDNA без такого аддукта. Обобщая, каталитическая активность Tdp1 в отношении гидролиза АР-сайта увеличивается в следующем порядке: АР-сайт в двуцепочечной ДНК(dsAP-DNA), АР-сайт в двуцепочечной ДНК, находящийся напротив Flu (dsAP-DNA/Flu), AP-сайт в одноцепочечной ДНК (ssAP-DNA), АР-сайт внутри выпетливания ДНК (dsAP-DNA/bubble) [128]. Способность Tdp1 гидролизовать АР-сайты также зависит от положения этих сайтов относительно начала ДНК. Tdp1 предпочтительно АР-сайты, расположенные в АР-сайты, расщепляет середине цепи. расположенные рядом с 3'-концом, устойчивы к расщеплению Tdp1, несмотря на то, что фермент обладает способностью удалять 3'-терминальный нуклеозид [128].

Также были сопоставлены 3'-нуклеозидазная активность и скорость удаления AP-сайтов Tdp1 для ssDNA и dsDNA. В случае ssDNA обе активности имеют сопоставимые скорости, однако в случае dsDNA удаление AP-сайтов происходит в два раза быстрей, чем гидролиз 3'-терминальных остатков. На основании этого был сделан вывод, что удаление AP-сайтов является вспомогательной функцией Tdp1, которая не зависит от основного репарационного пути AP-сайтов с участием APE1 [167].

Были проведены исследования способности мутантных по каталитическим гистидинам форм Tdp1 H493R и H263A расщеплять APсайты. Один из мутантных ферментов был с заменой гистидина на аргинин в позиции 493 (H493R), такая замена связана с заболеванием SCAN1. Во втором мутанте гистидин в позиции 263 заменен аланином (H263A). Мутанты сохраняют способность связываться с ДНК, содержащей AP-сайт, с такой же аффинностью, как Tdp1 дикого типа, однако являются каталитически неактивными в отношении процессинга AP-сайтов [128].

### 1.2.3 Репарация двуцепочечных разрывов ДНК

Двуцепочечные разрывы (DSBs) являются одной из наиболее тяжелых форм повреждения ДНК. Они могут быть вызваны окислительным повреждением, ионизирующим излучением или радиомиметическими препаратами, такими как блеомицин [170]. Также двуцепочецные разрывы встречаются в ходе нормальной жизнедеятельности клетки, например, в процессе рекомбинации. Неточная репарация или отсутствие репарации двуцепочечных разрывов могут приводить к различным мутациям и хромосомным перестройкам. Такие изменения могут иметь онкогенный потенциал. В случае, если DSBs не восстановлены, то активируются процессы клеточной гибели [132,171]

Репарация двуцепочечных разрывов делится на два основных пути: гомологичная рекомбинация (HR) и негомологичное соединение концов (NHEJ) [172].

#### Негомологичное соединение концов (NHEJ)

Негомологичное соединение концов является механизмом репарации двуцепочечных разрывов у высших эукариот, который работает независимо от стадии клеточного цикла [173]. NHEJ происходит либо посредством лигирования, если на концах не содержится групп, блокирующих этот процесс, либо через деградацию цепи с повторным синтезом участков ДНК и последующим лигированием [174].
Большинство двуцепочечных разрывов, образующихся в результате воздействия повреждающих ДНК агентов, имеют химически измененные концы, которые требуют обработки перед лигированием [173,175]. Поскольку удаление химически поврежденных оснований является очень важным для восстановления целостности ДНК, клетки имеют несколько механизмов процессинга 3'-концов ДНК. Один из механизмов процессинга поврежденных 3'-концов осуществляется благодаря Tdp1. Удаление поврежденного 3'нуклеозида с помощью Tdp1 оставляет 3'-фосфат, который позже может быть удален с помощью PNKP [109,110].

Участие Tdp1 в NHEJ связано с взаимодействием с основными факторами NHEJ белками XLF и Ku70/80. Было показано что Tdp1 взаимодействует с Ku70/80 и стимулирует связывание этого белка с ДНК, в следствии чего опосредованно стимулируется активность ДНК-зависимой протеинкиназы [176]. Так же и XLF стимулирует связывание Tdp1 с ДНК с последующим образованием комплексов Tdp1/XLF/ДНК [176]. Такое стимулирование ферментативной активности Tdp1 наблюдается преимущественно в отношении двуцепочечных разрывов по сравнению с одноцепочечными разрывами ДНК [176].

Образование мультипротеиновых комплексов с факторами NHEJ позволяет Tdp1 оставаться на открытом 3'-конце и дополнительно защищать его за счет прочного связывания с фосфатом, до прихода ДНК-РК. А поскольку Ku70/80 и XLF являются одними из первых факторов, рекрутируемыми в начале NHEJ, это указывает на роль Tdp1 на ранних стадиях NHEJ у млекопитающих [176].

В исследовании [177] было показано, что в нокаутных по Tdp1 клетках снижается количество репарируемых двуцепочечных разрывов ДНК, а также в таких клетках возрастает вероятность инсерций. При этом добавление к нокаутным клеткам функционирующей Tdp1 приближало эффективность работы NHEJ к клеткам дикого типа. Однако, добавление к таким же клеткам мутантной Tdp1 фосфорилированной по серину (Tdp1-S81E) не влияло на

работу NHEJ, и эффективность оставалась на уровне нокаутных клеток. Все это еще раз говорит о важной роли Tdp1 в репарации двуцепочечных разрывов [177].

### 1.3. Tdp1 как мишень противораковой терапии

Изначально Tdp1 был открыт как фермент, способный гидролизовать 3'фосфотирозильную связь между Top1 и 3'-концом ДНК [12]. Этот фермент активно изучался, и было обнаружено, что помимо гидролиза 3'фосфотирозильной связи Tdp1 может гидролизовать широкий спектр физиологических и фармакологических 3'-блокирующих повреждений [17], а так же обладает способностью разрезать 5'-фосфотирозильные связи [115,116].

Использование Tdp1 в качестве мишени в противораковой терапии для усиления действия ингибиторов Top1 было предложено командой Nash [12] еще в 1996 г. Позже было показано, что повышенный уровень экспрессии Tdp1 связан с хромосомной нестабильностью [178] и наблюдается в таких видах рака как немелкоклеточный рак легкого [179], колоректальный рак [180], а так же в клеточных линиях рака молочной железы [181] и некоторых рабдомиосаркомах [182]. Также гиперэкспрессия гена Tdp1 защищает клетки от действия как камптотецина и его производных, направленных на подавление активности Top1 [183], так и от этопозида, направленного на подавление активности Top2 [183]. В свою очередь, клеточные линии человека, имеющие мутацию SCAN1 и мыши, нокаутные по гену Tdp1, гиперчувствительны к камптотецину [121,184–186].

Показано также, что подавление активности Tdp1 приводит к гиперчувствительности клеток не только к камптотецину и его производным, но и повышает чувствительность клеток к другим ДНК-повреждающим агентам. Так подавление активности белка Tdp1 повышает чувствительность клеток к противораковым препаратам темозоломиду [22] и блеомицину, а так же перекиси водорода, ионизирующему излучению и MMS [115]. В клетках глиобластомы, устойчивых к химиотерапии на основе темозоломида, снижение экспрессии гена Tdp1 приводило к заметной сенсибилизации клеток глиобластомы к темозоломиду [22].

Все вышесказанное свидетельствует о том, что ингибирование активности Tdp1 может увеличить цитотоксичность различных противоопухолевых препаратов, направленных на повреждение опухолевой ДНК, а также помочь в борьбе с лекарственно устойчивыми опухолями. Терапевтическим эффектом от совместного применения таких веществ и ингибиторов Tdp1 может быть более активное подавление роста раковых клеток и/или снижение дозы традиционной химиотерапии.

## 1.3.1 История исследования игибиторов Tdp1

#### 1.3.1.1 Неорганические ингибиторы

Первыми известными ингибиторами Tdp1 являются оксоанионы переходных металлов, такие как ортованадат  $[VO_4]^{-3}$  и вольфрамат  $[WO_4]^{-}$ . Ортованадат натрия ингибировал Tdp1 со значением IC<sub>50</sub> 4 мМ [68]. Однако такие ингибиторы имеют широкий спектр активности и не являются специфическими ингибиторами по отношению к Tdp1, поэтому они не могут использоваться в качестве фармакологических ингибиторов [19].

Несмотря на то, что оксоанионы переходных металлов не используются в качестве ингибиторов Tdp1, с их помощью была изучена структура каталитического центра Tdp1 и механизм связывания Tdp1 с субстратом. Фермент кристаллизовали совместно с оксоанионом ванадата и/или вольфраматом, после чего полученный кристалл изучали методом рентгеноструктурного анализа [66,68].

# 1.3.1.2 Аминогликозидные антибиотики и ингибиторы рибосом

Одними ИЗ первых фармакологических ингибиторов Tdp1 были аминогликозидные антибиотики. Ранее было показано, что эти антибиотики являются ингибиторами рибосом, а также подавляют активность фосфолипаз семейства D (PLD) [187,188]. Так как Tdp1 относится к семейству PLD [16,66], то данные антибиотики были проверены на способность к ингибированию Tdp1. антибиотики Было показано, ЧТО такие как аминогликозид, аминоциклитол, тетрациклин, пуромицин, тиострептон и т.д. способны

ингибировать как рибосомы, так и Tdp1 [23]. Аминогликозиды включают, например, неомицин 1, паромомицин 2, ливидомицин 3, нетилмицин 4 (Рис. 1.7). Было показано, что неомицин ингибирует реакцию взаимодействия Tdp1 как с одноцепочечным, так и с двуцепочечным субстратами, однако немного лучше в случае с ДНК-дуплексом. В то же время акларубицин (антрациклиновый препарат, применяемый для лечения раковых заболеваний) способен ингибировать лишь реакцию с двуцепочечным субстратом [23].



Рис. 1.7. Аминогликозиды в роли ингибиторов Tdp1: 1 – неомицин, 2 – паромомицин, 3 – ливидомицин, 4 – нетилмицин [23].

#### 1.3.1.3 Фурамидин и диамидины

Для того, чтобы ускорить процесс поиска ингибиторов Tdp1, группой исследователей был предложен новый метод чувствительного высокопроизводительного электрохемилюминесцентного анализа [131]. В ходе апробации данного метода было проверено 1981 соединение. Среди проверенных соединений было выбрано производное бисбензамидина, принадлежащее к семейству диамидинов – фурамидин **5**, способный ингибировать Tdp1 (Puc. 1.8). Сравнение с родственными диамидинами показало, что фурамидин ингибировал Tdp1 более эффективно, чем беренил **6**, в то время как пентамидин **7** был неактивен.



Рис. 1.8. Фурамидин и диамидины в роли ингибиторов Tdp1: **5** – фурамидин, **6** – беренил, **7** – пентамидин [131].

низких микромолярных Ингибирование Tdp1 при концентрациях фурамидина наблюдалось как для одноцепочечных, так и для двухцепочечных субстратов, но было немного сильнее с двуцепочечной ДНК. На кинетику ингибирования Tdp1 фурамидином влияли соотношение препарата и фермента и продолжительность реакции. Так же было высказано предположение, что фурановый линкер важен для ингибирования активности Tdp1, потенциально путем прямого взаимодействия с ДНК или Tdp1, или с обоими, или путем стабилизации общей кривизны соединения [131].

иринотекан Ингибитор Tdp1 Top1 И ингибитор фурамидин синергетически подавляют волчаночный нефрит у мышей. По сравнению с лечением одним агентом, одновременное лечение низкими лозами иринотекана и фурамидина (1 мг / кг 3 раза в неделю) значительно увеличило выживаемость мышей [189]. Следовательно, влияние на релаксацию ДНК ферментами Top1 и Tdp1 и их ингибиторами может быть многообещающим подходом для разработки новых целевых методов лечения системной красной волчанки [7].

#### 1.3.1.4. Производные стероидов

Используя тот же высокоэффективный метод скрининга соединений, которым были выявлены фурамидин и диамины в качестве ингибиторов, также был обнаружен новый потенциальный ингибитор Tdp1 в виде C21замещенного производного прогестерона **8** NSC 88915 (Рис. 1.9) [190].



8. R = Br, IC<sub>50</sub> = 7.7  $\mu$ M, R = H, Me, NO<sub>2</sub>, F, Cl

Рис.1.9. Общая структурная формула ингибиторов Tdp1 на основе производных стероидов [190].

Анализ функциональных групп этого соединения показал, какие компоненты необходимы для ингибирования активности Tdp1. Для имитации стероидного и фенилсульфонилового остатка были использованы прогестерон и *p*-толуолсульфонат, соответственно. Прогестерон обладает слабой ингибирующей активностью, в то время как *p*-толуолсульфонат не активен в концентрациях до 1 мМ. Следовательно, для проявления ингибиторной активности B отношении Tdp1 требуются обе части молекулы **8** [190].

Замена Br в соединении NSC 88915 на различные заместители ( $R = H, CH_3$ , NO<sub>2</sub>, F и Cl) приводила к минимальным изменениям в ингибировании Tdp1 (~ 3-кратное изменение значений IC<sub>50</sub>) (Рис. 1.9). Такие результаты показали, что ингибирование Tdp1 зависит от присутствия фенильного кольца, присоединенного через сложноэфирную сульфониловую связь в C21положении этих стероидных производных. Было высказано предположение, что эти соединения являются конкурентными ингибиторами, имитирующими

олигонуклеотидпептидный субстрат Tdp1. Эти стероидные производные предоставили новую основу для разработки низкомолекулярных ингибиторов Tdp1 [190].

## 1.3.1.5 Миметики фосфотирозина

группой исследователей был разработан В дальнейшем той же автоматизированный метод поиска ингибиторов Tdp1 с использованием технологии AlphaScreen [191]. В ходе его применения были найдены четыре новых ингибитора Tdp1: Gα-специфичный антагонист G-белков сурамин 9 и его аналог NF449, метил-3,4-дефостатин 10 и ауринтрикарбоновая кислота 11 (Рис. 1.10). Ауринтрикарбоновая кислота является эффективным ингибитором различных ДНК-взаимодействующих ферментов. Сурамин, NF449 и метил-3,4-дефостатин — это миметики основного субстрата Tdp1 фосфотирозина. Метил-3,4-дефостатин, стабильный аналог дефостатина (1,4-дигидрокси-Nметил-N-нитрозоанилин), ингибирует Tdp1 со значением IC<sub>50</sub> 0,36 мкМ. Напротив, дефостатин, который отличается от метил-3,4-дефостатина положением одной из его гидроксильных групп, показал низкий уровень ингибирования Tdp1 в том же диапазоне концентраций. Таким образом, положение двух гидроксильных групп является критическим ЛЛЯ ингибирования Tdp1. Сурамин и ауринтрикарбоновая кислота ингибировали Tdp1 со значениями IC<sub>50</sub> 5 мкМ и 12 нМ, соответственно. Следует отметить, что метил-3,4-дефостатин содержит ароматическое кольцо, связанное с негидролизуемой фосфорилмиметической группой, которое имеет структурное сходство предпочтительным тирозин-фосфорильным с субстратом Тdp1 [191].



11. IC<sub>50</sub> = 0,36 мкМ

Рис. 1.10. Миметики фосфотирозина в роли ингибиторов Tdp1: 9 – сурамин, 10 ауринтрикарбоновая кислота –, 11 – метил-3,4-дефостатин [191].

## 1.3.1.6 Инденоизохинолины

Одними из первых двойных ингибиторов Top1-Tdp1 были ингибиторы, основанные на химическом классе инденоизохинолинов [33]. Изначально была обнаружена активность инденоизохинолинов в отношении Top1 [192]. После проведенного скрининга библиотеки инденоизохинолинов было так же показано, что они могут обладать ингибиторной активностью в отношении Tdp1 [33]. На основании этого была предложена идея оптимизировать структуру данных соединений, что бы добиться ингибирования как Top1, так и Tdp1[33]. Такие двойные ингибиторы могли бы одновременно вызывать повреждение ДНК и препятствовать ее восстановлению.

Инденоизохинолины с короткими пропиловым и бутиловым линкерами были эффективны как против Tdp1 (IC<sub>50</sub> = 29,5 мкМ), так и против Top1 (IC<sub>50</sub> = 22,3 мкМ) (Рис. 1.11) [33]. Полиамино-бис(инденоизохинолин) **14** в настоящее время является наиболее сильным двойным ингибитором Top1-Tdp1 (значение IC<sub>50</sub> для Top1 сравнимо с камптотецином, а IC<sub>50</sub> для Tdp1 человека 1,52 мкМ) [33].



Рис. 1.11. Инденоизохинолины (12, 13) как двойные ингибиторы Tdp1 и Top1. 14 - полиамино-бис(инденоизохинолин), значения IC<sub>50</sub> приведены для Tdp1 [33].

Для улучшения ингибиторных свойств соединений инденоизохинолины были модифицированы с помощью различных функциональных групп. Было показано, что производные N-(3-аминопропил) инденоизохинолина **15** (R1 = нитрогруппа, R2 = оксиметильная группа, R3 = H и R4= аминопропильная боковая цепь) и **16** (R1 = аминогруппа, остальные боковые цепи аналогичны цепям **15**) ингибируют Tdp1 в микромолярных концентрациях с IC<sub>50</sub> = 11 мкМ (**15**) и 6,7 мкМ (**16**) (Рис. 1.12). Кроме того, они являются потенциальными ядами Top1 с высокой антипролиферативной активностью [27].



Рис. 1.12. Производные N-(3-аминопропил) инденоизохинолина,  $IC_{50} = 11$  мкМ (15) и 6,7 мкМ (16) значения  $IC_{50}$  приведены для Tdp1[27].

Далее на основании компьютерного моделирования были разработаны соединения с модификацией в О-2-положении инденоизохинолинового

каркаса, в качестве двойных ингибиторов Top1-Tdp1. Три производных, **17** (R = N(CH3)2), **18** (R = NHCH2CH3) и **19** (R = пиперидин) (Рис. 1.13), продемонстрировали хорошую ингибирующую активность в отношении Top1 и Tdp1, но проявили значительную цитотоксичность [31].



Рис. 1.13. Инденоизохинолины 17 (R = N(CH3)2), 18 (R = NHCH2CH3) и 19 (R = пиперидин), 20-3-нитро-8-гидрокси-инденоизохинолин, 3-R-8-гидроксиинденоизохинолинов 21 (R=F), 22 (R=Cl) [31].

В следующем исследовании были синтезированы инденоизохинолины, содержащие 3-нитро-заместитель. Наиболее эффективным ингибитором Top1 и Tdp1 оказался 3-нитро-8-гидрокси-инденоизохинолин **20** (значение IC<sub>50</sub> в диапазоне 12-37 мкМ, против Tdp1) (Рис. 1.13), так же он продемонстрировал высокую цитотоксичность [28].

Во время изучения 3-нитро-8-гидроксиинденоизохинолинов были так же получены соединения, содержащие в положении 3 галогены вместо нитрогруппы. Соединения, содержащие фтор **21** и хлор **22** (Рис. 1.13), ингибировали как Top1, так и Tdp1 (значения IC<sub>50</sub> для Tdp1 8,7 и 6,3 мкМ соответственно). Так же эти два соединения ингибировали Tdp2 со значениями IC<sub>50</sub> 10,2 и 9,1 мкМ [193]. Изучение цитотоксичности соединений с 3-фтором

и 3-хлором показало, что такие соединения являются менее токсичными по сравнению с соединениями с 3-нитрогруппой [194].

Вещества с двойной или тройной ингибирующей активностью в одном низкомолекулярном соединении потенциально могут иметь значительные преимущества перед лекарствами, действующими на одну мишень. Однако зачастую такие соединения обладают высокой собственной цитотоксичностью, что может затруднить подбор оптимальной дозировки и их использование в комплексе с другими противоопухолевыми препаратами.

## 1.3.1.7 Производные варацина

Нашим коллективом были исследованы производные варацина, которые были выбраны на основе данных молекулярного докинга и обладали высоким сродством к активному центру Tdp1 [59]. Варацин является бициклическим сераорганическим соединением, содержащим необычное пентатиепиновое кольцо, которое может взаимодействовать с ДНК. Впервые данное соединение было выделено из морской асцидии [195]. Было показано, что варацин и его аналоги обладают антимикробными и противоопухолевыми свойствами [196,197].

азотсодержащими Аналоги варацина гетероциклическими с заместителями в боковой цепи продемонстрировали хорошую активность и подавляли действие Tdp1 со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 1,3-6,0 мкМ. Соединения с этиленовым линкером между амидной группой и гетероциклом были несколько менее активны, чем аналоги с метиленовым линкером. В случае морфолинового заместителя разница в уровне активности В зависимости от длины линкера была незначительной, значения IC<sub>50</sub> составляли 1,3 и 1,6 мкМ, соответственно (Рис. 1.14, соединения 24, 25). Наиболее эффективным ингибитором было соединение 23, содержащее ациклический дибутиламиновый заместитель, которое было активно в наномолярной концентрации (IC<sub>50</sub>=0,22 мкМ) (Рис. 1.14). Согласно данным молекулярного моделирования, эффективность соединения 23 объясняется его высокой

липофильностью и большей конформационной гибкостью, чем у его аналогов, что позволяет ему эффективно связываться с активным центром Tdp1 [59].





Дальнейшего развития работы с производными бензапентатиепина не получили, т.к. не было обнаружено синергического цитотоксического эффекта с СРТ или его производными (неопубликованные данные, О.Д.Захарова).

# 1.3.1.8 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 И противовирусной активностями [198]. Кроме того, введение адамантильного фрагмента в молекулы лекарственных препаратов нередко приводит к снижению токсичности и значительному улучшению терапевтического эффекта. изменением пространственного ЧТО связано с строения И растворимости в полярных и неполярных средах [198].

Нашим коллективом была изучена способность различных производных адамантана ингибировать Tdp1. Среди них были соединения, синтезированные на основе дизадамантана и аминоадамантана, а также соединения, содержащие монотерпеноидные фрагменты, связанные с остатком адамантана различными линкерами [41–44,46].

Аналоги адамантана – диазаадамантаны, содержат атомы азота в узлах молекулы, что улучшает их растворимость в воде по сравнению с адамантами, содержащими только углерод и водород [199,200]. Введение во второе остова положение диазаадамантанового подвижного алифатического заместителя, такого как цитронеллаль (соединение 26, Рис. 1.15) или цитраль (27), обеспечивает подавление активности Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций (IC<sub>50</sub> 14,8  $\pm$  1,6 и 16,7  $\pm$  0,6 мкМ, соответственно) (Рис. 1.15) [41]. Соединение, имеющее более короткий и более жесткий заместитель, кротоновый альдегид, не влияло на активность Tdp1 в концентрации 100 мкМ. Соединение с объемным заместителем – бициклическим остатком миртеналя - также не влияло на активность Tdp1 при 100 мкМ концентрации. Соединение, полученное из производного моноциклического альдегида αпинена, имело значительно меньшее влияние на активность фермента по сравнению с ациклическими производными (IC<sub>50</sub> 67,8  $\pm$  4,6 мкМ). Вероятно, это связано с наличием более жесткого четырехчленного кольца в структуре соединения по сравнению с ациклическими производными [41].

Таким образом, было показано, что для ингибирования активности Tdp1 необходим протяженный и гибкий ациклический заместитель во 2-м положении [41].



**30**. IC<sub>50</sub> = 0,86 мкМ

**31**. IC<sub>50</sub> = 0,92 мкМ

Рис. 1.15 Производные адамантанов в качестве ингибиторов Tdp1: 26 и 27 – дизаадамантаны, 28 – адамантан с бициклическим заместителем, 29 – аминоадамантан с ациклическим заместителем, 30 и 31 – адамантаны в составе сложных эфиров [41,42,44].

Далее были изучены соединения, состоящие из монотерпеноидных и аминоадамантановых фрагментов. Производное адамантана с бициклическим заместителем и пинановым каркасом **28** ингибирует Tdp1 более эффективно, чем описанные выше (IC<sub>50</sub> 6 мкМ). Однако самую высокую активность из всех протестированных производных показал 2-аминоадамантан, содержащий ациклический терпеноид цитронеллаль **29** (IC<sub>50</sub> 3,5 мкМ) (Рис. 1.15).

Опираясь на полученные в работе [42] результаты, были изучены структурные аналоги изученных аминов - имины сочетающие 1-

аминоадамантановый и (+)-миртеналевый фрагменты, а также содержащие цитронеллаль и 2-аминоадамантан. Однако данные соединения были нестабильны при 20–25°С. Поэтому были синтезированы и испытаны имины, более устойчивые при 20–25°С, содержащие гидроксицитронеллаль и кетоальдегиды - продукты озонолиза α-пинана. Среди протестированных соединений активность проявляли как 1-аминоадамантаны, так и 2аминоадамантаны. Природа связи между адамантановым и терпеноидным фрагментами (амин или имин) и абсолютная конфигурация монотерпеновых центров асимметрии оказались важными для проявления ингибиторных свойств соединений [43].

Среди сложных эфиров производные, содержащие ациклический монотерпеновый заместитель, показали себя лучшими ингибиторами в сравнении с производными, содержащими моноциклический или бициклический монотерпеновый заместитель. Отсутствие ненасыщенной связи С-С около сложноэфирной группы у ациклического монотерпенового заместителя приводит к усилению ингибирования. Соединения **30** и **31** (Рис. 1.15) вызывали снижение активности фермента Tdp1 на 50% при концентрациях 0,86 мкМ и 0,92 мкМ, соответственно [44].

Следующей была изучена комбинация адамантана с фрагментами монотерпенов, связанных через 1,2,4- триазол и 1,3,4-тиадиазол (Рис. 1.16) [46].



Рис. 1.16 Общие структурные формулы для производных адамантана с 1,2,4-триазолом и 1,3,4-тиадиазолом [46].

Было обнаружено, что все соединения проявляют ингибирующую активность, а некоторые обладают субмикромолярной активностью (диапазон

IC<sub>50</sub>0,35–0,57 мкМ) [46]. Сравнение веществ со схожей структурой показало, что включение 1,3,4-тиадиазольного ядра в амиды повышает ингибирующие свойства соединений в отношении Tdp1. Замена амидной связи или тиоамидной связи на 1,2,4-триазольный линкер также приводит к усилению эффективности ингибирования Tdp1 [46].

Для наиболее эффективных производных адамантанов в каждом подклассе была измерена цитотоксичность в отношении различных линий опухолевых клеток. МТТ-тест показал, что многие соединения обладают низкой цитотоксичностью (величина CC<sub>50</sub> – средняя цитотоксическая концентрация, вызывающая 50% гибель клеток, > 50 мкМ) [42,44–46].

Так же была изучена способность производных адамантана усиливать цитотоксический эффект топотекана [42,44,46]. 2-Аминодамантан, содержащий ациклический цитронеллаль, усиливает действие топотекана на клетки рака толстой кишки человека HCT116 более чем в 5 раз [42].

Среди производных сложных эфиров соединение с ациклическим монотерпеновым заместителем (3,7-диметилоктанолом) так же усиливает действие топотекана в отношении опухолевой линии альвеолярных базальных эпителиальных клеток (аденокарцинома легких) А549 [44]. Среди адамантанов с триазольными линкерами было обнаружено, что производные цитраля, α-пинена и цитронелловой кислоты обладают сенсибилизирующим действием в сочетании с топотеканом на клеточные линии рака шейки матки HeLa и аденокарциномы толстой кишки HCT-116 [46].

Таким образом, при изучении адамантановых производных было показано, что для более эффективного ингибирования Tdp1 соединения должны содержать гибкий заместитель. Среди всех изученных производных наиболее активными были соединения с терпеновыми заместителями, все они подавляют Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций, а некоторые продемонстрировали подавление активности Tdp1 в низких микромолярных концентрациях. Так же было изучено влияние различных линкеров на ингибиторные характеристики соединений. Производные, содержащие

триазольные и тиадиазольные линкеры, продемонстрировали заметное повышение эффективности по сравнению с амидами и тиоамидами. Многие из производных адамантана обладают низкой цитотоксичностью в отношении перевиваемых опухолевых линий, а некоторые усиливают цитотоксический эффект топотекана *in vitro*.

#### 1.3.1.9 Производные карена

Нашим коллективом были изучены в качестве ингибиторов Tdp1 производные (+)-3-карена с гексагидроизобензофурановым и 3- оксабициклононановым остовами. Карен – бициклический терпен, является основным компонентом скипидаров, получаемых из различных видов сосен. [51].

Соединения с ароматическими и алкильными заместителями не проявили активности в отношении Tdp1, тогда как значения IC<sub>50</sub> для веществ с гетероциклическими заместителями варьировали от 0,65 до 28 мкМ. Добавление брома к гетероциклу значительно увеличивало ингибирующую способность. Так, соединение с атомом брома в 5-положении тиофенового кольца имело наилучшую активность в субмикромолярном диапазоне среди гексагидроизобензофуранов (IC<sub>50</sub> 0,75 мкМ) (Рис. 1.17, соединение **32**). Из соединений с 3-оксабицикло [3.3.1] нонановым остовом наиболее активным было 4-бромзамещенное соединение (IC<sub>50</sub> 0,65 мкМ) (Рис. 1.17, соединение **33**) [51].





**33**. IC<sub>50</sub> = 0,65 мкМ

Рис. 1.17. Производные карена в качестве ингибиторов Tdp1[51].

Для изучения влияния Tdp1 на выживаемость клеток с помощью системы CRISPR-Cas9 была создана линия HEK293FT с дефицитом Tdp1 (Tdp1-/-). Нокаутную линию сравнивали с клетками дикого типа HEK293FT WT. Клетки HEK293FT Tdp1-/- показали более высокую чувствительность к ингибитору Top1 – топотекану, что подтверждает вклад Tdp1 в выживаемость клеток в присутствии этого препарата [51].

Анализ собственной цитотоксичности синтезированных соединений был проведен на клетках дикого типа и Tdp1-дефицитных клетках с помощью колориметрического теста. Интересно, что цитотоксичность отсутствовала или была незначительной в диапазоне концентраций (0,08–100 мкМ) для всех соединений в обеих клеточных линиях [51].

Для изучения синергетического ингибиторов влияния на цитотоксический эффект топотекана было выбрано два соединения, основываясь на их способности ингибировать Tdp1 и собственной низкой цитотоксичности. Концентрации топотекана, близкие к IC<sub>50</sub>, были выбраны, основываясь на данных колорометрического теста (30 нМ для клеток Tdp1-/и 200 нМ для НЕК293FT WT). Было обнаружено, что усиление действия топотекана в присутствии ингибитора Tdp1 наблюдалось только для клеточной линии WT и полностью отсутствовало в мутантных клетках. Такой результат может говорить о том, что синергетическое действие топотекана совместно с ингибиторами обусловлено подавлением активности Tdp1 выбранными ингибиторами. Так же можно предположить, что Tdp1 является основной мишенью для данного типа ингибиторов, в связи с тем, что дополнительного увеличения токсичности в мутантных клетках не наблюдалось [51].

# 1.3.1.10 Производные дезоксихолевой кислоты

Ингибиторы Tdp1 на основе каркаса желчных кислот (ЖК) были найдены с помощью виртуального скрининга. Из библиотеки натуральных продуктов «InterBioScreen» для скрининга на основании оценки связывания

лигандов с активным центром фермента были выбраны соединения для дальнейшего изучения [52].

ЖК, стероидные молекулы, синтезируемые организмом из холестерина, широко распространены в природе и обладают высокой энантиомерной чистотой и широким спектром нативной биологической активности (противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой, иммуностимулирующей) [201–203].

В качестве исходных соединений для исследований были выбраны коммерчески доступные ЖК, содержащие две гидроксигруппы в стероидном каркасе, а именно урсодезоксихолевая, хендодезоксихолевая и дезоксихолевая кислоты. Поскольку производные всех трех желчных кислот обладали сравнимой ингибиторной активностью по отношению к Tdp1 (значения IC<sub>50</sub> ~2,6 мкМ), для дальнейших исследований была выбрана наиболее дешевая дезоксихолевая кислота [52].

Амиды, полученные из дезоксихолевой кислоты и содержащие триптамин, *пара*-броманилин, аминоадамантан, фрагменты бутилфенола проявляли высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 0,29–0,47 мкМ. Наиболее эффективным амидом дезоксихолевой кислоты было соединение **34**, содержащее 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил (IC<sub>50</sub> 0,29 мкМ) (Рис. 1.18) [52].



Рис. 1.18. Структурная формула амида дезоксихолевой кислоты с 3,5-ди*трет*-бутил-4-гидроксифенилом в качестве заместителя [52].

Исследования цитотоксической активности диацетоксипроизводных дезоксихолевой кислоты на клетках аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и карциномы толстой кишки человека (HCT116) показали, что токсичность соединений отсутствовала или была незначительной в концентрациях до 100 мкМ [52].

Для изучения влияния функциональных групп стероида на активность Tdp1 были синтезированы и протестированы производные *пара*броманилидов дезоксихолевой кислоты, содержащие ацетокси-, гидрокси-, карбонильные группы, а также эфирные группы (метокси-, этокси- и пропилокси-) в остове дезоксихолевой кислоты [53].

Было обнаружено, что соединения, содержащие ацетокси-, гидрокси- и оксогруппы, ингибируют Tdp1 в диапазоне концентраций IC<sub>50</sub> 0,62–1,24 мкМ (Рис. 1.19, соединение **35**). Дикарбонильные соединения ингибируют Tdp1 со значениями IC<sub>50</sub> = 1,12 и 1,54 мкМ (Рис. 1.19, соединение **36**). Соединения, содержащие простые эфирные группы, проявляли способность ингибировать Tdp1 в диапазоне концентраций IC<sub>50</sub> 0,27-1,4 мкМ. Соединение, содержащее 3,12-диметоксипараброманилидный заместитель, продемонстрировало самую высокую активность (IC<sub>50</sub> 0,27 мкМ) (Рис. 1.19, соединение **37**) [53]. Таким образом, соединения, содержащие эфирные группы в остове дезоксихолевой кислоты, показали себя как наиболее эффективные ингибиторы Tdp1.



**37**. IC<sub>50</sub> 0,27 мкМ

Рис. 1.19. Производные *пара*-броманилидов дезоксихолевой кислоты в качестве ингибиторов Tdp1 [53].

Изучение цитотоксической активности пара-броманилидов дезоксихолевой кислоты в линиях опухолевых клеток показало, что соединения нетоксичны для линии А549 (аденокарцинома легких), тогда как цитотоксичность для линий НСТ116 (карцинома толстой кишки человека) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) напрямую зависит OT функциональной группы в остове дезоксихолевой кислоты. Соединения с гидроксильной группой оказались более токсичными, чем производные с трансформированной ацетокси-, оксо- и метоксигруппой [53].

Для изучения влияния объемных заместителей, присоединенных к гидроксильным группам в каркасе ЖК, на ингибиторную активность соединений, были синтезированы соединения, содержащие бензиловый, эфирный или ароматический фрагмент (*пара*-бромбензол, индол или 2,6-бис*трет*-бутилфенол), присоединенный к стероиду через различные линкеры

[54]. Все соединения ингибировали Tdp1 в субмикромолярном диапазоне концентраций (значения IC<sub>50</sub> 0,23–1,2 мкМ) и проявили низкую собственную токсичность на клеточных линиях HEK293A (почки эмбриона человека) и HeLa (карцинома шейки матки). Производное триптамида, содержащее бензилоксизаместитель в положении C-3 и незамещенную гидроксильную группу в положении C-12, и *пара*-броманилида, содержащее аналогичные заместители в положении C-3 и C-12 на каркасе ЖК, также усиливают цитотоксический эффект топотекана в два раза на клеточной линии HeLa [54].

Было показано, что производные различных желчных кислот обладают сравнимой ингибиторной активностью по отношению к Tdp1. Производные, синтезированные на основе дезоксихолевой кислоты, обладают способностью ингибировать Tdp1 в микромолярном диапазоне. Также эти соединения демонстрируют низкую собственную цитотоксичность в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток и два упомянутых выше соединения, содержащие бензилоксизаместитель в положении C-3 и незамещенную гидроксильную группу в положении C-12, способны усиливать действие топотекана, что делает их интересными кандитами для дальнейших исследований.

### 1.3.1.11 Производные кумарина

Нашим коллективом были изучены производные на основе кумарина. Кумарины встречаются во многих видах высших растений и обладают разносторонней фармакологической активностью: спазмолитической, фотосенсибилизирующей, противоопухолевой, антикоагулянтной И представляют собой ненасыщенные ароматические лактоны, в основе которых лежит 5,6-бензо-α-пирон (кумарин) [204]. Основываясь на результатах виртуального скрининга библиотеки натуральных продуктов InterBioScreen, был синтезирован ряд производных 7-гидроксикумарина, содержащих ароматические или монотерпеновые заместители, и изучена способность данных соединений ингибировать Tdp1 [40]. Было обнаружено, что производные 7-гидроксикумарина с монотерпеновым пиненовым фрагментом

являются эффективными ингибиторами Tdp1. Наиболее эффективное соединение имеет значение IC<sub>50</sub> 0,68 мкМ (Рис.1.20, соединение **38**). Это соединение обладает низкой цитотоксичностью (CC<sub>50</sub>>100 мкМ), а его использование в нетоксичных дозах совместно с CPT значительно увеличивало цитотоксическую активность CPT в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 [40].



**38**.  $IC_{50} = 0,68 \text{ MKM}$  **39**.  $IC_{50} = 0,62 \text{ MKM}$ 

Рис. 1.20. Производные кумарина в качестве ингибиторов Tdp1[40].

В дальнейшем на основе молекулярного моделирования было предсказано, что присоединение ароматического заместителя в четвертом положении кумарина позволит улучшить связывание с ферментом (Рис. 1.20 соединение **39**) [39].

4-Арилкумарины часто считаются отдельной группой натуральных соединений, называемых неофлавонами. Природные и синтетические неофлавоны имеют низкую токсичность и обладают широким спектром биологической активности, в частности, противоопухолевой [205].

На основе каркаса неофлавона были синтезированы различные варьирования ароматических и производные, путем монотерпеновых заместителей [39]. Поскольку большинство гибридов монотерпенарилкумарина продемонстрировали схожую ингибирующую активность в отношении Tdp1 (~0,5 мкМ) и незначительную цитотоксичность во всем диапазоне исследованных концентраций (до 100 мкМ), для исследования на животной модели среди них было выбрано производное гераниола как наиболее удобное для синтеза и очистки (Рис. 1.20, соединение 39) Данное

соединение показало значительное усиление противоопухолевого действия топотекана на модельной опухоли асцит Кребса-2 *in vivo* [39].

# 1.3.1.12 Нуклеозиды

Нашим коллективом были исследованы различные производные нуклеозидов. Изучение нуклеозидов в качестве ингибиторов Tdp1 началось с дисахаридных производных [48]. Дисахаридные нуклеозиды принадлежат к важной группе природных соединений, которые демонстрируют широкий биологической спектр активности (включая антибактериальную, фунгицидную, гербицидную, противоопухолевую и противовирусную) [206] [207]. Более того, преимущество дисахаридных нуклеозидов состоит в том, что они способны легко проникать как через плазматические, так и через ядерные мембраны клеток, используя систему переносчиков нуклеозидов, аналогичную транспортной системе различных противовирусных (ацикловир, зидовудин и др.) и противоопухолевых препаратов (цитарабин, кладрибин, гемцитабин) на основе нуклеозидов [208]. Значения IC<sub>50</sub> в отношении Tdp1 для диапазоне 0.4 - 18.5дисахаридных нуклеозидов лежат в мкМ. Они продемонстрировали низкую собственную цитотоксичность и значительный синергетический эффект в комбинации с топотеканом в отношении перевиваемых клеток A549 (немелкоклеточный рак легких) и WI-38 (клетки легких неракового происхождения) [48].

Так же эффективные ингибиторы Tdp1 были обнаружены в серии производных рибофуранозных нуклеозидов и липофильных пиримидиновых нуклеозидов. Эти соединения имеют значения IC<sub>50</sub> в низком микромолярном и субмикромолярном диапазоне. Эффективность ингибирования Tdp1 этими соединениями зависела от числа остатков бензойной кислоты, присоединенных к остатку рибозы: тризамещенные производные более эффективны, чем ди- и монозамещенные производные. Нуклеозиды без липофильных групп не проявили ингибирующей активности в концентрациях до 50 мкМ. Было показано, что липофильные пиримидиновые нуклеозиды,

ингибирующие Tdp1, обладают низкой цитотоксичностью, а некоторые производные усиливают действие топотекана на клетки HeLa [49].

Было изучено также влияние конфигурации хиральных липофильных нуклеозидов на ингибирование Tdp1 [50]. Показано, что D-липофильные нуклеозидные производные ингибируют фермент более эффективно, чем их L-аналоги.

Таким образом, липофильные нуклеозиды являются еще одним перспективным классом для создания ингибиторов Tdp1-сенсибилизаторов опухолевых клеток к действию топотекана.

#### 1.3.1.13 Производные смоляных кислот

Дегидроабиетиламин – природный терпеноид, производное дегидроабиетиновой кислоты, входит в состав смол хвойных растений. Так, в живице ели сибирской (Picea obovata) содержится около 71% дегидроабиетиламина [209].

Различные соединения на основе дегидроабиетиламина проявляют широкий спектр биологической активности - бактерицидная, противовирусная, противомалярийная и т. д [210–212]. Так же было показано, что гидрохлорид дегидроабиетиламина обладает высокой цитотоксичностью в отношении ряда опухолевых клеточных линий и способностью разрушать клетки меланомы за счет повышения уровня апоптоза и снижения клеточной пролиферации [213].

Нашим коллективом в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены дегидроабиетиламиновые производные мочевины, тиомочевины И бисмочевины. Значения IC<sub>50</sub> варьировали от 0,1 до 3,7 мкМ. Лучшую ингибирующую активность как в отношении Tdp1 дикого типа, так и против мутантной формы с заменой H493R (SCAN1) продемонстрировали производные дегидроабиетиламина, принадлежащие к классу бисмочевин (Рис. 1.21 соединения **40**,**41**,**42**,**43**). Значения IC<sub>50</sub> для бисмочевин менялись в диапазоне от 0,1 до 0,2 мкМ для Tdp1 и от 5,4 до 9,3 мкМ для SCAN1 [152].



Рис. 1.21. Производные смоляных кислот.

Эти соединения (40,41,42,43) не проявляли токсичности в концентрациях до 100 мкМ в отношении различных перевиваемых клеточных линий [152]. Так же соединения были изучены на способность усиливать действие темозоламида.

В литературе есть множество данных, свидетельствующих об участии Tdp1 в удалении повреждений, вызванных различными противораковыми препаратами, в том числе темозоломидом. Темозоломид – алкилирующий агент, применяемый для химиотерапии глиобластом и метастазирующих меланом. Комбинация темозоломида с ингибиторами Tdp1 (соединения **40,41**) приводила к снижению жизнеспособности клеток до 40% в линиях глиобластомы человека U87MG и SNB19 по сравнению с использованием только темозоломида [152].

Далее были синтезированы производные дегидроабиетиламина с фрагментами 2-иминотиазолидин-4-тиона и 2-тиоксоимидазолидина-4-тиона (Рис. 1.22) в остове для изучения их активности в отношении Tdp1.



Рис. 1.22. Общие структурные формулы производных дегидроабиетиламина с фрагментами 2-иминотиазолидин-4-тиона и 2-тиоксоимидазолидина-4-тиона

Производные тиазолидин-4-она применяются в различных областях медицинской химии благодаря разнообразным фармакологическим активностям [214]. Кроме того, многие ингибиторы Tdp1 содержат гетероциклические фрагменты [24,46,215,216]. Таким образом, авторы предположили, что конъюгаты дегидроабиетиламина и гетероциклических фрагментов могут быть эффективными ингибиторами Tdp1. Значения IC<sub>50</sub> для производных дегидроабиетиламина с фрагментами 2-иминотиазолидин-4-тиона и 2-тиоксоимидазолидина-4-тиона находились в диапазоне от 0,19 до 1,1 мкМ. Для гетероциклических производных наблюдалась закономерность – увеличение размера заместителя приводило к уменьшению ингибирующей концентрации [58].

В следующей работе [57] были синтезированы абиетил- и дегидроабиетилмочевины, тиомочевины, амиды и тиоамиды, содержащие адамантановый фрагмент. Синтезированные адамантановые производные смоляных кислот ингибируют Tdp1 в микромолярных концентрациях (IC<sub>50</sub> 0,19–2,3 мкМ). Выбор 1-адамантанового или 2-адамантанового заместителя не влиял на ингибирующие характеристики, но отсутствие заместителя отрицательно сказывалось на ингибирующей активности. Выбор типа линкера

и терпенового фрагмента также практически не влиял на величину IC<sub>50</sub>. Наиболее эффективными ингибиторами Tdp1 и сенсибилизаторами клеток T98G (глиобластома) к действию темозоломида оказались производные дегидроабиетилмочевины с 1- или 2-адамантановым заместителем (Рис. 1.23).



Рис. 1.23. Общая структурная формула производных дегидроабиетилмочевины с 1- или 2-адамантановым заместителем

Адамантановые производные смоляных кислот показали умеренную токсичность в отношении клеточной линии Т98G. Жизнеспособность клеток в присутствии 2,5 и 5 мкМ ингибиторов находилась в диапазоне 90–100%, и только при концентрации соединений 25–50 мкМ цитотоксичность увеличивалась, но не превышала 60% погибших клеток. Также было показано аддитивное действие соединений в концентрации 5 мкМ в комбинации с 2 мМ темозоламидом на клетки глиомы Т98G [57].

Таким образом, все изученные ингибиторы на основе дегидроабиетиламина подавляют активность Tdp1 В микромолярном диапазоне, умеренно токсичны в отношении различных клеточных линий и усиливают действие темозоломида В отношении клеточных линий глиобластомы человека U87MG и SNB19. Дальнейшее изучение этих соединений может помочь в борьбе с агрессивными формами глиобластом,

резистентных к темозоломиду. Это говорит о перспективности исследования ингибиторов Tdp1 на основе дегидроабиетиламина.

# 1.3.1.14 Берберины

Берберин — это алкалоид, содержащийся во многих растениях. Это соединение оказывает антибактериальное, антиоксидантное, гипохолестеринемическое и противоопухолевое действие [217–220].

В работах нашего коллектива [55,56] была изучена способность производных сульфонат-берберина и сульфонат-тетрагидроберберина с алифатическими и ароматическими заместителями ингибировать Tdp1 (Рис. 1.24) [55], были также изучены производные, полученные путем взаимодействия берберрубина с алифатическими сульфохлоридами (Рис. 1.24) [56].



Сульфонат тетрагидроберберина Сультон берберрубина Рис. 1.24. Общие структурные формулы для производных берберина [55,56].

Для сульфонатов берберина и тетрагидроберберинов значения IC<sub>50</sub> находятся в диапазоне от 0,53 до 4 мкМ. Было установлено, что структура заместителя в сульфонате влияет на ингибирующую активность соединений. Так, в ряду алкилсульфонатов ингибирующая активность была обнаружена только у бромзамещенных соединений или соединений с длинным алкильным заместителем (пропил-, бутил-) в сульфогруппе. Производные тетрагидроберрубина и 12-бромтетрагидроберрубина, содержащие

полифторароматические заместители, обладают ингибирующей активностью со значениями IC<sub>50</sub> ~ 1 мкМ, тогда как их нефторированные аналоги неактивны в этих концентрациях [55].

В следующей работе [56] было показано, что соединения с циклическим сульфоновым фрагментом подавляют активность Tdp1 в микромолярном или субмикромолярном диапазоне (IC<sub>50</sub> 0,56–5,5 мкМ), в отличие от своих нециклических аналогов, не проявляющих активности в отношении Tdp1 [56]. Так же, как и в статье [55], в этом исследовании было показано, что введение атома брома повышает ингибирующую активность соединений [56].

Оценка цитотоксичности на клеточной линии HeLa показала, что сульфонаты берберина с алифатическими заместителями и атомом водорода в *пара*-положении нетоксичны до 100 мкМ. Однако соединения с трифторметильной группой оказались более токсичными, значения CC<sub>50</sub> составляют 2,6 мкМ и 2,2 мкМ. Замена трифторметильной группы на атом фтора в *пара*-положении снижает токсичность до 10 мкМ [55]. Соединения с циклическим сульфоновым фрагментом не оказали токсического действия на клеточную линию HeLa в концентрации до 100 мкМ [56].

Производные тетрагидроберрубина и 12-бромтетрагидроберрубина, содержащие полифторароматические заместители, удваивали цитотоксический эффект топотекана на клеточной линии HeLa [55]. Среди сультонов берберрубина наиболее выраженный сенсибилизирующий эффект продемонстрировало соединение с бромным заместителем [56].

Эти результаты показывают, что производные берберина могут рассматриваться как кандидаты для дальнейшей разработки в качестве сенсибилизаторов противоопухолевых препаратов [55,56].

Ингибиторы Tdp1 начали изучаться с 2000-х годов. В настоящее время было синтезировано и изучено множество соединений в качестве ингибиторов Tdp1, условно их можно разделить на две группы: полностью синтетические

ингибиторы и ингибиторы на основе природных биологически активных соединений.

Среди синтетических ингибиторов наиболее интересны соединения на основе инденоизохинолина (раздел 1.3.1.6, Рис. 1.11), потому что они могут подавлять активность не только Tdp1, но и Tdp2, и Top1 [33]. Полиаминобис(инденоизохинолин) в настоящее время является наиболее сильным двойным ингибитором Top1-Tdp1 (IC<sub>50</sub> для Top1 сравнимо с камптотецином, а IC<sub>50</sub> для Tdp1 1,52 мкМ). Вещества с двойной/тройной ингибирующей активностью в одном низкомолекулярном соединении потенциально могут иметь значительные преимущества перед лекарствами, действующими на одну мишень. Подавление сразу нескольких мишеней одним ингибитором бы могло позволить снизить количество И дозы используемых противораковых препаратов. Однако зачастую такие соединения обладают высокой собственной цитотоксичностью из-за воздействия сразу на несколько важных ферментов. В дальнейшем это может затруднить подбор оптимальной дозировки и их использование в комплексе с другими противоопухолевыми препаратами. Кроме того, такие препараты не учитывают персональные отличия пациентов в уровнях экспрессии и/или активности ферментовмишеней, что также потенциально осложняет выбор дозы.

Перспективным направлением является изучение природных биологически активных соединений. Многообразие, сложность строения, различная биологическая активность и доступная сырьевая база делают их интересными кандидатами для разработки на их основе различных лекарственных препаратов. Химическая модификация природных биологически активных метаболитов С разработки целью новых лекарственных препаратов является одним из наиболее перспективных направлений медицинской химии. Так, в период между 1981 и 2019 годами 41% противораковых лекарственных средств, включенных в клиническую практику, были либо природными соединениями, либо их производными [221]. В качестве ингибиторов Tdp1 уже изучено множество соединений на

основе различных биологически активных веществ. Так производные Tdp1 варацина подавляют активность В микромолярном диапазоне концентраций (IC<sub>50</sub> 1,3-6,0 мкМ), однако для них не было обнаружено синергического цитотоксического эффекта с СРТ или его производными и дальнейшего развития данный класс не получил. Другие производные биологически активных веществ: адамантана (IC<sub>50</sub> 0,35-67,8 мкМ), карена (IC<sub>50</sub> 0,65–28 мкМ), дезоксихолевой кислоты (IC<sub>50</sub> 0,27–1,54 мкМ), кумарина  $(IC_{50}0,5-9,17 \text{ мкM})$ , нуклеозидов  $(IC_{50}0,4-50 \text{ мкM})$ , смоляных кислот  $(IC_{50}0,1-1)$ 3,7 мкМ), берберина (0,53–5,5 мкМ) ингибировали Tdp1 в микромолярном диапазоне и были умеренно токсичны в отношении различных клеточных линий. Однако для того, чтобы снизить используемую дозу ингибиторов Tdp1 они должны обладать более высокой ингибирующей активностью. Наиболее эффективные производные ИЗ перечисленных классов усиливали цитотоксический эффект топотекана на клеточных линиях не более чем в два раза, что может оказаться недостаточным для увеличения эффективности терапии и снижения побочных эффектов. Поскольку многие изученные соединения подавляют активность Tdp1 в микромолярных концентрациях, дальше испытаний *in vitro* на панелях опухолевых клеток эти работы до сих пор не продвинулись.

В связи с этим поиск новых более эффективных ингибиторов Tdp1 и их изучение остается актуальной задачей. При исследовании потенциальных лекарственных препаратов необходимо оценить как их собственное влияние на количество повреждений ДНК, так и влияние соединений на повреждения ДНК, образующиеся под действием топотекана. Также важно оценить тип клеточной гибели под действием ингибиторов Tdp1. Исследование типа клеточной гибели и интенсивности апопотоза под действием ингибиторов Tdp1 можно рассматривать В качестве одного ИЗ маркеров чувствительности/резистентности опухолевых клеток К исследуемым соединениям. Кроме того, важно избегать некротической гибели клеток под действием ингибиторов Tdp1, поскольку некроз всегда сопровождается

нарушением жизнедеятельности и последующей гибелью окружающих клеток, воспалением, а также иммунным ответом, что приводит к тяжелым побочным эффектам. Также необходимо оценить переносимость, токсичность и эффективность потенциального лекарства в системе *in vivo*, поскольку модели *in vitro* не учитывают весь спектр взаимодействий между клетками в их нормальном микроокружении в организме.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1 Материалы исследования

В работе были использованы следующие реактивы: Tris base-HCl, NaCl, мочевина, β-меркаптоэтанол (Serva, Германия), ДМСО (Helicon, Германия), среда Искова IMDM для культивирования клеток (Gibco, Invitrogen, CША), эмбриональная телячья сыворотка FBS (GIBCO, Invitrogen, CША), смесь антибиотиков (гентамицин 40 мг/мл, пенициллин 10 ед/мл, стрептомицин 10 мг/мл, амфотерицин 0,25 мг/мл) (MP biomedicals, США), МТТ-реагент (3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида), изопропанол, (Helicon, Германия), агароза с нормальной температурой плавления легкоплавкая агароза LMP (Bio Rad, CША); ингибиторы протеаз (Roche Diagnostics GmbH, Германия), SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific KK), Tris base, Triton, PBS, NP-40, глицерин, ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактозид), лизоцим, PMSF, топотекан (Sigma-Aldrich, США), культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup>, 96-луночные планшеты (ТРР, Швейцария), 6-луночные планшеты (Nunk, Thermo Fisher Scientific, США), МТТ (бромид 3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия(Sigma-Aldrich, США).

Рекомбинантная тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 человека (КФ 3.1.4) была экспрессирована в системе *Escherichia coli* (плазмида pET 16B-Tdp1 предоставлена доктором Кальдекотт К.У., Университет Сассекса, Великобритания), выделена по ранее описанной методике [16].

Биосенсор для определения активности Tdp1 был разработан в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН [59] и синтезирован в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. Биосенсор представляет собой 16-звенный одноцепочечный олигонуклеотид 5'-(5,6 FAM-AAC GTC AGG GTC TTC C-BHQ1)-3'.

В качестве ингибиторов Tdp1 в работе были использованы соединения на основе природных биологически активных веществы, синтезированные в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

### 2.2 Оборудование

Хроматограф AKTA Pure (GE Healthcare, США), флуориметр POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Германия), проточный цитофлуориметр "Novocyte" (ACEA Biosciences, Inc., США), микротермостат модели "206" ("БИС-Н", Россия); мини-центрифуга Микроспин FV-2400 (BioSan, Латвия), система для электрофореза CometAssay Electrophoresis System (R&D Systems Inc., США), цифровой микроскоп CELENA© S (Logos Biosistems, Inc., Южная Корея), центрифуга Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Германия), центрифуга Avanti J-26S XPI (Beckman Coulter, Inc., США), CO<sub>2</sub> инкубатор Binder (Helicon, Германия), анализатор MultiScan FC (Thermo Scientific, США), счетчик клеток LUNA-II (Logos Biosistems, Inc., Южная Корея), ламинарный бокс (Lamsystem, Россия), микроскоп инвертированный Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия), центрифуга Hitachi CT15RE (Hitachi Koki Co, Япония), центрифуга LMC-12 (BioSan, Латвия).

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: MARS Data Analisys 2.0 (BMG LABTECH, Германия), OriginPro 8.6.0. (Origin Lab Corparation, CША), Comet analysis software (Trevigen, Inc., США).

### 2.3 Растворы

Буфер для ресуспендирования клеток *E.coli*: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ NaCl, 0,5% NP-40, 5% глицерин, лизоцим и ингибиторы протеаз (1 таблетка, Roche Diagnostics GmbH)

Лизирующий буфер для разрушения клеток *E.coli*: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,5% NP-40, 5% глицерин, 320 мМ PMSF и ингибиторы протеаз (1 таблетка)

Лизирующий буфер, используемый в методе ДНК-комет 2,5 M NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ Tris base, 1% Triton, 5% DMSO, pH 10.0

Буфер для проведения щелочной денатурации ДНК, используемый в методе ДНК-коме: 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA, pH > 13
Буфер для нейтрализации щелочной pH, используемый в методе ДНКкомет: 0,4 M Tris base-HCl, pH 7,5

Буфер для измерения активности Tdp1: 50 мМ Tris base-HCl, pH 8,0; 50 мМ NaCl; 7 мМ β-меркаптоэтанол.

Annexin-V связывающий буфер: 0,1 М Hepes (pH 7,4), 1,4 М NaCl и 25 мМ CaCl2.

#### 2.4 Методы

## 2.2.1 Наработка, выделение и очистка рекомбинантного белка Tdp1.

Наработка белка Tdp1. Для выделения фермента Tdp1 использовали клетки-продуценты *E.coli* BL21DE3, трансформированных плазмидой рЕТ 16B-Tdp1. Для проведения трансформации в 100 мкл клеточной суспензии добавляли 1 мкл плазмиды pET 16B-Tdp1, после чего проводили электропорацию импульсом 1700 В в течение 5 секунд. Затем в течение 2 часов смесь инкубировали при 37°С с 700 мкл LB-среды (pH 7,5). Суспензию клеток высевали на чашки с LB-агаром и ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37°С 16 часов до появления колоний. По одной колонии переносили в 2 пробирки с 3 мл LB-среды и ампициллином (100 мкг/мл) в каждой и подращивали 8 часов при 30°С и аэрации. Далее из них переносили по 1 мл полученной клеточной суспензии в колбы объемом 300 мл, содержащие 100 мл LB-среды с ампициллином (100 мкг/мл), и подращивали 14 часов при 30°С и аэрации. По 7 мл полученной суспензии клеток перенесли в колбы объемом 1л, содержащие 250 мл LB-среды с ампициллином (100 мкг/мл). Наращивание биомассы проводили при 37°C до ОП<sub>600</sub>=0,6-0,8 при постоянной аэрации. Затем запускали экспрессию гена целевого белка добавлением индуктора – изопропил-β-D-тиогалактозида (1 мМ), после чего культивировали клетки при 30°C. постоянной 2 Полученную аэрации часа при суспензию центрифугировали при 4°С (3900 об/мин; 20 мин), промывали холодным раствором 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 (30 мл) и повторно центрифугировали (5000 об/мин; 20 мин). Выход биомассы составил 5 г. Клетки хранили при -80°С.

Хроматографическая очистка белка Тdp1. Для выделения белка биомассу, полученную ранее, размораживали и ресуспендировали в 50 мл буфера и инкубировали на льду 30 минут. Для разрушения клеток E.coli добавляли 50 мл лизирующего буфера и инкубировали на льду 30 минут. Далее обрабатывали полученную суспензию ультразвуком в режиме 15 секунд звук/ 45 секунд перерыв (амплитуда 40%) для фрагментации ДНК. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 4°С (18000хg, 45 мин). Отбирали полученный супернатант, добавляли к нему имидазол до конечной концентрации 10 мМ и наносили на колонку с Ni-сефарозой (V=5 мл, GE Healthcare) со скоростью 1 мл/мин. Элюцию проводили в 2 стадии: буфером с 100 мМ и 500 мМ имидазолом, со скоростью 14 мл/час на хроматографе АКТА Pure (GE Healthcare). Фракцию, содержащую основное количество белка, наносили на колонку с гепарин-сефарозой (GE Healthcare) и проводили дальнейшую элюцию ступенчатым градиентом 0,1–1 М NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, концентрировали, и к полученным препаратам добавляли глицерин до 50%, Tris-HCl, pH 8,0 до 50 мМ и β-меркаптоэтанол до 7 мкМ.

Для определения концентрации полученных препаратов использовали метод Бредфорда [222]. Для этого на длине волны 595 нм измеряли оптическую плотность растворов бычьего сывороточного альбумина (2, 4, 6, 8, 10 мг/мл) в 1 мл красителя кумасси R-250 в 5% уксусной кислоте и 10% этаноле относительно раствора без белка. Затем строили калибровочную прямую и сопоставляли с ней значения оптической плотности для растворов, полученных добавлением 1 и 2 мкл нашего препарата в 1 мл реагента Бредфорда.

#### 2.2.2 Исследование активности белка Tdp1 и определение параметров

#### **IC**<sub>50</sub> флуоресцентным методом в режиме реального времени

Для измерения флуоресценции был использован флуориметр POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Германия). Для иследования активности белка Tdp1 использовались 96-луночные планшеты черного цвета Corning <sup>тм</sup>. Реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер для измерения активности Tdp1, 50 нМ олигонуклеотид и различные концентрации ингибиторов. Реакция запускалась добавлением Tdp1 до конечной концентрации 1,5 нМ. Измерения проводились автоматически в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени в течение 8 минут, аликвоты отбирали из реакционных смесей через каждые 55 секунд при комнатной температуре. По результатам экспериментов была найдена скорость реакции при различных концентрациях ингибитора.

Влияние предлагаемых соединений оценивали по величине  $IC_{50}$  (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижается наполовину). Обсчет значений  $IC_{50}$  проводился с помощью программы MARS Data Analisys 2.0 (BMG LABTECH, Германия).

#### 2.2.3 Клеточные культуры

В работе использовались различные линии перевиваемых опухолевых клеток, имеющиеся в коллекции ИХБФМ СО РАН, в Лаборатории ферментов репарации. В их числе линии колоректальной карциномы (HCT116), карциномы легкого (A549), аденокарциномы молочной железы человека (MCF7), эмбриональных почек человека (HEK-293), глиобластомы (T98G), рак шейки матки (HeLa). Клетки культивировали в среде IMDM, содержащей 10% FBS и 1% раствор антибиотиков и антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мкг/мл стрептомицина, 0.25 мкг/мл амфотерицина), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки пересеивали раз в 3-4 дня для поддержания экспоненциального роста.

#### 2.2.4 Анализ цитотоксической активности с помощью МТТ-теста

Клетки высевали в 96-луночные планшеты по 10 тыс. на лунку и оставляли для прикрепления на 24 ч. После формирования 50% монослоя в культуральную среду добавляли исследуемые препараты (Таблица 1.1-1.8 в Приложении) и продолжали культивирование в течение 72 ч при 37 °C. Добавляемый объем соединений составлял 1% от общего объема

культуральной среды, количество ДМСО, используемого в качестве растворителя и контроля также составляло 1%. Далее в каждую лунку добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл, и продолжали инкубировать при 37 °C в течение 2 ч. После чего среду удаляли и растворяли кристаллы формазана в 100 мкл изопропанола. Оптическую плотность определяли с помощью микропланшет-ридера Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific Corporation) при длинах волн 570 нм (пик) и 620 нм (базовый уровень). Жизнеспособность клеток определяли по трем независимым экспериментам.

Далее изучалась способность отобранных соединений в нетоксичной концентрации усиливать цитотоксической действие топотекана на перевиваемые клеточные линии, представляющие различные типы рака. Для обозначения этой способности мы используем термин «сенсибилизация». Для оценки проводили по три независимых МТТ-теста с тестируемыми веществами в комбинации с топотеканом.

# 2.2.5 Исследование влияния исследуемых соединений на эффективность репарации ДНК щелочным методом ДНК-комет

Культуру клеток выращивали в 24-луночном планшете до концентрации 0,05 млн/мл, после чего обрабатывали клетки исследуемыми соединениями и инкубировали в течение 1 часа. Для получения клеточной суспензии к клеткам добавляли 30 мкл трипсина в каждую лунку и инкубировали 5 минут при 37°С, затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора 10% FBS в PBS.

Полученную суспензию (50 мкл) смешивали с 250 мкл 1% раствора низкоплавкой агарозы (CertifiedTM LMAgarose; BIO-RAD), переносили 250 мкл этой смеси на подготовленные предметные стекла, покрытые 1% раствором агарозы с нормальной температурой плавления (Agarose; Helicon), и оставляли их на несколько минут для застывания при температуре 4°C. После застывания слайды инкубировали в лизирующем буфере в течение часа при температуре 4°C. Затем предметные стекла погружали в щелочной буфер на 45 минут при температуре 4°C. Электрофорез проводили в течение 10

минут при 20 В, 450 мА на льду. После этого слайды 2 раза по 5 минут погружали в буфер для нейтрализации, дважды промывали холодной водой и окрашивали с использованием SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific KK), разведенного водой в соотношении 1:10 000.

Изображения были получены с помощью цифрового микроскопа CELENA© S (Logos Biosistems, Inc.) и проанализированы в программном обеспечении Comet analysis software (Trevigen, Inc). Для каждого образца были оценены 2 слайда путем подсчета не менее 200 клеток на стекле. В качестве параметра измерения уровня повреждения ДНК было выбрано медианное значение процентного содержания ДНК в хвосте (100 х интенсивность флуоресценции ДНК в хвосте кометы/ интенсивность флуоресценции общей ДНК кометы).

# 2.2.6 Исследование индукции апоптоза в опухолевых клетках под действием соединения 20d методом окрашивания клеток Annexin V-FITC/PI

Для определения апоптотического эффекта ингибиторов Tdp1 клетки рассаживали в 6-ти луночные планшенты и подращивали в течение суток. После обрабатывали ингибиторами Tdp1 и топотеканом в указанных концентрациях.

Через 14 ч, после обработки, клетки промывали PBS и открепляли добавлением трипсина, действие трипсина останавливали добавлением в клетки в среды DMEM. После чего клетки центрифугировали, дважды промывали стерильным PBS, ресуспендировали в 1X Annexin-V связывающем буфере и инкубировали с Annexin V-FITC и пропидий иодидом (PI) в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии в каналах FL1, FL2.

# 2.2.7 Лабораторные животные и модель опухоли

Все эксперименты с мышами проводились в соответствии с протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН №21.11 от 30.05.2014 и директивой 2010/63/EU.

В качестве экспериментальной модели опухоли была использована карцинома лёгких Льюис (LLC). Этот штамм опухолевых клеток был получен из Банка клеточных штаммов Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия), и поддерживается у мышей в виде трансплантированной опухоли.

Мышиная модель LLC является наиболее широко используемой моделью рака лёгкого, характеризуется высокой туморогенностью и способностью к метастазированию в лёгкие у мышей линии C57BL. Перед трансплантацией опухолевую ткань измельчали и ресуспендировали в 0.9% растворе NaCl. Прививка опухолевых клеток производилась внутримышечно в правое бедро (в объёме 0,1 мл, доза опухолевых клеток 800 тыс. на мышь), в итоге в месте введения образуется первичный опухолевый узел.

Оценка токсического действия препаратов на опухоль LLC основывалась на изменении массы тела особей в ходе эксперимента и в конце эксперимента по весовым индексам печени и селезёнки.

Оценка противоопухолевого действия препаратов на опухоль LLC проводилась по росту первичных опухолевых узлов (измерения проводились штангенциркулем одновременно со взвешиванием) и по количеству метастазов в легких животных. Метастазы считали поверхностым методом по всей поверхности легких после их фиксации в 10% формалине (подсчёт осуществляли под микроскопом MBI-3 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург, СССР) при четырехкратном увеличении.

Исследуемое соединение, производное усниновой кислоты **20d**, не растворяется в воде, поэтому его вводили внутрижелудочно в виде суспензии в 15% ДМСО и 10% Твин-80 в физрастворе.

Топотекан мышам вводили внутрибрюшинно. Группы мышей содержали по 5 – 7 особей, препараты вводились в объёме 0,2 мл.

## ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

# 3.1 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, модифицированных по кольцу А, либо кольцам А и С, арилиденфураноновых и гидразонотиазольных производных УК, модифицированных только по кольцу А. Для наиболее эффективных соединений проводили молекулярное моделирование взаимодействия этих соединений с молекулой Tdp1 для планирования дальнейших модификаций, повышающих эффективность ингибрования фермента, а также для объяснения разницы в эффективности между разными производными внутри одного подкласса соединений. Моделирование проводилось группой Йоханнеса Рейниссона, Университет Окленда, Новая Зеландия (Jóhannes Reynisson, School of Chemical Sciences, University of Auckland, New Zealand) и Галиной Николаевной Лихацкой, ТИБОХ ДВО РАН, результаты приводятся с их разрешения.

Для изучения ингибирующей способности соединений в отношении очищенного рекомбинантного фермента Tdp1 была использована тестсистема, основанная на способности Tdp1 удалять различные аддукты, в том числе флуорофоры, с 3'-конца ДНК [114,123,124,130,131]. В качестве субстрата Tdp1 был использован 16-мерный одноцепочечный для 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 BHQ1 с 3'-конца ДНК за счет активности Tdp1 интенсивность флуоресценции (5,6)-FAM на 5'-конце растет, что дает возможность детектировать ее 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 [59].

В работе была изучена способность производных хромена, адаманта и усниновой ингибировать BHQ1, кислоты реакцию отщепления катализируемую Tdp. Реакция проводилась при добавлении различных концентраций ингибиторов, растворенных в ДМСО (диметилсульфоксид). Выбор ДМСО как растворителя связан с хорошей растворимостью в нем Эффективность изучаемых соединений. ингибиторов В отношении очищенного фермента Tdp1 оценивали с помощью расчёта концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>).

Параметр (IC<sub>50</sub>) рассчитывался следующим образом:

- 1 Определяли начальную скорость ферментативной реакции как тангенс угла наклона линейного участка кинетических кривых при различных концентрациях ингибиторов (Рис. 3.1А)
- Из построенного графика зависимости начальной скорости реакции от используемой концентрации ингибитора находили значение IC<sub>50</sub> (Рис. 3.1Б)



Рис. 3.1. 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).

По результатам скрининга, приведённым в таблицах 1.1 – 1.8 в Приложении, можно отметить, что ингибирующей активностью по отношению к Tdp1 обладают многие изученные производные хромена, адамантана, а также цианопроизводные УК, арилиденфураноновые производные УК и тиазольные производные УК с различными заместителями.

Среди всех изученнных производных УК гидразонотиазольные 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.

#### 3.1.1 Производные хромена

Октагидро-2H-хромен представляет собой кислородсодержащий гетероцикл с тетрагидропирановой составляющей (Рис. 3.2). Соединения, содержащие хроменовый остов, обладают широким спектром биологической активности и вариативностью модификации [223,224].

Была изучена ингибирующая активность амидных производных октагидрохромена (формулы соединений представлены на Рис. 3.2.). Показано, что диастериомеры 8(S)(R) с нитро- и 9(S)(R) амино- группами не обладают ингибирующей активностью в отношении Tdp1 (IC<sub>50</sub> >15). Большей активностью обладают производные 10(S)(R) с метильной и 12(S)(R) фенильной группами, значения IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> находятся в диапазоне 1,24 – 4 мкМ (результаты скрининга приведены в таблице 1.1 в Приложении). Абсолютная конфигурация C4-стереоцентра и заместители в амидной группе не оказали существенного влияния на величину IC<sub>50</sub>.



Рис. 3.2. Структурные формулы для производных октагидро-2H-хромена.

Для наиболее активного амидного производного октагидрохромена 13(S) (IC<sub>50</sub> 1,24 мкМ), было выполнено молекулярное моделирование Йоханнесом Рейниссоном, Университет Окленда, Новая Зеландия (Jóhannes Reynisson, University of Auckland, New Zealand) (Рис. 3.3). Показано, что соединения 13(S) взаимодействует с важными каталитическими остатками His263, Tyr204, Ala520, Ala521 и Pro461 в активном центре фермента Tdp1, а также образует водородные связи с Gly458 и Ser459. Адамантановый фрагмент соединения 13(S), занимает гидрофобный карман, а тиофеновая группа занимает расщелину, подверженную воздействию водной среды (Рис. 3.3).

Нафтильные производные октагидрохромена (соединения **4If**, **4Ie**, рис. 3.2.) проявляли сравнимую ингибирующую активность в отношении Tdp1 с IC<sub>50</sub> около 2,00 мкМ (результаты скрининга, приведены в таблице 1.1 в Приложении). Ни конфигурация гидроксильной группы в положении C-4, ни место присоединения карбоксильной группы к нафталиновому остову существенно не влияют на активность этих соединений.



Рис. 3.3. Предсказанное алгоритмом ChemPLP связывание соединения **13(S)** с аллостерическим и каталитическим центрами Tdp1 (PDB ID: 1MU7). (A) Частично положительно заряженные области белка окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные — в красный, а нейтральные области — в серый. (Б) Водородные связи между **13(S)** и аминокислотными остатками Ser459 и Gly458 обозначены зелеными пунктирными линиями. Липофильные контакты с His263, Tyr204, Ala520, Ala521 и Pro461 показаны фиолетовыми пунктирными линиями.

Нафтильные производные октагидрохромена (соединения **4If**, **4Ie**, рис. 3.2.) проявляли сравнимую ингибирующую активность в отношении Tdp1 с IC<sub>50</sub> около 2,00 мкМ (результаты скрининга, приведены в таблице 1.1 в Приложении). Ни конфигурация гидроксильной группы в положении C-4, ни место присоединения карбоксильной группы к нафталиновому остову существенно не влияют на активность этих соединений.

Для нафтильных производных тиофенилоктагидрохромена были получены данные цитотоксичности в отношении клеток A549 (результаты приведены в таблице 1.1 в Приложении). МТТ тест показал, что производные хроменов не токсичны во всем диапазоне исследуемых концентраций (до 100 мкМ), за исключением **4R If** (CC<sub>50</sub> 20 мкМ, таблица 1 в Приложении), но не оказали сенсибилизирующего влияния на цитотоксический эффект топотекана (Рис. 3.4.).



Рис. 3.4. 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 A549, они не оказали синергетического влияния на цитотоксический эффект топотекана. Поэтому дальнейшие исследования этих соединений как сенсибилизаторов действия топотекана были нецелесообразны. Данные опубликованы в [215,225].

#### 3.1.2 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 и противовирусной активностями [198]. Кроме того, введение адамантильного фрагмента в молекулы лекарственных препаратов нередко приводит к уменьшению токсичности и значительному улучшению терапевтического

эффекта, что связано с изменением пространственного строения и растворимости в полярных и неполярных средах [198].

Данные, полученные нами ранее при изучении сложных эфиров адамантанов, содержащих ациклический монотерпеновый заместитель [44], что сложные эфиры лабильны (т.е. относительно показали, легко гидролизуются в физиологических условиях), это делает соединения, содержащие сложные эфиры, проблематичными в качестве потенциальных лекарств. В связи с этим сложноэфирный мостик этих соединений был заменен амидной (44a,b; 45a,b; 50a,b) и тиоамидной группами (46a, 47a, 51) и была изучена способность этих соединений ингибировать Tdp1 (структуры соединений и результаты скрининга, приведены в таблице 1.2 в Приложении).

Производные 2-адамантанкарбоновой кислоты (**45a**, **45b**, **47a**) оказались более активными по сравнению с соединениями, полученными из 1адмантанкарбоновой кислоты (**44a**, **44b**, **46a**). Так среди 1адамантанзамещенных производных амиды **44a** и **44b** были неактивны в отношении Tdp1, тогда как 2-адамантанзамещенные амиды **45a** и **45b** ингибировали Tdp1 при 5,2 и 2,5 мкМ, соответственно (структуры соединений, приведены в таблице 1.2 в Приложении).

При сравнении активности амида **45a** и тиоамида **47a** видно, что замена атома кислорода на серу приводит к повышению активности соединений в отношении Tdp1, значения IC<sub>50</sub> составляют 5,2 мкМ для **45a** и 0,64 мкМ для **47a** (структуры соединений, приведены в таблице 1.2 в Приложении).

Аналогичные тенденции наблюдались и для производных цитронелловой кислоты (**50a,b; 51**). Так производное 1-аминоадамантана **50a** было неактивным в отношении Tdp1, активность 2-аминоадамантана **50b** оказалась выше и составила 13,4 мкМ, а наилучшее значение IC<sub>50</sub> было получено для тиоамида **51** и составило 2,3 мкМ (структуры соединений, приведены в таблице 1.2 в Приложении).

Исследование цитотоксичности адамантановых производных с амидной и тиоамидной группами показало, что эти соединения являются

малотоксичными, в отношении перевиваемой опухолевой линии A-549 (CC<sub>50</sub> >80 мкМ) (Рис. 3.5А).

Большинство соединений обладали слабым сенсибилизирующим эффектом, либо сенсибилизирующий эффект отсутствовал вовсе. Наиболее выраженный сенсибилизирующий эффект показало соединение 46а (Рис. 3.5Б, таблица 1.2 Приложении), тиоамид 2-аминодамантана, В которое в концентрации 5 мкМ нетоксичной значительно усиливало действие топотекана на клетки линии А549.



Рис. 3.5. Влияние производных адамантана на выживаемость перевиваемых линий опухолевых клеток 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.

Шифр	IC <sub>50</sub> , мкМ	СС <sub>50</sub> А549, мкМ	Усиление действия Трс, раз
44a	>75	-	-
44b	>75	-	-
45a	5,2±0,2	>80	Нет синергии
45b	2,5±0,1	>80	Нет синергии
46a	3,3±0,5	>80	5
47a	0,64±0,17	>80	Нет синергии
50a	>75	-	-
50b	13,4±3	>80	Нет синергии
51	2,3±0,8	>80	Нет синергии

Таблица 3.1. Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций производных адамантана

Для соединения **46a** (IC<sub>50</sub> 3,3 мкМ), которое продемонстрировало усиление действия топотекана, было выполнено молекулярное моделирование для установления предпочтительных сайтов и способов связывания производных адамантана с Tdp1. Молекулярное моделирование было выполнено Йоханнесом Рейниссоном (Рис. 3.6). Согласно данным докинга, соединение **46a** занимает субстрат-связывающий центр Tdp1. Фрагмент адамантана соединения **46a** занимает липофильную часть связывающего кармана Tdp1, в то время как тиоамид соединения **46a** занимает гидрофильную часть, как показано на рисунке 3.6А.



Рис. 3.6. Предсказанное алгоритмом ChemScore связывание производного **46a** с Tdp1 (PDB ID: 1MU7). (А) Синим цветом обозначены гидрофильные области белка; коричневым цветом - гидрофобные области, белым цветом показаны нейтральные участки на поверхности Tdp1. Производное адамантана занимает субстрат-связывающий карман Tdp1. (Б) Водородные связи между атомом серы производного **46a** и молекулой воды HOH631 показаны зелеными пунктирными линиями. Молекулы воды также образуют водородные связи с Thr26 и Asn516. (В) Структурная формула соединения **46a**.

Таким образом, было показано, что тиоамиды более активны в отношении Tdp1, чем их амидные аналоги; 2-адамантанзамещенные производные (45a, 45b, 47a, 50 и 51) более активны по сравнению с 1адамантанзамещенными изомерами (44a, 44b, 46a и 50a). 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 адаманта не использовались.

#### 3.1.3 Производные усниновой кислоты

В данной работе в качестве ингибиторов Tdp1 так же были изучены производные усниновой кислоты. Усниновая кислота (УК) - это вторичный метаболит различных видов лишайников, обладающий широким диапазоном биологической активности (противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой и т.д.), относится к производным дибензофурана [60]. УК является липофильной слабой кислотой, способной диффундировать через биологические мембраны. Цитотоксичность производных УК связана с их липофильностью, при этом важную роль играет трикетонная система кольца С (Рис. 3.7). Поэтому структурные нарушения трикетонной системы кольца С УК, с одной стороны могут снизить цитотоксичность синтезируемых соединений, но с другой стороны эти же нарушения могут уменьшить проникающую способность соединений.



#### Рис. 3.7. Энантиомеры усниновой кислоты

Усниновая кислота существует в виде (+)- и (-)-энантиомеров в зависимости от положения ангулярной метильной группы относительно плоскости молекулы (Рис. 3.7) [226]. Нативная УК (оба энантиомера) не подавляет активность Tdp1 в концентрациях до 50 мкМ и обладает существенным токсическим эффектом. В связи с этим нашими коллегами из ЛФАВ НИОХ СО РАН были предприняты попытки модификации исходного соединения [61], приведшие к появлению созданных на ее основе нетоксичных и высокоэффективных ингибиторов Tdp1. В нашей работе подавляющее большинство исследований выполнено на производных (+)-УК, в ином случае это указано отдельно.

### 3.1.3.1 Цианопроизводные УК

На основании молекулярного моделирования авторы работы [24] предположили, что эффективный ингибитор Tdp1 должен взаимодействовать как с гидрофильными (S400, S518, S536, E538), так и с гидрофобными (Y204, P461, W590) аминокислотными остатками в активном центре фермента. Исходя из этого предположения, мы исследовали соединения, в которых в остов усниновой кислоты была введена полярная цианогруппа, что должно было повысить сродство соединений к активному центру Tdp1. Соединения этой группы были синтезированы и любезно предоставлены Ольгой Анатольевной Лузиной, НИОХ СО РАН.

Нами были протестированы соединения, содержащие одну либо две цианогруппы (структуры соединений и результаты скрининга, приведены в таблице 1.3 в Приложении). Показано, что введение одной или двух цианогрупп заметно повышает ингибиторную активность соединений (IC<sub>50</sub> 10–15 мкМ) по сравнению с исходной УК (UA) (IC<sub>50</sub> >50 мкМ). Наибольшее влияние на ингибиторные характеристики соединений оказали модификации остова УК наряду с введением цианогрупп (Рис. 3.8). Так, фураноновое производное УК (MR-150-3) ингибирует Tdp1 в микромолярном диапазоне (IC<sub>50</sub> 11 мкМ), а присоединение к этому соединению двух цианогрупп (OL 8-44) приводит к значительному улучшению ингибиторной активности (IC<sub>50</sub> 1,6 мкМ). Наличие пиразольного цикла (OL7-43), связанного с кольцом С, наряду с двумя цианогруппами в кольце А так же повышает ингибиторную активность (IC<sub>50</sub> 2,86 мкМ) по сравнению производным УК (MR-137-1) с двумя цианогруппами, но без пиразольного цикла (IC<sub>50</sub> 15,6 мкМ).



Рис. 3.8. Структуры цианопроизводных УК **MR-150-3**, **OL 8-44**, **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. 3.9).



Рис. 3.9. Дозозависимое влияние цианопроизводных производных УК на выживаемость клеток линии MCF-7.

Наиболее токсичной оказалась исходная УК (СС<sub>50</sub> ~ 55мкМ). Остальные изученные соединения были значительно менее токсичными. Наибольший эффект снижения токсичности обеспечивает пиразольный фрагмент в кольце С соединения **OL 7-43** (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.

Однако, данные полученные при изучении цианопроизводных УК позволяют сделать вывод о том, что модификации молекулы исходной УК приводят к заметному усилению ингибирующего воздействия соединений на очищенный фермент и позволяют существенно снизить цитотоксичность получаемых соединений по сравнению с нативной УК.

# 3.1.3.2 Арилиденфураноновые производные УК

Ранее было показано, что производные УК, модифицированной по кольцу С, являются эффективными ингибиторами Tdp1, а так же значительно усиливают цитотоксический эффект камптотецина в отношении клеточной линии рака молочной железы MCF-7 [35]. Однако в работе [227] сообщается, что нативное кольцо С УК важно для проникновения производных УК через биологические мембраны. Поэтому в нашей работе изучались производные УК, модифицированной только по кольцу А. В предыдущем разделе было показано, что модификация кольца А УК в фураноновое производное (MR-150-3) приводит к появлению ингибирующей активности (с >50 мкМ до 11 мкМ).

На основе этого соединения были синтезированы производные УК, содержащие арил- или гетарилиденфураноновые фрагменты в кольце А (ба-6z) при сохраненном трикетонном фрагменте кольца С УК (в таблице 3.2, приведены соединения с изученной цитотоксичностью, результаты скрининга оставшихся соединений приведены в таблице 1.4 в Приложении). Соединения этой группы были синтезированы группой Ольги Анатольевны Лузиной, НИОХ CO PAH. Эти соединения продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 в субмикромолярной и наномолярной концентрации (структуры соединений и результаты скрининга, приведены в таблице 1.4 в Приложении).

Соединения, содержащие только фенильный остаток или только тиофеновый остаток, продемонстрировали субмикромолярную активность (IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 0,063 - 0,23 мкМ). Наиболее эффективным ингибитором Tdp1 из этой серии производных УК было соединение **6m** (Рис. 3.10) (значение IC<sub>50</sub> 25 нМ), содержащее крупный 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенильный заместитель.

Для изучения влияния положения ангулярной метильной группы в остове УК мы сравнили ингибиторные свойства соединений, полученных на основе (+)- и (-)-УК. Влияние стереохимии соединений изучалось на примере наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 **6m** и **6x**. Энантиомеры производных **6m** и **6x**, **7m** и **7x** соответственно, были синтезированы из (-)усниновой кислоты, и было показано, что они оказывают такое же влияние на ферментативную активность, как и производные (+)-усниновой кислоты (Рис. 3.10). Таким образом, конфигурация ассимметрического центра в остове усниновой кислоты не повлияла на ингибирующую активность соединений [228].



Рис. 3.10. Структурные формулы энантиомеров УК.

Производные УК с 3,5-ди-*трет*-бутильным фрагментом в кольце С (енаминовые производные УК) исследовались ранее [35]. Такие соединения подавляли активность Tdp1 в субмикромолярном диапазоне концентраций и оказались наиболее эффективными ингибиторами Tdp1 из всех изученных енаминов. В нашей работе также выгодно выделяется соединение **6m**, несущее 3,5-ди-*трет*-бутильный фрагмент (IC<sub>50</sub> 0,025 мкМ). Енаминовые производные УК усиливали действие топотекана на опухолевые клетки линии MCF-7 *in vitro*, в том числе одно из соединений с 3,5-ди-*трет*-бутильным фрагментом (соединение **8** в работе [37]) (Рис. 3.11) усиливало цитотоксический эффект топотекана в 10 раз и было одним из самых эффективных сенсибилизаторов действия топотекана. Это же соединение усилило действие топотекана *in vivo* на модельных опухолях мышей Льюис и Кребс-2 [37,229]. К нашему удивлению, соединение **6m** не только не сенсибилизировало цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых клеток, но даже обладало защитным эффектом (см. ниже).



Рис. 3.11. Структрурные формулы соединений **8** (3,5-ди-*трет*-бутильный фрагмент в кольце С) и **6m** (3,5-ди-*трет*-бутильный фрагмент в кольце А).

Молекулярное моделирование было привлечено для установления предпочтительных сайтов и способов связывания арилиденфураноновых производных УК с Tdp1. Молекулярное моделирование было выполнено Йоханнесом Рейниссоном. Основываясь на механизме действия Tdp1, в литературе рассматривается два возможных пути подавления активности

1) нарушение взаимодействия Tdp1 ЭТОГО фермента: с субстратом (конкурентное ингибирование) за счет связывания ингибиторов с важными каталитическими остатками в активном центре Tdp1: His493, His263, Lys265, Asn283, Lys495, Asn516, Ser400, Ser403, Ser518, Ala520 [17]. 2) ингибирование гидролиза переходного комплекса Tdp1–ДНК (бесконкурентное ингибирование), за счет связывания соединений с полостью по соседству с активным центром, сформированной остатками Tyr204, Cys205, Asp230, Lys231, Leu255 Ala258, Phe259 и Thr261 [17].

Для наиболее эффективного ингибитора Tdp1 6m алгоритмом ChemPLP была предсказана более высокая энергия связывания с аллостерическим центром фермента по сравнению с субстратсвязывающим центром. Однако алгоритмы (GoldScore, ChemScore, Astex Statistical Potential) другие предсказали более высокую энергию связывания для субстратсвязывающего центра. Поэтому ΜЫ считаем, ЧТО соединение 6m связывается преимущественно с субстрат-связывающим центром Tdp1. На Рисунке 3.12. показано связывание как с аллостерическим, так И с субстратсвязывающим центром.

По данным докинга, производное УК **6m** образует водородные связи с каталитическими остатками His263 и Asn516, в активном центре Tdp1 (PDB ID: 1MU7), а также может образовывать гидрофобные контакты с боковыми цепями аминокислотных остатков Tyr204, Pro461 и His493 (Puc. 3.12). Механизм работы Tdp1 связан с каталитическими остатками His263 и His493, и они имеют важное значение для выполнения ферментом своих функций [90]. Следовательно, перспективной стратегией ингибирования является нарушение каталитических функций His263 и His493 в активном центре Tdp1, и исходя из данных докинга можно предположить, что арилиденфураноновые производные УК являются эффективными ингибиторами Tdp1 именно благодаря взаимодействию с этими аминокислотными остатками.



Рис. 3.12. Предсказанное алгоритмом ChemPLP связывание производного **6m** с аллостерическим и каталитическим центрами Tdp1 (PDB ID: 1MU7). (A) Частично положительно заряженные области белка окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные — в красный, а нейтральные области — в серый. (Б) Водородные связи между **6m** и аминокислотными остатками His263 и Asn516 обозначены зелеными пунктирными линиями. Липофильные контакты с His493, Tyr204 и Pro461 показаны фиолетовыми пунктирными линиями.

Далее мы изучили цитотоксичность соединений на клетках аденокарциномы легкого человека А-549 (Рис. 3.13А., Таблица 3.2) и линии клеток из почек эмбриона НЕК-293 (Рис. 3.13Б., Таблица 3.2). На Рис. 3.13 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, значения  $CC_{50}$  для всех изученных соединений в таблице 1.4 в Приложении).

Таблица 3.2. Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций арилиденфураноновых производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий клеток

Шифр соединения	IC50, мкМ	СС50, мкМ А549 IS*	СС50, мкМ НЕК-293 IS*	Усиление действия Трс А549, раз	Усиление действия Трс НЕК293, раз
6d	$0,15 \pm 0,03$	10±0,4 67	4,6±0,5 <u>30</u>	0,68	2,4
бе	0,23±0,06	4,5±0,08 20	16±1,5 70	2,3	1,14
6f	0,23±0,004	11,4±2,3 50	14,5±0,7 63	0,84	2,4
<b>6m</b> (+)	0,025±0,002	6,8±2,4 272	14,5±0,7 580	0,19	1,5
7m (-)	0,064				
<b>6x</b> (+)	0,063±0,002	8,7±1,0 138	15,7±0,5 249	2,36	1,84
7x (-)	0,081				

\*IS – индекс селективности, отношение полуцитотоксической концентрации к концентрации полумаксимального ингибирования



Рис. 3.13. Влияние фураноновых производных УК на выживаемость клеточных линий А549 и НЕК-293. (А) Дозозависимое влияние фураноновых производных УК на выживаемость клеток А-549. (Б) Дозозависимое влияние фураноновых производных УК на выживаемость клеток 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 на клеточной линии HEK-293, а на клеточной линии A-549 увеличивало CC<sub>50</sub> топотекана, защищая клетки от его действия (Таблица 3.2, Рис. 3.14, таблица 1.4 в Приложении). Арилиденфураноновое производное УК **6x** прибилзительно в два раза усиливает цитотоксичность топотекана в отношении как A-549, так и HEK-293 (Таблица 3.2, Рис. 3.14, Таблица 1.4 в Приложении).



Рис. 3.14. Влияние арилиденфураноновых производных УК на цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточных линий (A) A549 и (Б) HEK-293

Таким образом, среди фураноновых производных УК наиболее перспективным соединением оказалось **6x**, которое является эффективным ингибитором Tdp1 и обладает умеренной цитотоксичностью. Кроме того, **6x** оказался сенсибилизатором топотекана для клеточных линий A-549 и HEK-293 с двукратным усилением цитотоксичности топотекана в нетоксичной концентрации ингибитора. 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. Полученные данные опубликованы в статье [228].

# 3.1.3.3. Тиазольные, аминотиазольные и гидразонотиазольные производные УК

Как и при синтезе предыдущих соединений, УК была модифицирована по кольцу А. Синтез этой группы соединений также проводили коллеги из НИОХ СО РАН, группа Ольги Анатольевны Лузиной. Соединения, содержащие тиазольный или аминотиазольный фрагмент и объемный заместитель в тиазольном фрагменте (Рис. 3.13), **18а-с** и **19а-d** (Таблица 1.5 в приложении), продемонстрировали ингибирование в низком микромолярном диапазоне концентраций (IC<sub>50</sub> 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 снижению ингибиторной активности: значения приводило К  $IC_{50}$ увеличивались с ~1мкМ до ~5мкМ. Структура соединения **18b** ( $IC_{50}$  1,12 мкМ) приведена на (Рис. 3.17А), остальные тиазольные соединения приведены в Таблице 1.5 в Приложении.



Рис. 3.15. Общие структурные формулы серии соединений **18а-с** ,**19а-d** и **20а-і.** 

# Арилиденгидразонотиазольные производные УК

Значительно более активными в отношении Tdp1 были соединения 20аi (Рис. 3.15, Таблица 1.6 в Приложении), содержащие тиазольный цикл с арилгидразоновым заместителем (значения IC<sub>50</sub> от 26 до 450 нМ). Среди соединений **20а–і** наибольшей активностью обладают *пара*-замещенные производные с бром- (**20d**) (значение IC<sub>50</sub> 26 нМ) и нитрозаместителем (**20h**) (значение IC<sub>50</sub> 35 нМ).

Для объяснения 50-кратной разницы в величинах IC<sub>50</sub> соединений **18b** (IC<sub>50</sub> 1,12 мкМ) и **20d** (IC<sub>50</sub> 0,025 мкМ) было выполнено молекулярное моделирования связывания этих соединений с молекулой фермента. С Йоханнесом помощью молекулярного моделирования, выполненого Рейниссоном, было показано, что соединение 20d (структура на Рис. 3.17А) (PDB ID: связывается с активным центром Tdp1 1MU7. https://www.rcsb.org/structure/1MU7) (Рис. 3.16Б). Это соединение взаимодействует с каталитическими аминокислотными остатками гистидина (HIS493, HIS263) и образует водородные связи с аспарагином (ASN516), тирозином (TYR204) и аспарагином (ASN283) через гидроксильную и карбонильную группы и гидразоновый фрагмент соответственно (Рис. 3.16). Взаимодействие с гистидиновыми остатками (HIS493, HIS263) также было предсказано и для соединения 18b (Рис. 3.17), а водородные связи это соединение образует с ASN516 и серином (SER459) через гидроксильную и карбонильную группы, соответственно.



Рис. 3.16. Взаимодействие 20d с сайтом связывания Tdp1 (PDB ID: 1MU7) предсказанное с использованием функции оценки GoldScore. (А) Стекинговые взаимодействия дибензофуранового остова УК с аминокислотой HIS263 обозначено пунктирной линией. (Б) Синим цветом обозначены гидрофильные области белка; коричневым/белым цветом - гидрофобные области на поверхности Tdp1. 4-бромбензилиденовый фрагмент соединения 20d находится в гидрофильном кармане, а ацетильная группа занимает полость, подверженную воздействию водной среды.

При сравнении этих производных УК на Рис. 3.17В видно, что дибензофурановый остов соединений **20d** и **18b** «перевернут» относительно друг друга, арилиденгидразоновый фрагмент соединения **20d** встроен глубоко в гидрофильный карман, в то время как дибензофурановая часть **18b** в этот карман не встроена, в связи с чем более подвержена воздействию водной фазы. Такое расположение соединений в активном центре объясняет наблюдаемую зависимость ингибирующей активности от строения арилиденового фрагмента.



Рис. 3.17. (А) Структурные формулы соединений **20d** и **18b**. (Б) Взаимодействие соединений **18b** (зеленый) и **20d** (шаростержневая модель) с сайтом связывания Tdp1 (PDB ID: 1MU7), предсказанное с использованием функции оценки GoldScore. 4-Бромбензилиденовый фрагмент соединения **20d** находится в липофильном кармане, дибензофурановая группа **18b** подвергается воздействию водной среды. Синим цветом обозначены гидрофильные области белка; коричневым/белым цветом - гидрофобные области на поверхности Tdp1.

Данные, полученные методами молекулярного моделирования, говорят о том, что гидразоновый фрагмент соединений серии **20а-і** играет основную роль в ориентации ингибиторов в сайте связывания фермента и обладает большей конформационной гибкостью, что объясняет высокую ингибиторную активность соединений **20а-і** в отношении Tdp1.

Для соединения **20d**, проявившего высокую ингибирующую активность в тесте *in vitro* на очищенном ферменте, было проведено исследование цитотоксичности на ряде опухолевых клеточных линий (Рис. 3.18) и выбрана нетоксичная концентрация (1 мкМ) этого соединения для изучения его влияния на цитотоксический эффект топотекана (Рис. 3.18).



Рис 3.18. 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<sub>50</sub> представлен в таблице 3.3.), но при этом в нетоксичной концентрации усиливало эффект топотекана примерно в 7,5 раз для всех перевиваемых линий опухолевых клеток (таблица 3.3., Рис. 3.18).

	20d, СС50 мкМ	Трс, СС50 мкМ	Трс+20d, СС <sub>50</sub> мкМ	Усиление действия топотекана, раз
СС <sub>50</sub> мкМ, НСТ116, <mark>IS</mark>	7,8±3,6 312	0,928	0,117	7,9
СС <sub>50</sub> мкМ, А549, <mark>IS</mark>	3,9±0,14 156	1,26	0,171	7,3
СС <sub>50</sub> мкМ, МС <b>F</b> 7, <mark>IS</mark>	9,3±2,2 372	0,927	0,118	7,9

Таблица. 3.3. Значения полуцитотоксических концентраций соединения **20d** и его влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.

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 сенсибилизирующий эффект действия топотекана в отношении опухолевых линий. Данные опубликованы в статье [230].

## Гетарилиденгидразонотиазольные производные УК

Данные молекулярного моделирования выполненого Й. Рейниссоном, полученные исследовании соединений, при содержащих арилиденгидразонотиазольные фрагменты, показали, что этот фрагмент взаимодействует с гидрофильной областью белка. Основываясь на этих данных, мы предположили, что замена арилиденового фрагмента на гетероарилиден может способствовать большему сродству с гидрофильным карманом, а введение удлиненных заместителей повысит ингибирующую активность соединений. Для проверки этой гипотезы и изучения влияния хирального центра, размера гетероцикла и типа гетероатома, а также положения и размера различных заместителей на активность соединений, НИОХ ЛФАВ были сотрудниками синтезированы новые гидразонотиазольные производные УК (в таблице 3.4 приведены соединения

с изученной цитотоксичностью, результаты скрининга оставшихся соединений приведены в таблице 1.7 Приложения).

Среди новых гидразонотиазольных производных УК с гетероарилиденовым фрагментом были обнаружены высокоэффективные ингибиторы Tdp1 (значения IC<sub>50</sub> 0,021-0,2 мкМ). Соединения, содержащие протонированный атом азота (**16а-с**, **16о**, таблица 1.7 в приложении), оказались несколько худшими ингибиторами Tdp1 со значениями IC<sub>50</sub> 0,16 – 1,7 мкМ.

В этой серии также были изучены соединения с удлиненными заместителями в арилиденгидразоновом фрагменте (**17а-17k**, таблица 1.7 в Приложении). Этот ряд соединений также продемонстрировал высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1 (значения IC<sub>50</sub> 0,018-0,12 мкМ). Наличие атома галогена в качестве заместителя, как правило, повышает ингибирующую активность соединений, но положение, природа и количество атомов галогена в ароматическом кольце не оказали существенного влияния на уровень ингибирующей активности.

Энантиомеры, синтезированные из (-) и (+)-усниновой кислоты, продемонстрировали отличную друг от друга ингибирующую активность в отношении Tdp1 (таблица 3.4, таблица 1.7 в Приложении), однако при этом не наблюдалось устойчивой корреляции значений IC<sub>50</sub> с типом энантиомера. Дальнейший синтез соединений проводился из (+)-усниновой кислоты.

Молекулярное моделирование, выполненное Й. Рейниссоном для установления способов взаимодействия одного из наиболее эффективных ингибиторов этой серии (+)-17b с Tdp1 (PDB ID: 6DIE), показало, что дибензофурановый остов (кольцо С) этого соединения занимает гидрофильный карман Tdp1 и взаимодействует с глутаминовой кислотой и треонином. Фторбензольная группа и анизоль (кольцо А) соединения (+)-17b занимают гидрофобную область и взаимодействуют с изолейцином, лейцином и фенилаланином (Рис. 3.19). Карбонильная группа дибензофуранового остова УК (кольцо С) образует водородную связь с гидроксильной группой боковой

цепи треонина (Thr261). Гидроксильная группа кольца A образует водородную связь с аминогруппой боковой цепи аспарагина (Asn516). Атом фтора в заместителе также взаимодействует с амином боковой цепи глутамина (Gln241) и имидазольной группой гистидина (His237) (Puc. 3.19). Имидазольные группы каталитических гистидинов His263 и His 493 также блокируются лигандами, что объясняет эффективное ингибирование Tdp1.



Рис. 3.19. Взаимодействие (+)-17b с сайтом связывания Tdp1 (PDB ID: 6DIE, https://www.rcsb.org/structure/6DIE), предсказанное с использованием функции оценки ChemScore.

(А) Синим цветом обозначены гидрофильные области на поверхности белка; коричневым цветом показаны гидрофобные участки, а белым цветом нейтральные области. (Б) Водородные связи между соединением (+)-17b и аминокислотными остатками Thr261, Asn516 показаны зелеными линиями. Фторидная группа (+)-17b взаимодействует с Gln241 и His237. Молекулы воды обозначены как: HOH821, HOH814, HOH1078. (В) Структурная формула (+)-17b.

Далее была изучена цитотоксичность наиболее эффективных гетарилиденгидразонотиазольных производных УК в отношении клеточных линий HeLa (эксперименты с клетками HeLa проводила Екатерина Сергеевна Ильина, ИХБФМ СО РАН, данные приводятся с ее разрешения) (Рис 3.20) и A549 (данные приведены в Приложении таблица 1.7). Производные УК с

обладают низкой цитотоксичностью (СС<sub>50</sub> > 50 мкМ). арилиденом Гетероарилиденовые производные УК (+)- и (-)-16f, содержащие остаток бромтиофена, также обладают низкой цитотоксичностью (СС<sub>50</sub> ~ 80 мкМ), в то время как пара (+)(-)16d, содержащая нитрогруппу, подавляла рост клеток при концентрации 20 мкМ. На основании этих данных была выбрана 5 концентрация мкМ исследования соединений для влияния на цитотоксический эффект топотекана.



Рис 3.20. (А) Дозозависимое влияние гидразонотиазольных производных УК на выживаемость клеток HeLa. (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с гидразонотиазольными производными УК на выживаемость клеток HeLa.

Гетарилиденгидразонотиазольные производные увеличивали цитотоксический эффект топотекана примерно в 2–3 раза (Таблица 3.4., Рис. 3.20), то есть, значения СС<sub>50</sub> топотекана снижались с 6 мкМ до 2–3 мкМ. Сенсибилизирующее действие соединений не зависело от строения заместителя в гидразонотиазольном фрагменте. Таблица 3.4. Значения полуцитотоксических концентраций гетероарилиденовых производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.

Шифр соединения	IC50, нМ	СС50, мкМ HeLa <mark>IS</mark>	Усиление действия Трс, раз
(+) <b>17</b> a	$26\pm8$	>50 1923	2,75
(-)17a	$54 \pm 3$	>50 925	2,39
(+) <b>17b</b>	$26 \pm 4$	>50 1923	2,66
(-)17b	$78\pm3$	>50 641	2,96
(+) <b>16d</b>	$70\pm4$	18,9±4,2 271	2,24
(-)16d	$142\pm4$	19±0,7 133	2,75
(+) <b>16f</b>	$88 \pm 3$	>50 568	-
(-)16f	$43 \pm 1$	>50 1162	-

Таким образом, большинство из изученных производных УК, содержащих гетарилиденогидразонотиазольный фрагмент, являются высокоэффективными ингибиторами Tdp1 с величинами IC<sub>50</sub> в низком наномолярном диапазоне концентраций, обладают низкой или умеренной токсичностью и усиливают цитотоксический эффект топотекана в отношении клеточной линии HeLa [231]. 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. Соединения
были синтезированы сотрудниками ЛФАВ НИОХ СО РАН. Выбор монотерпеноидов в качестве второго структурного компонента для дизайна ингибиторов Tdp1 был основан на предыдущих исследованиях соединений отличного от УК строения, содержащих монотерпеноидные фрагменты. Многие из этих соединений демонстрировали высокую ингибиторную активность и способность усиливать цитотоксическое действие ингибиторов Top1 [40,42,44,45]. Также монотерпеноиды имеют собственный широкий спектр биологической активности и доступную сырьевую базу [232].

Производные (+)-УК с фрагментами монотерпеноидов (**9а-9h**) продемонстрировали высокую ингибирующую активность: значения IC<sub>50</sub> в диапазоне 0,01 – 0,14 мкМ. Полный список изученных соединений и их характеристики приведены в таблице 1.8 в Приложении, в таблице 3.5, приведены соединения с изученной цитотоксичностью. Производные с бициклическими заместителями **9f-h** имели в 3-5 раз более высокие значения IC<sub>50</sub> (45-31 нМ), чем соединения с ациклическими заместителями **9a**, **9b** (значения IC<sub>50</sub> 10,3 и 16,4 нМ соответственно) Интересно, что введение полярной гидроксильной группы в цитронеллиловый остаток (**9c** по сравнению с **9b**) приводило к значительному снижению активности соединений (значения IC<sub>50</sub> 139 и 16 нМ соответственно).

Молекулярное моделирование было выполнено Лихацкой Галиной Николаевной, ТИБОХ ДВО РАН на структурной модели Tdp1 (PDB ID: 6N19). С его помощью была изучена разница в эффективности ингибирования Tdp1 соединением **9b** (IC<sub>50</sub> 16 нМ) с цитронеллиловым фрагменттом и соединением **9c** (IC<sub>50</sub> 139нМ), содержащим гидроксицитронеллиловый фрагмент (Puc. 3.21). Несмотря на то, что по данным докинга оба соединения связываются с каталитическим центром Tdp1, предсказаны их взаимодействия с различными аминокислотными остатками. В остове УК соединения **9b** атом кислорода O5 образует водородные связи с His263, Lys265 и Asn283, а атом серы образует водородные связи с Pro46 и Thr466. В то время как атом кислорода O5 соединения **9c** образует водородную связь только с Lys519, а атом кислорода

гидроксицитронеллилового остатка соединения **9с** связывается с каталитическими остатками His263 и Lys265.

Таким образом, согласно данным моделирования, связывание гидроксильной группы алифатического фрагмента молекулы ингибитора **9c** с активным центром фермента приводило к потере контакта дибензофурановой части ингибитора с каталитическими остатками Tdp1, из-за чего снижалась эффективность ингибирования.



Рис. 3.21. Связывание соединений **9b** и **9c** с активном центром Tdp1 (PDB ID: 6N19). Структуры соединений показаны в виде палочек. Белым цветом обозначен **9b**, желтым цветом **- 9c**. Гидрофобные области белка показаны зеленым цветом, гидрофильные показаны розовым цветом, нейтральные красным цветом. Атом кислорода в остове VK соединения **9b** образует водородные связи с His263, Lys265 и Asn283, а атом серы образует водородные связи с Pro461 и Thr466. В то время как атом кислорода в остове VK соединения **9c** образует водородную связь только с Lys519, а атом кислорода гидроксицитронеллаля связывается с каталитическими остатками His263 и Lys265.

Была изучена цитотоксичность гидразонотиазольных производных УК с монотерпеновыми фрагментами в отношении клеточных линий карциномы шейки матки HeLa, рака легких А-549, глиобластомы человека Т98G (Таблица 3.5). 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 100мкМ). Для клеточной линии HeLa (Puc. 3.23) производные УК, за исключением **9g**, **9h и 9f**, были умеренно токсичны (значения CC<sub>50</sub> от 33 до 77 мкМ приведены в таблице 1.8 в Приложении).

Таблица 3.5. Значения полуцитотоксических концентраций терпеногидразонотиазольных производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток

Шифр соединения	IС50, нМ	СС50, мкМ HeLa IS	СС <sub>50</sub> , мкМ А- 549 <u>IS</u>	СС50, мкМ Т98G <mark>IS</mark>	Усиление действия топотекана HeLa, раз
9a	10.3±0.4	33±9	35±11	14±2	3,4
	10,0=0,1	3300	3500	1400	,
9b	16,4±0,1	77±17	>100	17±3	9.7
		4812	6250	1062	,,,
9e	27±2	65±9	95±21	19±5	4.4
		2407	3518	703	4,4
9f	45±12	>100	>100	>100	2.2
		2222	2222	2222	2,2
9g	46±2	15±5	19±3	17±4	1.7
		326	413	369	1,/
9h	31±11	11±4	34±7	13±3	2.2
		354	1096	419	2,2

В отношении клеточной линии A-549 (Рис. 3.22) гидразонотиазольные соединения так же проявили умеренную токсичность ( $CC_{50}$  34-95 мкМ), как и в случае клеток HeLa. Наиболее токсичным оказалось соединение **9g** со значением  $CC_{50}$  19 мкМ. Соединение **9f** было наименее токсично.

Наиболее чувствительной к действию ингибиторов линией была клеточная линия T98G (Рис. 3.22). В отношении этой линии производные УК были заметно более токсичными ( $CC_{50}$  13–19 мкМ), по сравнению с клеточной линией A-549, за исключением соединения **9f**, которое было умеренно токсично во всем изученном диапазоне концентраций, как и в отношении остальных двух клеточных линий.



Рис. 3.22. (А) Дозозависимое влияние гидразонотиазольных производных УК на выживаемость клеток T98G. (Б) Дозозависимое влияние гидразинотиазольных производных УК на выживаемость клеток А549.

Далее была изучена способность соединений сенсибилизировать действие топотекана. Для этого были использованы нетоксичные концентрации ингибиторов Tdp1 (5 мкМ) и различные концентрации топотекана. Ингибиторы Tdp1 усиливали действие топотекана от 1,7 до 9,7 раз (Таблица 3.4, Рис. 3.23Б). Наиболее эффективными сенсибилизаторами клеток к действию топотекана оказались соединения **9а, 9b и 9e** (Таблица 3.4, Рис. 3.23Б).



Рис. 3.23. (А) Дозозависимое влияние гидразинотиазольных производных УК на выживаемость клеток HeLa. (Б) Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с гидразинотиазольными производными УК на выживаемость клеток HeLa.

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. Данные опубликованы в статье [216].

Среди всех изученных производных УК гидразонотиазольные 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. Были изучены производные хромена, адамантана, а также цианопроизводные УК, арилиденфураноновые производные УК и тиазольные производные УК с различными заместителями. Многие изученные соединения показали высокую ингибирующую активность в отношении Tdp1. Однако

производные хромена не оказали синергетического влияния на цитотоксический эффект топотекана, поэтому дальнейшие исследования этих соединений в качестве сенсибилизаторов нецелесообразны.

Арилиденфураноновые производные УК. несмотря свою на эффективность, плохо растворялись в системе вода-ДМСО, что затрудняет их применение. Производные адамантана и цианопроизводных УК обладали низкой цитотоксичностью и подавляли активность Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций. Соединения класса гидразонотиазольных производных УК показали себя наиболее эффективными ингибиторами, подавляющими активность Tdp1 в наномолярных концентрациях.

Среди класса гидразонотиазольных производных УК было выбрано два соединения для дальнейшего изучения **20d** и **9e**. *Пара*-бромзамещенное соединение **20d** ингибирует Tdp1 со значением IC<sub>50</sub> 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** (IC<sub>50</sub> 27 нМ), содержащее остаток периллового альдегида, ингибирует Tdp1 со значением IC<sub>50</sub> 27 нМ. Это соединение обладает умеренной цитотоксичностью и в нетоксичных концентрациях усиливает действие топотекана в 4,4 раза. Данное соединение менее эффективно по сравнению с соединением **9b** (IC<sub>50</sub> 16 нМ) содержащим остаток цитронеллаля, 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.

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

Метод электрофореза одной клетки или Comet assay (метод ДНК-комет) позволяет детектировать повреждения ДНК в одиночных клетках [233].

Данный метод применяется в фундаментальных исследованиях репарации ДНК, в тестировании генотоксичности новых химических веществ и фармацевтических препаратов [234–236]. В основе метода лежит регистрация различной подвижности ДНК единичных лизированных клеток под действием постоянного электрического тока в агарозном геле. В электрическом поле поврежденная ДНК вытягивается по направлению к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий «хвост кометы», благодаря чему анализ и получил свое название. Параметры хвоста кометы напрямую связаны с уровнем повреждения ДНК. После завершения электрофореза стекла окрашиваются флуоресцентным ДНК-связывающим красителем, после чего флуоресцентную ИХ анализируют, используя микроскопию, пример полученной фотографии приведен на рисунке 3.23Б.

В настоящий момент существует несколько вариантов проведения анализа. С помощью анализа, проводимого в нейтральных условиях среды, детектируют преимущественно двунитевые разрывы ДНК. В то время как использование щелочного варианта метода «ДНК-комет» (pH > 13) [237] позволяет помимо двунитевых разрывов ДНК оценивать количество однонитевых разрывов и щелочно-лабильных сайтов [238].

Известно, что генотоксические агенты в основном вызывают одноцепочечные разрывы ДНК, и для исследования потенциальных лекарств используют щелочную версию метода «ДНК-комет», которая позволяет обнаруживать все типы повреждений ДНК [239].

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 (IC<sub>50</sub> 0,026 мкМ -**20d**, 0,027 мкМ - **9e**) и являются производными модифицированной по Акольцу усниновой кислоты, содержащими тиазольный цикл и гидразоновый линкер. В производном **20d** остов УК связан с *пара*-бромфенильным остатком, а в соединении **9e** остов УК связан с остатком периллового альдегида. Также

оба производных УК значительно усиливают действие топотекана на опухолевые клетки.

Время инкубации клеток с препаратами составляло 1 час, и было выбрано на основании проведенных ранее экспериментов в ЛБХФ ИХБФМ СО РАН Чернышовой Ириной Алексеевной. В этих предварительных экспериментах было показано, что при инкубации клеток с топотеканом в течение 30 минут повреждения ДНК присутствовали в небольших количествах, в течение часа происходило накопление повреждений ДНК, а при инкубации клеток с топотеканом более 3 часов процент повреждения ДНК снижался почти до уровня необработанных клеток. Вероятно, за этот период времени клетки способны репарировать большинство повреждений.

Для изучения влияния производных УК **20d** и **9e** на накопление повреждений ДНК под действием топотекана были выбраны две концентрации соединений 5мкМ и 20мкМ. Так как соединение **20d** более токсичное, мы отталкивались от значения его CC<sub>50</sub>. Величина CC<sub>50</sub> соединения **20d** на клеточной линии была определена равной 9,3мкМ (Раздел 3.1), первая концентрация в ~ 2 раза меньше CC<sub>50</sub>, вторая в ~2 раза выше.

Из полученных результатов видно, что контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 1 часа, содержали незначительное количество поврежденной ДНК как в эксперименте с соединением **20d** - 3,8%, так и в эксперименте с соединением **9e** - 2,3%.

При инкубации клеток с соединением **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, количество поврежденной ДНК выросло до 8,6% и 9,7%, соответственно (Рис. 3.24, таблица 3.6), что значимо отличалось (p-value < 0,005) от клеток, инкубированных с 1% ДМСО. Инкубация клеток с топотеканом в концентрации 5 мкМ приводила к увеличению количества поврежденной ДНК до 14,2%. В результате совместного применения 5 мкМ топотекана и производного УК **20d** в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ количество поврежденной ДНК возрастало до 27,9% и 25,5%, соответственно,

что достоверно (p-value < 0,005) отличается от повреждений, вызванных действием только топотекана в концентрации 5 мкМ (Рис. 3.24).



Рис. 3.24. (А) Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения **20d** в различных концентрациях на действие топотекана. (Б) Пример изображений ДНК-комет, полученных с использованием флюоресцентной микроскопии.

Группа	Среднее количество ДНК в хвосте, %		
Контроль	3,8±3,2		
ДМСО	3,9±3,3		
20d 5мкМ	8,7±4,4		
20d 20мкМ	9,8±4,6		
Трс 5мкМ	14,2±8,2		
Tpc + 20d 5мкМ	27,9±12,6		
Tpc + 20d 20мкМ	25,5±15		

Таблица 3.6. Среднее количество повреждений ДНК, вызванное применением **20d** самостоятельно и в комбинации с топотеканом

При инкубации клеток с соединением **9e** в концентрациях 20 мкМ и 100 мкМ было показано, что количество поврежденной ДНК незначительно отличается от контроля и составляет 3,2% и 4,3% соответственно (Рис. 3.25, таблица 3.7). Таким образом, соединение **9e** обладает низкой генотоксичностью и не влияет на накопление повреждений ДНК в концентрации до 100 мкМ.

Инкубация клеток с топотеканом в концентрации 10 мкМ приводила к увеличению количества поврежденной ДНК до 37,8%. Производное УК **9e** в концентрациях 5 мкМ, 20 мкМ инкубировали с 10 мкМ топотеканом. В случае совместного применения топотекана и **9e** в концентрации 5 мкМ и 20 мкМ наблюдалось статистически значимое повышение количества поврежденной ДНК на 21% и 23,5%, и общее количество поврежденной ДНК составило 54,5% и 59,6%, что значимо отличалось от количества повреждений ДНК, вызванных только топотеканом (p-value < 0,005) (Puc. 3.25). Попарное сравнение между собой результатов разных концентраций **9e**, примененных совместно с топотеканом, показало, что рост концентрации соединения **9e** приводит к значимому (p-value <0,005) увеличению количества поврежденной ДНК.



Рис. 3.25. Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения 9е в различных концентрациях на действие топотекана.

Таблица 3.7.	Среднее количество повреж	ждений ДНК,	вызванное при	менением
9е отдельно	и в комбинации с топотекан	НОМ		

Группа	Среднее количество ДНК в хвосте, %		
Контроль	3,18 ±3,8		
DMSO 1%	2,34 ±3,3		
9е (20 мкМ)	3,23 ±6,8		
9е (100 мкМ)	4,35 ±5		
Трс 10 мкМ	36,35 ±12,6		
Трс 10 мкМ+DMSO 1%	37,84 ±13,8		
Трс 10 мкM+9e(5 мкM)	54,54 ±15,2		
Tpc 10 мкМ+9e(20 мкМ)	59,69 ±15,1		

Из полученных результатов следует, 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 9е и 20d количество поврежденной ДНК значимо росло по сравнению с применением одного топотекана с 14,2% до 28% для соединения 20d, и с 36,4% до 60% - для соединения 9e. При этом для соединения 9e наблюдалась концентрационная зависимость. Количество повреждений ДНК, вызванное совместным применением топотекана с 9e, увеличивалось с 54,5% до 60% при увеличении концентрации 9e с 5мкМ 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 (27,9 %), чем при использовании 20d в концентрации 20 мкМ (25,5%).

Таким образом, было показано, что совместное использование топотекана с ингибиторами Tdp1 9e и 20d позволяет увеличить эффективность топотекана.

Так как известно, что Top1 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 является молекулярной мишенью исследуемых ингибиторов.

#### 3.3 Исследование проапоптотического действия ингибитора Tdp1 20d

Одной из проблем при лечении онкологических заболеваний является неспецифическая высокая токсичность антираковых препаратов, обусловленная, в том числе некротическим путем гибели клеток. Побочным эффектом механизма действия таких препаратов является развитие

воспалительной реакции и интоксикации. К предпочтительным механизмам воздействия на опухолевые клетки относится индукция апоптоза – естественного пути гибели клеток [240]. Многие из клинически используемых противораковых препаратов приводят к клеточной гибели путем апоптоза, в том числе камптотецин и его производные иринотекан и топотекан [76].

Тип клеточной гибели при совместном применении гидразонотиазольного производного УК 20d и топотекана исследовали методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток Аннексином V- FITC и пропидий йодидом (PI). Совместное использование Аннексин V и PI позволяет разделить клетки на живые клетки (AnV - /PI -),ранние (AnV+/PI-),поздние апоптотические клетки апоптотические клетки (AnV+/PI+) и некротические клетки (AnV-/PI+) [241].

Для анализа проапоптотического действия производного усниновой кислоты **20d** были выбраны две концентрации этого соединения 5мкМ и 20мкМ. Величина CC<sub>50</sub> соединения **20d** на клеточной линии MCF-7 была определена равной 9,3мкМ (Раздел 3.1), первая концентрация в ~ 2 раза меньше CC<sub>50</sub>, вторая в ~2 раза выше. Также были выбраны две концентрации топотекана - 2 мкМ и 5 мкМ. Величина CC<sub>50</sub> топотекана для клеточной линии MCF-7 была определена ~5 мкМ, первая концентрация первая концентрация в ~ 2,5 раза меньше CC<sub>50</sub>, вторая равна CC<sub>50</sub>.

выбрано инкубации Время было на основании развития морфологических изменений в клетках, – через 4 часа и 8 часов при данных концентрациях соединения и топотекана морфологических изменений не наблюдалось. Через 24 часа наблюдалось множество клеток С деформированными контурами, открепленных от пластиковой подложки (фото не приведены). На основании этого время инкубации было выбрано равным 14 часам.

Из полученных результатов (Рис. 3.26, таблица 3.8) видно, что контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 14 час, содержали 75% живых клеток, 4% клеток в стадии раннего апоптоза, 13,4 %

клеток в стадии позднего апоптоза и 5,8% клеток в стадии некроза. При инкубации клеток с топотеканом в концентрациях 2 мкМ и 5 мкМ популяция клеток в стадии раннего апоптоза практически не изменялась, по сравнению с контрольной группой клеток. 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 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 37,3%, что ~3 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 с контрольной группой.

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. 3.26. Анализ типа клеточной гибели в клетках МСF7, обработанных **20d**, топотеканом и их комбинацией. Клетки с топотеканом в концентрацях 2 и 5 мкМ, ингибитором в концентрациях 5 и 20 мкМ и их комбинацией, инкубировали в течение 14 часов и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin V/PI. Q1 – (фиолетовый) некротическая популяция, Q2 – (желтый) поздняя апоптотическая популяция, Q3 (зеленый) – живые клетки, Q4 (голубой) – ранняя апоптотическая популяция.

Таблица 3.8. Процент клеток, находящихся на различной стадии клеточной гибели, вызванной применением **20d** как отдельно, так и в комбинации с топотеканом.

Группа	Q1 (некроз)	Q2 (поздний апоптоз)	Q3 (живые клетки)	Q4 (ранний апоптоз)
Контроль	5,8±0,4	$13,4\pm 1,07$	76,4± 5,3	4,3±0,7
20d 5 мкМ	4,6±0,6	18,7±1,1	67,3± 8,8	$9,4{\pm}0,6$
20d 20 мкМ	4,2±0,2	$17,4\pm 2$	69,2±7,6	9,3±1,2
Трс 2 мкМ	4,9±0,3	26,4± 3,2	$64,5\pm 6,4$	$4,2\pm 0,6$
Трс 5 мкМ	13,1±0,8	37,3± 5,2	44,3± 5,3	5,2±0,3
Трс 2 мкМ+ 20d 5 мкМ	14,4±1,4	53,1±4,4	28,9±4,0	$3,5\pm 0,5$
Tpc 2 мкМ+ 20d 20 мкМ	$12,3\pm1,1$	$50,1\pm 6,0$	32,8±4,6	$4,8 \pm 0,5$
Трс 5 мкМ+ 20d 5 мкМ	15,9±1,3	50,0±4	29,5±1,5	$4,6\pm 0,8$
Трс 5 мкM+ 20d 20мкМ	$10,2\pm1,1$	$54,3\pm 5,4$	$30,8\pm 4,6$	$4,7\pm 0,6$

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. Рост клеточной популяции составил 26 % - при совместной инкубации 2 мкМ топотекана и **20d** в концентрации 5 мкМ, и 23% - при совместной инкубации 2 мкМ топотекана и **20d** в концентрации 20 мкМ. При повышении концентрации топотекана до 5мкМ в присутствии ингибитора 20d в концентрациях 5 мкМ и 20 мкМ, популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличивалась до 50% и 54,3%, соответственно. Рост популяции по сравнению с использованием только 5мкМ топотекана составил 13% при совместной инкубации 5 мкМ топотекана и 20d в концентрации 5 мкМ и 17% при совместной инкубации 5 мкМ топотекана и 20d в концентрации 20 мкМ. Стоит

отметить, что поздняя стадия апоптоза наступает, когда клеточная мембрана становится проницаемой, характеризуется фрагментацией ДНК и является необратимой фазой программируемой клеточной гибели. Таким образом, повышение доли позднеаптоптотических клеток под действием **20d** позволяет сделать вывод, что совместное использование топотекана с ингибитором Tdp1 увеличивает эффективность топотекана и позволяет использовать его в более низких концентрациях.

### 3.4 Изучение влияния ингибитора Tdp1 на противоопухолевый эффект топотекана *in vivo*

В предыдущем разделе были описаны ингибиторные свойства производных УК в отношении очищенного фермента Tdp1, цитотоксичность этих соединений и их способность сенсибилизировать цитотоксический эффект топотекана *in vitro*. Наиболее перспективными по этим показателям соединениями были гидразонотиазольные производные УК, а именно соединение **20d**. Поэтому следующим шагом была проверка гипотезы о том, что ингбиторы Tdp1 усиливают действие топотекана *in vivo*.

Для исследования сенсибилизирующего 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 (Новосибирск, Россия), и поддерживается у мышей в качестве трансплантированных опухолей. Использование ксенографтов человеческих опухолей для изучения сенсибилизирующего эффекта производных УК требовало дополнительного финансирования, поэтому в работе не использовалось.

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 экспрессирует гены главного комплекса гистосовместимости и является специфичной для

мышей линии C57BL. 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 [242].

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 [243]. Поэтому мы использовали дозы 100 мг/кг при внутрижелудочном способе введения ингибитора Tdp1. В связи с тем, что исследуемые соединения **20d** не растворяются в воде, для приготовления суспензии использовали смесь 15% ДМСО и 10% Твин-80.

Топотекан мышам вводили внутрибрюшинно, так как внутрибрюшинный способ введения лекарственных препаратов мышам считается аналогом внутривенного введения препаратов у человека. Доза топотекана подбиралась таким образом, чтобы при кратном введении не излечить опухоль, а выявить сенсибилизирующий эффект ингибитора Tdp1 [244].

#### 3.4.1 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** сенсибилизировать противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана на опухоль LLC.

После внутримышечной трансплантации опухоли LLC по 800 тыс клеток на мышь все животные были разделены рандомно на экспериментальные группы. 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 внутрибрюшинно в разовой дозе 1,5 мг/кг.
  Выбранная доза топотекана неэффективна против первичной опухоли при четырехкратном введении, но достаточна для выявления сенсибилизирующего эффекта ингибитора Tdp1;
- Группа 3 получала одновременно топотекан в дозе 1,5 мг/кг и ингибитор Tdp1 20d внутрижелудочно в разовой дозе 100 мг/кг в виде суспензии в 15% ДМСО и 10% Твин-80;
- Группа 4 получала внутрижелудочно в виде суспензии только ингибитор Tdp1 20d в разовой дозе 100 мг/кг в 15% ДМСО/ 10% Твин-80.

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 или два дня до расчетного времени смерти мышей в контроле. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 3.27.



Рис.3.27. Дизайн эксперимента А-группа 1, Б-группа 2, В-группа 3, Г-группа 4. На рисунке приведены разовые дозы препаратов.

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 или два дня до расчетного времени смерти мышей в контроле.

В таблице 2 в Приложении приведены весовые характеристики всех групп мышей на момент трансплантации опухоли и на момент окончания эксперимента, а также масса селезенки, печеночный индекс и число метастазов в легких. На рисунке 3.28 приведены данные об изменении веса мышей.



Рис. 3.28. Изменение веса мышей под действием топотекана и соединения **20d**, достоверных различий между экспериментальными группами и контрольной не выявлено.

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 (таблица 2 в Приложении).

При введении в монорежиме соединение 20d не влияло на вес опухоли, комбинации но В с топотеканом значительно усиливало его противоопухолевое действие, снижая массу опухоли на 58% по сравнению с контролем (Рис. 3.29А). 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. 3.29Б), по использованием топотекана в монорежиме. Количество сравнению с метастазов в группе мышей, получавшей только ингибитор 20d, было

незначительно больше, чем в контрольной группе. Подсчёт метастазов в легких животных осуществляли под микроскопом MBI-3 при четырехкратном увеличении после фиксации легких в 10% формалине.



Рис. 3.29. 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 является перспективным кандидатом для дальнейшей разработки в качестве сенсибилизатора 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

В настоящий момент актуальной задачей остается поиск эффективных препаратов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Одним из перспективных направлений в современной фармакологии является поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК. Широкий спектр существующих методов лечения онкологических заболеваний направлен на повреждение ДНК опухолевых клеток. Однако работа системы репарации ДНК снижает эффективность противоопухолевой терапии. Селективное воздействие, направленное на подавление активности ферментов репарации ДНК, является одним из путей увеличения эффективности терапии онкологических заболеваний [4–11].

На сегодняшний день известно, что фермент репарации Tdp1 играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, образующихся при ингибировании Top1 клинически используемыми противоопухолевыми препаратами (иринотекан, топотекан), а также участвует в репарации повреждений ДНК, вызванных другими противоопухолевыми препаратами (темозоломидом, блеомицином, этопозидом) [8,14,18]. Поэтому одним из многообещающих направлений является поиск ингибиторов Tdp1, которые позволят увеличить эффективность используемых противораковых препаратов.

Систематической разработкой ингибиторов Tdp1 занимаются два научных коллектива: группа молекулярной фармакологии Ива Поммье (Yves Pommier), Национальный институт рака, США, и наш коллектив. Группой Ива Помье был обнаружен ряд ингибиторов Tdp1 с низкой и средней эффективностью [23–26]. Этим коллективом был разработан ряд двойных Tdp1/Top1 и тройных Tdp1/Tdp2/Top1 ингибиторов. Такие соединения могут одновременно вызывать повреждение ДНК и препятствовать ее восстановлению [27–34], и могли бы использоваться в качестве монотерапии онкологических заболеваний. Однако, данные соединения обладают высокой

собственной цитотоксичностью, что затрудняет их использование в комплексе с другими противоопухолевыми препаратами и подбор оптимальной дозировки. Также нет данных об исследовании этих соединений *in vivo*. Соединения, изучаемые нашим коллективом, предполагается использовать в коктейлях с противоопухолевыми препаратами, поэтому их собственная низкая токсичность имеет существенное значение.

Данная работа представляет собой систематическое исследование, в рамках которого в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены соединения на основе природных биологически активных веществ. Исходные вещества обладают широким диапазоном биологической активности и имеют доступную сырьевую базу, однако они обладают либо существенным токсическим эффектом в диапазоне эффективных концентраций, либо не подавляют активность Tdp1 [60,61], поэтому чтобы снизить токсический эффект и улучшить ингибиторные характеристики в отношении Tdp1, был выполнен ряд модификаций исходных соединений.

Целью данной работы был поиск сенсибилизаторов действия топотекана в отношении опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* среди ингибиторов Tdp1, синтезированных на основе природных биологически активных веществ.

Впервые в качестве ингибиторов Tdp1 были изучены производные хромена и адамантана, а также цианопроизводные УК, фураноновые производные VK 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 VK подавляют Tdp1 в микромолярном диапазоне концентраций (величины IC<sub>50</sub> 0,64–15 мкМ), а фураноновые и гидразонотиазольные производные VK ингибируют Tdp1 в наномолярных концентрациях (значения IC<sub>50</sub> от 10 нМ).

Автором диссертации также была изучена цитотоксичность наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 на основе УК в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. Поскольку ингибиторы Tdp1 предполагается

коктейлях противоопухолевыми использовать В С препаратами, ИХ собственная низкая токсичность и отсутствие дополнительных побочных эффектов имеют существенное значение. 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. Ожидаемым эффектом совместного применения топотекана и ингибиторов Tdp1 является повышение чувствительности опухолевых клеток к действию топотекана. Наиболее эффективными сенсибилизаторами опухолевых клеток к действию топотекана оказались гидразонотиазольные производные УК. Было показано, что соединения 9e и 20d, усиливают действие топотекана в отношении различных перевиваемых линий опухолевых клеток в 3,9-8 раз.

Впервые методом ДНК-комет было показано увеличение количества повреждений ДНК при совместном использовании соединений **9e** и **20d** с топотеканом, по сравнению с применением только топотекана. Это может косвенно указывать на то, что молекулярной мишенью исследуемых соединений в живой клетке действительно является Tdp1.

В данной работе методом проточной цитометрии показано, что соединение **20d** само по себе не индуцирует клеточную гибель, но при совместном использовании с топотеканом увеличивает количество апоптотических клеток, что позволяет использовать топотекан в более низких концентрациях. Полученные результаты согласуются с результатами, полученными методом ДНК-комет.

На основе совокупности данных, полученных *in vitro*, соединение **20d** было выбрано для изучения сенсибилизирующего эффекта *in vivo* на перевиваемой опухоли мышей. Впервые было показано, что ингибитор Tdp1 в комбинации с топотеканом усиливает его антиметастатический эффект *in vivo*.

В данной работе были решены все поставленные задачи и среди большого количества производных УК найдены высокоэффективные ингибиторы Tdp1. Так же в данной работе был впервые протестирован *in vivo* 

ингибитор Tdp1 на основе УК. Полученные *in vivo* предварительные данные свидетельствуют о том, что найденный ингибитор Tdp1 пригоден для дальнейшей разработки эффективной сопровождающей терапии онкологических заболеваний. Тем не менее, необходимо детальнее изучить влияние соединения **20d** на организм и выявить возможные побочные эффекты. Для этого требуется провести доклинические испытания, после чего будет возможен переход к клиническим испытаниям ингибиторов Tdp1.

### выводы

- 1. Производные адамантана хромена, И цианопроизводные усниновой кислоты ингибируют фермент репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1 (Tdp1) в диапазоне значений IC<sub>50</sub> 1-15мкМ. 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<sub>50</sub> >50 мкМ, цитотоксическая активность арилиденфураноновых и гидразонотиазольных производных усниновой кислоты варьировала в диапазоне от 3 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 сенсибилизирующий эффект. Наиболее эффективными сенсибилизаторами оказались гидразонотиазольные производные усниновой кислоты.
- 4. Совместное использование топотекана и гидразонотиазольного производного усниновой кислоты 9е или 20d усиливает накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом, при этом сами по себе соединения 9е 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 1–250 р.
- Dexheimer T. et al. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase as a Target for Anticancer Therapy // Anticancer. Agents Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd., 2012. Vol. 8, № 4. P. 381–389.
- 3. Hengel S.R., Spies M.A., Spies M. Small-Molecule Inhibitors Targeting DNA Repair and DNA Repair Deficiency in Research and Cancer Therapy // Cell Chemical Biology. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 24, № 9. P. 1101–1119.
- Abbotts R., Thompson N., Madhusudan S. DNA repair in cancer: Emerging targets for personalized therapy // Cancer Manag. Res. Cancer Manag Res, 2014. Vol. 6, № 1. P. 77–92.
- Захаренко А.Л., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ В ОНКОТЕРАПИИ, "Биоорганическая химия" // Биоорганическая химия. Akademizdatcenter Nauka, 2018. № 1. Р. 3–21.
- 6. Curtin N.J. Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer // Br. J. Pharmacol. Wiley-Blackwell, 2013. Vol. 169, № 8. P. 1745.
- 7. Laev S.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: Progress and potential // Bioorganic and Medicinal Chemistry. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 24, № 21. P. 5017–5027.
- 8. Brettrager E.J., van Waardenburg R.C.A.M. Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts. // Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.). 2019. Vol. 2. P. 1153–1163.
- Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc., 2019. Vol. 39, № 4. P. 1427–1441.
- Matsuno Y. et al. Sensitization of Cancer Cells to Radiation and Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin Using Inhibitors of PARP and Other Signaling Molecules // Cancers (Basel). Cancers (Basel), 2018. Vol. 10, № 10. P. 364.
- 11. Cuya S.M., Bjornsti M.-A., van Waardenburg R.C.A.M. DNA topoisomerasetargeting chemotherapeutics: what's new? // Cancer Chemother. Pharmacol. Cancer Chemother Pharmacol, 2017. Vol. 80, № 1. P. 1–14.
- 12. Yang S.W. et al. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. Vol. 93, № 21. P. 11534–11539.
- Stewart L. et al. A model for the mechanism of human topoisomerase I // Science (80-. ). 1998. Vol. 279, № 5356. P. 1534–1541.
- 14. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond // Nat. Rev. Cancer. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 6, № 10. P. 789–802.

- Pommier Y. DNA topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, biology, and interfacial inhibition // Chem. Rev. NIH Public Access, 2009. Vol. 109, № 7. P. 2894–2902.
- Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001. Vol. 98, № 21. P. 12009–12014.
- 17. Comeaux E.Q., Van Waardenburg R.C.A.M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // Drug Metab. Rev. 2014. Vol. 46, № 4. P. 494–507.
- Pommier Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chemistry and Biology. Cell Press, 2010. Vol. 17, № 5. P. 421–433.
- 19. Beretta G. et al. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Targeting for Modulation of Camptothecin-Based Treatment // Curr. Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd., 2010. Vol. 17, № 15. P. 1500–1508.
- Chen A.Y., Liu L.F. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 1994. Vol. 34, № 1. P. 191–218.
- 21. Wang J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. Vol. 3, № 6. P. 430–440.
- Alagoz M., Wells O.S., El-Khamisy S.F. TDP1 deficiency sensitizes human cells to base damage via distinct topoisomerase I and PARP mechanisms with potential applications for cancer therapy // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42, № 5. P. 3089–3103.
- 23. Liao Z. et al. Inhibition of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase by aminoglycoside antibiotics and ribosome inhibitors // Mol. Pharmacol. Mol Pharmacol, 2006. Vol. 70, № 1. P. 366–372.
- Sirivolu V.R. et al. 5-Arylidenethioxothiazolidinones as Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase i // J. Med. Chem. J Med Chem, 2012. Vol. 55, № 20. P. 8671–8684.
- 25. Jun J.H. et al. Synthesis, anti-cancer screening and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) inhibition activity of novel piperidinyl sulfamides. // Eur. J. Pharm. Sci. Elsevier B.V., 2018. Vol. 111. P. 337–348.
- Cushman M. Design and Synthesis of Indenoisoquinolines Targeting Topoisomerase I and Other Biological Macromolecules for Cancer Chemotherapy // J. Med. Chem. J Med Chem, 2021. Vol. 64, № 24. P. 17572– 17600.
- Conda-Sheridan M. et al. Synthesis and biological evaluation of indenoisoquinolines that inhibit both tyrosyl-DNA phosphodiesterase i (Tdp1) and topoisomerase i (Top1) // J. Med. Chem. J Med Chem, 2013. Vol. 56, № 1. P. 182–200.
- 28. Nguyen T.X. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-Hydroxyindenoisoquinolines as Potential Dual Topoisomerase i (Top1)-Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase i (TDP1) Inhibitors // J. Med. Chem.

American Chemical Society, 2015. Vol. 58, № 7. P. 3188–3208.

- 29. Wang P. et al. Synthesis and Biological Evaluation of the First Triple Inhibitors of Human Topoisomerase 1, Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1), and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 (Tdp2) // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2017. Vol. 60, № 8. P. 3275–3288.
- Zhang X.R. et al. Discovery, Synthesis, and Evaluation of Oxynitidine Derivatives as Dual Inhibitors of DNA Topoisomerase IB (TOP1) and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1), and Potential Antitumor Agents // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2018. Vol. 61, № 22. P. 9908– 9930.
- Lv P.C. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of O-2-modified indenoisoquinolines as dual topoisomerase I-tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2014. Vol. 57, № 10. P. 4324–4336.
- 32. Hu D.-X. et al. Synthesis of Methoxy-, Methylenedioxy-, Hydroxy-, and Halo-Substituted Benzophenanthridinone Derivatives as DNA Topoisomerase IB (TOP1) and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) Inhibitors and Their Biological Activity for Drug-Resistant Cancer // J. Med. Chem. J Med Chem, 2021. Vol. 64, № 11. P. 7617–7629.
- Nguyen T.X. et al. Synthesis and biological evaluation of the first dual tyrosyl-DNA phosphodiesterase i (Tdp1)-topoisomerase i (Top1) inhibitors // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2012. Vol. 55, № 9. P. 4457–4478.
- Beck D.E. et al. Investigation of the Structure-Activity Relationships of Aza-A-Ring Indenoisoquinoline Topoisomerase I Poisons // J. Med. Chem. J Med Chem, 2016. Vol. 59, № 8. P. 3840–3853.
- 35. Zakharenko A. et al. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // J. Nat. Prod. American Chemical Society, 2016. Vol. 79, № 11. P. 2961–2967.
- 36. Dyrkheeva N. et al. Inhibitory Effect of New Semisynthetic Usnic Acid Derivatives on Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 // Planta Med. Georg Thieme Verlag, 2019. Vol. 85, № 2. P. 103–111.
- Koldysheva E. V. et al. Antimetastatic Activity of Combined Topotecan and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase-1 Inhibitor on Modeled Lewis Lung Carcinoma // Bull. Exp. Biol. Med. Springer New York LLC, 2019. Vol. 166, № 5. P. 661–666.
- 38. Zakharenko A.L. et al. Usnic acid derivatives are effective inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Russ. J. Bioorganic Chem. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, 2017. Vol. 43, № 1. P. 84–90.
- 39. Khomenko T.M. et al. Promising New Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I (Tdp 1) Combining 4-Arylcoumarin and Monoterpenoid Moieties as Components of Complex Antitumor Therapy // Int. J. Mol. Sci. MDPI AG, 2019. Vol. 21, № 1. P. 126.
- 40. Khomenko T. et al. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties // Bioorganic Med. Chem. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 24, № 21. P. 5573–5581.

- 41. Zakharenko A.L. et al. Inhibitory properties of nitrogen-containing adamantane derivatives with monoterpenoid fragments against tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Russ. J. Bioorganic Chem. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, 2015. Vol. 41, № 6. P. 657–662.
- 42. Ponomarev K.Y. et al. Aminoadamantanes containing monoterpene-derived fragments as potent tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors // Bioorg. Chem. 2018. Vol. 76. P. 392–399.
- Zakharenko A.L. et al. Synthesis and Inhibitory Properties of Imines Containing Monoterpenoid and Adamantane Fragments Against DNA Repair Enzyme Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) // Chem. Nat. Compd. 2018 544. Springer, 2018. Vol. 54, № 4. P. 672–676.
- 44. Mozhaitsev E.S. et al. Novel Inhibitors of DNA Repair Enzyme TDP1 Combining Monoterpenoid and Adamantane Fragments // Anticancer. Agents Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd., 2018. Vol. 19, № 4. P. 463– 472.
- 45. Chepanova A.A. et al. The Development of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors. Combination of Monoterpene and Adamantine Moieties via Amide or Thioamide Bridges // Appl. Sci. 2019, Vol. 9, Page 2767. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 9, № 13. P. 2767.
- 46. Munkuev A.A. et al. Novel Tdp1 Inhibitors Based on Adamantane Connected with Monoterpene Moieties via Heterocyclic Fragments // Molecules. Molecules, 2021. Vol. 26, № 11. P. 3128.
- 47. Arabshahi H.J. et al. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues // Medchemcomm. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 6, № 11. P. 1987–1997.
- 48. Komarova A.O. et al. Novel group of tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 inhibitors based on disaccharide nucleosides as drug prototypes for anti-cancer therapy // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. Taylor and Francis Ltd, 2018. Vol. 33, № 1. P. 1415–1429.
- 49. Zakharenko A.L. et al. Inhibition of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 by Lipophilic Pyrimidine Nucleosides // Molecules. MDPI AG, 2020. Vol. 25, № 16. P. 3694.
- 50. Dyrkheeva N.S. et al. In Vitro and In Silico Studies of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) Inhibition by Stereoisomeric Forms of Lipophilic Nucleosides: The Role of Carbohydrate Stereochemistry in Ligand-Enzyme Interactions // Molecules. Molecules, 2022. Vol. 27, № 8. P. 2433.
- Il'ina I. V. et al. Design, synthesis, and biological investigation of novel classes of 3-carene-derived potent inhibitors of TDP1 // Molecules. MDPI AG, 2020. Vol. 25, № 15. P. 3496.
- 52. Salomatina O. et al. Novel Semisynthetic Derivatives of Bile Acids as Effective Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors // Molecules. MDPI AG, 2018. Vol. 23, № 3. P. 679.
- 53. Salomatina O. V. et al. Deoxycholic acid as a molecular scaffold for tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition: A synthesis, structure-activity relationship and molecular modeling study. // Steroids. Elsevier Inc., 2021.

Vol. 165. P. 108771.

- 54. Salomatina O. V. et al. New Deoxycholic Acid Derived Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors Also Inhibit Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 // Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 27, № 1. P. 72.
- 55. Gladkova E.D. et al. The first berberine-based inhibitors of tyrosyl-dna phosphodiesterase 1 (Tdp1), an important dna repair enzyme // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 19. P. 1–16.
- Gladkova E.D. et al. Discovery of Novel Sultone Fused Berberine Derivatives as Promising Tdp1 Inhibitors // Molecules. MDPI AG, 2021. Vol. 26, № 7. P. 1945.
- 57. Kovaleva K. et al. Design, synthesis, and molecular docking study of new tyrosyl-dna phosphodiesterase 1 (Tdp1) inhibitors combining resin acids and adamantane moieties // Pharmaceuticals. MDPI, 2021. Vol. 14, № 5. P. 422.
- Kovaleva K. et al. Dehydroabietylamine-based thiazolidin-4-ones and 2thioxoimidazolidin-4-ones as novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors // Mol. Divers. Mol Divers, 2021. Vol. 25, № 4. P. 2389–2397.
- 59. Zakharenko A. et al. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // Bioorganic Med. Chem. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 23, № 9. P. 2044–2052.
- Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 1. Активность в отношении одноклеточных организмов // Биоорганическая химия. Akademizdatcenter Nauka, 2016. Vol. 42, № 2. Р. 129–149.
- 61. Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 2. Действие усниновой кислоты и ее производных на высшие организмы, молекулярные и физикохимические аспекты биологической активности // Биоорганическая химия. Akademizdatcenter Nauka, 2016. Vol. 42, № 3. Р. 276–300.
- 62. Ponting C.P., Kerr I.D. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues // Protein Sci. Wiley, 1996. Vol. 5, № 5. P. 914–922.
- 63. Pommier Y. et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // DNA Repair (Amst). Elsevier B.V., 2014. Vol. 19. P. 114–129.
- 64. Leiros I. et al. The first crystal structure of a phospholipase D // Structure. 2000. Vol. 8, № 6. P. 655–667.
- 65. Stuckey J.A., Dixon J.E. Crystal structure of a phospholipase D family member // Nat. Struct. Biol. Nat Struct Biol, 1999. Vol. 6, № 3. P. 278–284.
- 66. Davies D.R. et al. Crystal structure of a transition state mimic for Tdp1 assembled from vanadate, DNA, and a topoisomerase I-derived peptide // Chem. Biol. Elsevier Ltd, 2003. Vol. 10, № 2. P. 139–147.
- 67. Davies D.R. et al. The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1. // Structure. 2002. Vol. 10, № 2. P. 237–248.
- 68. Davies D.R. et al. Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism of

Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (Tdp1) from Vanadate and Tungstate-inhibited Structures // J. Mol. Biol. Academic Press, 2002. Vol. 324, № 5. P. 917–932.

- 69. Kanaar R., Cozzarelli N.R. Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions // Curr. Opin. Struct. Biol. 1992. Vol. 2, № 3. P. 369–379.
- 70. Krogh S. et al. Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature // Nucleic Acids Res. 1991. Vol. 19, № 6. P. 1235–1241.
- Seol Y. et al. A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. Vol. 109, № 40. P. 16125–16130.
- 72. Pourquier P. et al. Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 12. P. 7792–7796.
- 73. Pourquier P. et al. Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects // J. Biol. Chem. J Biol Chem, 1997. Vol. 272, № 42. P. 26441–26447.
- 74. Staker B.L. et al. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. Vol. 99, № 24. P. 15387–15392.
- Nitiss J., Wang J.C. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 1988. Vol. 85, № 20. P. 7501–7505.
- 76. Galluzzi L. et al. Cell death signaling and anticancer therapy // Frontiers in Oncology. Frontiers, 2011. Vol. 1, № 5. P. 1–18.
- 77. Liu L.F. et al. Mechanism of action of camptothecin // Annals of the New York Academy of Sciences. John Wiley & Sons, Ltd, 2000. Vol. 922, № 1. P. 1–10.
- D'Arpa P., Beardmore C., Liu L.F. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons // Cancer Res. Cancer Res, 1990. Vol. 50, № 21. P. 6919–6924.
- Sordet O. et al. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors // Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. Vol. 3, № 4. P. 271–290.
- 80. García C.P. et al. Topoisomerase I inhibitor, camptothecin, induces apoptogenic signaling in human embryonic stem cells // Stem Cell Res. Stem Cell Res, 2014. Vol. 12, № 2. P. 400–414.
- 81. Ha S.W. et al. Antitumor Effects of Camptothecin Combined with Conventional Anticancer Drugs on the Cervical and Uterine Squamous Cell Carcinoma Cell Line SiHa // Korean J. Physiol. Pharmacol. Korean J Physiol Pharmacol, 2009. Vol. 13, № 2. P. 115–121.
- 82. Strumberg D. et al. Conversion of Topoisomerase I Cleavage Complexes on the Leading Strand of Ribosomal DNA into 5'-Phosphorylated DNA Double-Strand Breaks by Replication Runoff // Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology (ASM), 2000. Vol. 20, № 11. P. 3977.
- 83. Zhang H., Wang J.C., Liu L.F. Involvement of DNA topoisomerase I in

transcription of human ribosomal RNA genes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. Vol. 85, № 4. P. 1060–1064.

- 84. Wu J., Liu L.F. Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 1997. Vol. 25, № 21. P. 4181.
- 85. O'Connor P.M. et al. S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells // Cancer Commun. Cancer Commun, 1991. Vol. 3, № 8. P. 233–240.
- 86. Holm C. et al. Differential Requirement of DNA Replication for the Cytotoxicity of DNA Topoisomerase I and II Inhibitors in Chinese Hamster DC3F Cells // Cancer Res. 1989. Vol. 49, № 22. P. 6365–6368.
- 87. Senter P.D. et al. Identification and activities of human carboxylesterases for the activation of CPT-11, a clinically approved anticancer drug // Bioconjug. Chem. Bioconjug Chem, 2001. Vol. 12, № 6. P. 1074–1080.
- 88. Talukdar A. et al. Topoisomerase I inhibitors: Challenges, progress and the road ahead. // Eur. J. Med. Chem. Eur J Med Chem, 2022. Vol. 236. P. 114304.
- 89. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. // ACS Chem. Biol. NIH Public Access, 2013. Vol. 8, № 1. P. 82–95.
- 90. Pommier Y. DNA topoisomerases and cancer // DNA Topoisomerases and Cancer / ed. Pommier Y. New York, NY: Springer New York, 2012. 1–443 p.
- 91. Martino E. et al. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs // Bioorg. Med. Chem. Lett. Bioorg Med Chem Lett, 2017. Vol. 27, № 4. P. 701–707.
- 92. Hamilton G. Comparative characteristics of small cell lung cancer and Ewing's sarcoma: a narrative review. // Transl. lung cancer Res. Transl Lung Cancer Res, 2022. Vol. 11, № 6. P. 1185–1198.
- 93. D'Amico R.S. et al. Convection-enhanced drug delivery for glioblastoma: a review // J. Neurooncol. J Neurooncol, 2021. Vol. 151, № 3. P. 415–427.
- 94. Lavergne O. et al. Homocamptothecins: E-ring modified CPT analogues // Ann. N. Y. Acad. Sci. Ann N Y Acad Sci, 2000. Vol. 922. P. 100–111.
- 95. Thomas C.J., Rahier N.J., Hecht S.M. Camptothecin: current perspectives // Bioorg. Med. Chem. Bioorg Med Chem, 2004. Vol. 12, № 7. P. 1585–1604.
- 96. Fassberg J., Stella V.J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues // J. Pharm. Sci. J Pharm Sci, 1992. Vol. 81, № 7. P. 676–684.
- 97. Sun Y. et al. PARylation prevents the proteasomal degradation of topoisomerase I DNA-protein crosslinks and induces their deubiquitylation // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 12, № 1. P. 5010.
- 98. Sun Y. et al. Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. // DNA Repair (Amst). DNA Repair (Amst), 2020. Vol. 94. P. 102926.
- 99. Desai S.D. et al. Transcription-Dependent Degradation of Topoisomerase I-DNA Covalent Complexes // Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology (ASM), 2003. Vol. 23, № 7. P. 2341.
- 100. Lin C.P. et al. Proteasome-dependent Processing of Topoisomerase I-DNA Adducts into DNA Double Strand Breaks at Arrested Replication Forks // J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009. Vol. 284, № 41. P. 28084.
- 101. Pouliot J.J. et al. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes // Science (80-. ). 1999. Vol. 286, № 5439. P. 552–555.
- 102. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017 1810. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 18, № 10. P. 610–621.
- 103. Chowdhuri S.P., Das B.B. Top1-PARP1 association and beyond: from DNA topology to break repair. // NAR cancer. Oxford Academic, 2021. Vol. 3, № 1. P. zcab003.
- 104. Murai J., Pommier Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers // https://doi.org/10.1146/annurevcancerbio-030518-055914. Annual Reviews , 2019. Vol. 3, № 1. P. 131–150.
- 105. Das B.B. et al. PARP1–TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I– induced DNA damage // Nucleic Acids Res. Oxford Academic, 2014. Vol. 42, № 7. P. 4435–4449.
- 106. Zagnoli-Vieira G., Caldecott K.W. Untangling trapped topoisomerases with tyrosyl-DNA phosphodiesterases. // DNA Repair (Amst). DNA Repair (Amst), 2020. Vol. 94. P. 102900.
- 107. Karimi-Busheri F. et al. Repair of DNA strand gaps and nicks containing 3'phosphate and 5'-hydroxyl termini by purified mammalian enzymes // Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res, 1998. Vol. 26, № 19. P. 4395–4400.
- 108. Wilson D.M. Processing of nonconventional DNA strand break ends // Environ. Mol. Mutagen. Environ Mol Mutagen, 2007. Vol. 48, № 9. P. 772– 782.
- 109. Debethune L. Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, № 5. P. 1198–1204.
- 110. Weinfeld M. et al. Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair // Trends Biochem. Sci. Trends Biochem Sci, 2011. Vol. 36, № 5. P. 262–271.
- 111. Interthal H. et al. SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity // EMBO J. EMBO J, 2005. Vol. 24, № 12. P. 2224–2233.
- 112. Takashima H. et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy // Nat. Genet. Nat Genet, 2002. Vol. 32, № 2. P. 267–272.
- 113. Interthal H., Champoux J.J. Effects of DNA and protein size on substrate cleavage by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Biochem. J. Biochem J, 2011. Vol. 436, № 3. P. 559–566.
- 114. Interthal H. et al. Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages // J. Biol. Chem. American Society for

Biochemistry and Molecular Biology, 2005. Vol. 280, № 43. P. 36518–36528.

- 115. Murai J. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells // J. Biol. Chem. J Biol Chem, 2012. Vol. 287, № 16. P. 12848–12857.
- 116. Nitiss K.C. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. Vol. 103, № 24. P. 8953–8958.
- 117. Zhou T. et al. Deficiency in 3'-phosphoglycolate processing in human cells with a hereditary mutation in tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33, № 1. P. 289–297.
- 118. Inamdar K. V et al. Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1 // J. Biol. Chem. J Biol Chem, 2002. Vol. 277, № 30. P. 27162–27168.
- 119. Zhou T. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase and the repair of 3'phosphoglycolate-terminated DNA double-strand breaks // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2009. Vol. 8, № 8. P. 901–911.
- 120. BB D. et al. Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria.
  // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2010. Vol. 107, № 46. P. 19790–19795.
- 121. El-Khamisy S.F. et al. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2009. Vol. 8, № 6. P. 760–766.
- 122. Ben Hassine S., Arcangioli B. Tdp1 protects against oxidative DNA damage in non-dividing fission yeast // EMBO J. John Wiley {\&} Sons, Ltd, 2009. Vol. 28, № 6. P. 632–640.
- 123. Dexheimer T.S. et al. The DNA binding and 3'-end preferential activity of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, № 7. P. 2444–2452.
- 124. Huang S.N. et al. TDP1 repairs nuclear and mitochondrial DNA damage induced by chain-terminating anticancer and antiviral nucleoside analogs // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, № 16. P. 7793–7803.
- 125. Al Abo M. et al. TDP1 is Critical for the Repair of DNA Breaks Induced by Sapacitabine, a Nucleoside also Targeting ATM- and BRCA-Deficient Tumors // Mol. Cancer Ther. Mol Cancer Ther, 2017. Vol. 16, № 11. P. 2543– 2551.
- 126. Tada K. et al. Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDP1-deficient adult T cell leukemia. // Sci. Adv. Sci Adv, 2015. Vol. 1, № 3. P. e1400203.
- Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // FEBS Lett. John Wiley {\&} Sons, Ltd, 2011. Vol. 585, № 4. P. 683–686.
- 129. Речкунова Н.И., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. Тирозил-Днк-

Фосфодиэстераза 1 – Новый Участник Репарации Апуриновых/Апиримидиновых Сайтов В Днк (Обзорная Статья) // Биоорганическая Химия. 2015. Vol. 41, № 5. Р. 531–538.

- Rideout M.C. Design and synthesis of fluorescent substrates for human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 15. P. 4657–4664.
- 131. Antony S. et al. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1 // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2007. Vol. 35, № 13. P. 4474–4484.
- Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017. Vol. 58, № 5. P. 235–263.
- 133. Hosoya N., Miyagawa K. Targeting DNA damage response in cancer therapy // Cancer Sci. Cancer Sci, 2014. Vol. 105, № 4. P. 370–388.
- 134. Francica P., Rottenberg S. Mechanisms of PARP inhibitor resistance in cancer and insights into the DNA damage response // Genome Med. Genome Med, 2018. Vol. 10, № 1. P. 101.
- 135. Minchom A., Aversa C., Lopez J. Dancing with the DNA damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies. // Ther. Adv. Med. Oncol. Ther Adv Med Oncol, 2018. Vol. 10. P. 1–18.
- 136. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. Nature, 1993. Vol. 362, № 6422. P. 709–715.
- 137. Iyama T., Wilson D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells // DNA Repair (Amst). 2013. Vol. 12, № 8. P. 620–636.
- 138. Caldecott K.W. DNA single-strand break repair and human genetic disease // Trends Cell Biol. Trends Cell Biol, 2022. Vol. 32, № 9. P. 733–745.
- 139. Suh D., Wilson D.M., Povirk L.F. 3'-Phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 1997. Vol. 25, № 12. P. 2495– 2500.
- 140. Takahashi T. et al. Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3 0-phosphate and 3 0-phosphoglycolate ends // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, № 11. P. 3797–3809.
- 141. Cistulli C. et al. AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate // DNA Repair (Amst). DNA Repair (Amst), 2004. Vol. 3, № 6. P. 581–591.
- 142. Demple B., Sung J.S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair // DNA Repair (Amst). DNA Repair (Amst), 2005. Vol. 4, № 12. P. 1442–1449.
- 143. Reynolds J.J. et al. Impact of PNKP mutations associated with microcephaly, seizures and developmental delay on enzyme activity and DNA strand break repair // Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res, 2012. Vol. 40, № 14. P. 6608– 6619.

- 144. Reynolds J.J. et al. Defective DNA ligation during short-patch single-strand break repair in ataxia oculomotor apraxia 1 // Mol. Cell. Biol. Mol Cell Biol, 2009. Vol. 29, № 5. P. 1354–1362.
- 145. Lehman I.R. DNA ligase: structure, mechanism, and function // Science. Science, 1974. Vol. 186, № 4166. P. 790–797.
- 146. Pegg A.E. Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents // Cancer Invest. Cancer Invest, 1984. Vol. 2, № 3. P. 223–231.
- 147. Hermisson M. et al. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells // J. Neurochem. J Neurochem, 2006. Vol. 96, № 3. P. 766–776.
- 148. Zhang J., F.G. Stevens M., D. Bradshaw T. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance // Curr. Mol. Pharmacol. Curr Mol Pharmacol, 2012. Vol. 5, № 1. P. 102–114.
- 149. Nanegrungsunk D. et al. Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas // Neurol. Res. Neurol Res, 2015. Vol. 37, № 2. P. 167–183.
- Stupp R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // N. Engl. J. Med. N Engl J Med, 2005. Vol. 352, № 10. P. 987– 996.
- 151. Kang H. et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells to Overcome Chemoresistance: An Overview of Current Therapeutic Strategies // Biomedicines. Biomedicines, 2022. Vol. 10, № 6. P. 1308.
- 152. Kovaleva K. et al. Dehydroabietylamine Ureas and Thioureas as Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors That Enhance the Antitumor Effect of Temozolomide on Glioblastoma Cells // J. Nat. Prod. J Nat Prod, 2019. Vol. 82, № 9. P. 2443–2450.
- 153. El-Khamisy S.F., Hartsuiker E., Caldecott K.W. TDP1 facilitates repair of ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks // DNA Repair (Amst). DNA Repair (Amst), 2007. Vol. 6, № 10. P. 1485–1495.
- Sedgwick B. et al. Repair of alkylated DNA: Recent advances // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2007. Vol. 6, № 4. P. 429–442.
- 155. Kavli B. et al. Uracil in DNA-General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2007. Vol. 6, № 4. P. 505–516.
- 156. Sung J.S., Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA // FEBS Journal. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 273, № 8. P. 1620–1629.
- 157. David S.S., O'Shea V.L., Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage // Nature. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 447, № 7147. P. 941– 950.
- 158. Mjelle R. et al. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2015. Vol. 30. P. 53–67.
- 159. Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond // Chromosoma. Springer, 2012. Vol. 121, № 1. P. 1–20.

- 160. Kim Y.-J., M. Wilson III D. Overview of Base Excision Repair Biochemistry // Curr. Mol. Pharmacol. Bentham Science Publishers Ltd., 2012. Vol. 5, № 1. P. 3–13.
- 161. Robertson A.B. et al. Base excision repair: The long and short of it // Cell. Mol. Life Sci. Springer, 2009. Vol. 66, № 6. P. 981–993.
- 162. Schärer O.D., Jiricny J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases // BioEssays. Bioessays, 2001. Vol. 23, № 3. P. 270–281.
- 163. Lebedeva N.A. et al. The mechanism of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 in the cleavage of AP site and its synthetic analogs // DNA Repair (Amst). Elsevier B.V., 2013. Vol. 12, № 12. P. 1037–1042.
- 164. Moor N.A. et al. Quantitative characterization of protein–protein complexes involved in base excision DNA repair // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2015. Vol. 43, № 12. P. 6009.
- 165. El-Khamisy S.F. et al. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 // Nature. Nature, 2005. Vol. 434, № 7029. P. 108–113.
- 166. Prasad R. et al. Pol β associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, № 22. P. 11571–11582.
- 167. Kuznetsov N.A. et al. Pre-steady state kinetics of DNA binding and abasic site hydrolysis by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // J. Biomol. Struct. Dyn. Taylor {\&} Francis, 2017. Vol. 35, № 11. P. 2314–2327.
- 168. Mitra S. et al. Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells.
  // Mol. Cells. The Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 1997.
  Vol. 7, № 3. P. 305–312.
- 169. Doetsch P.W., Cunningham R.P. The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases // Mutat. Res. Mutat Res, 1990. Vol. 236, № 2–3. P. 173–201.
- 170. Hoeijmakers J.H.J. DNA damage, aging, and cancer // N. Engl. J. Med. N Engl J Med, 2009. Vol. 361, № 15. P. 1475–1485.
- 171. Scully R. et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. Vol. 20, № 11. P. 698–714.
- 172. Bohgaki T., Bohgaki M., Hakem R. DNA double-strand break signaling and human disorders // Genome Integr. Genome Integr, 2010. Vol. 1, № 1. P. 15.
- 173. Lieber M.R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway // Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews, 2010. Vol. 79, № 1. P. 181–211.
- 174. Stinson B.M., Loparo J.J. Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway // Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews, 2021. Vol. 90, № 1. P. 137–164.
- 175. Chiruvella K.K., Liang Z., Wilson T.E. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. Vol. 5, № 5. P. a012757–a012757.
- 176. Heo J. et al. TDP1 promotes assembly of non-homologous end joining protein complexes on DNA // DNA Repair (Amst). NIH Public Access, 2015. Vol. 30,

№ 123. P. 28.

- 177. Li J. et al. TDP1 is required for efficient non-homologous end joining in human cells // DNA Repair (Amst). Elsevier, 2017. Vol. 60. P. 40–49.
- 178. Duffy S. et al. Overexpression screens identify conserved dosage chromosome instability genes in yeast and human cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. Vol. 113, № 36. P. 9967–9976.
- 179. Liu C. et al. Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer // Lung Cancer. Lung Cancer, 2007. Vol. 55, № 3. P. 303–311.
- 180. Yu J. et al. Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer // Clin. Cancer Res. Clin Cancer Res, 2005. Vol. 11, № 5. P. 2053– 2062.
- 181. Dean R.A. et al. Identification of a putative Tdp1 inhibitor (CD00509) by in vitro and cell-based assays // J. Biomol. Screen. J Biomol Screen, 2014. Vol. 19, № 10. P. 1372–1382.
- 182. Fam H.K. et al. TDP1 and PARP1 deficiency are cytotoxic to rhabdomyosarcoma cells // Mol. Cancer Res. Mol Cancer Res, 2013. Vol. 11, № 10. P. 1179–1192.
- 183. Barthelmes H.U. et al. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II // J. Biol. Chem. J Biol Chem, 2004. Vol. 279, № 53. P. 55618–55625.
- 184. Das B.B. et al. Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK // EMBO J. European Molecular Biology Organization, 2009. Vol. 28, № 23. P. 3667–3680.
- 185. Hirano R. et al. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? // EMBO J. John Wiley {\&} Sons, Ltd, 2007. Vol. 26, № 22. P. 4732–4743.
- 186. Katyal S. et al. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo // EMBO J. EMBO J, 2007. Vol. 26, № 22. P. 4720–4731.
- 187. Huang Y., Qureshi I.A., Chen H. Effects of phosphatidylinositol 4,5bisphosphate and neomycin on phospholipase D: kinetic studies // Mol. Cell. Biochem. Mol Cell Biochem, 1999. Vol. 197, № 1–2. P. 195–201.
- 188. Schroeder R., Waldsich C., Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics // EMBO J. EMBO J, 2000. Vol. 19, № 1. P. 1–9.
- 189. Keil A. et al. The topoisomerase i inhibitor irinotecan and the tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor furamidine synergistically suppress murine lupus nephritis // Arthritis Rheumatol. John Wiley and Sons Inc., 2015. Vol. 67, № 7. P. 1858–1867.
- 190. Dexheimer T.S. et al. 4-Pregnen-21-ol-3,20-dione-21-(4bromobenzenesufonate) (NSC 88915) and related novel steroid derivatives as tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors // J. Med. Chem. NIH Public Access, 2009. Vol. 52, № 22. P. 7122–7131.
- 191. Marchand C. et al. Identification of phosphotyrosine mimetic inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I by a novel AlphaScreen high-

throughput assay // Mol. Cancer Ther. NIH Public Access, 2009. Vol. 8, № 1. P. 240–248.

- 192. Kohlhagen G. et al. Protein-linked DNA strand breaks induced by NSC 314622, a novel noncamptothecin topoisomerase I poison // Mol. Pharmacol. Mol Pharmacol, 1998. Vol. 54, № 1. P. 50–58.
- 193. Beck D.E. et al. Synthesis and biological evaluation of new fluorinated and chlorinated indenoisoquinoline topoisomerase I poisons // Bioorg. Med. Chem. Bioorg Med Chem, 2016. Vol. 24, № 7. P. 1469–1479.
- 194. Elsayed M.S.A. et al. Design and Synthesis of Chlorinated and Fluorinated 7-Azaindenoisoquinolines as Potent Cytotoxic Anticancer Agents That Inhibit Topoisomerase i // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2017. Vol. 60, № 13. P. 5364–5376.
- 195. Makarieva T.N. et al. Varacin and three new marine antimicrobial polysulfides from the far-eastern ascidian polycitor sp // J. Nat. Prod. American Chemical Society, 1995. Vol. 58, № 2. P. 254–258.
- 196. Sato R., Ohyama T., Ogawa S. Efficient synthesis and biological properties of new benzopentathiepins // Heterocycles. 1995. Vol. 41, № 5. P. 893–896.
- 197. Lee A.H.F., Chan A.S.C., Li T. Acid-accelerated DNA-cleaving activities of antitumor antibiotic varacin // Chem. Commun. Chem Commun (Camb), 2002. Vol. 18, № 18. P. 2112–2113.
- 198. Wanka L., Iqbal K., Schreiner P.R. The lipophilic bullet hits the targets: Medicinal chemistry of adamantane derivatives // Chemical Reviews. Chem Rev, 2013. Vol. 113, № 5. P. 3516–3604.
- 199. Kuznetsov A.I., Zefirov N.S. Azaadamantanes with nitrogen atoms in the bridgehead positions // Russ. Chem. Rev. Turpion-Moscow Limited, 1989. Vol. 58, № 11. P. 1033–1047.
- 200. Arutyunyan G.L. et al. Synthesis and antitumor properties of some spirocyclic 1,3-diazaadamantanes // Pharm. Chem. J. 1997 3012. Springer, 1996. Vol. 30, № 12. P. 739–741.
- 201. Russell D.W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis // Annu. Rev. Biochem. Annu Rev Biochem, 2003. Vol. 72. P. 137–174.
- 202. Sharma R., Long A., Gilmer J.F. Advances in bile acid medicinal chemistry // Curr. Med. Chem. Curr Med Chem, 2011. Vol. 18, № 26. P. 4029–4052.
- 203. Arlia-Ciommo A. et al. Mechanisms underlying the anti-aging and anti-tumor effects of lithocholic bile acid // Int. J. Mol. Sci. Int J Mol Sci, 2014. Vol. 15, № 9. P. 16522–16543.
- 204. Кузнецова Галина Александровна. Природные кумарины и фурокумарины. Ленинград, 1967. Vol. 247.
- 205. Batran R.Z. et al. Design, synthesis and molecular modeling of new 4phenylcoumarin derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting MCF-7 breast cancer cells // Bioorg. Med. Chem. Bioorg Med Chem, 2018. Vol. 26, № 12. P. 3474–3490.
- 206. Efimtseva E. V., Mikhajlov S.N. Disaccharide nucleosides // Usp. Khim. IOP Publishing, 2004. Vol. 73, № 4. P. 435–448.
- 207. Efimtseva E. V., Kulikova I. V., Mikhailov S.N. Disaccharide nucleosides as

an important group of natural compounds // Mol. Biol. 2009 432. Springer, 2009. Vol. 43, № 2. P. 301–312.

- 208. King A.E. et al. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets // Trends in Pharmacological Sciences. Trends Pharmacol Sci, 2006. Vol. 27, № 8. P. 416–425.
- 209. Зандерманн Вильгельм. Природные смолы, скипидары, талловое масло (химия и технология). Лесная пром-сть / еd. Перевод с нем. Б. Д. Богомолова и Л. А. Селезневой; Под ред. Б. Д. Богомолова. Ленинград, 1964. Vol. 576.
- 210. Kovaleva K.S. et al. Synthesis of new heterocyclic dehydroabietylamine derivatives and their biological activity // Chem. Heterocycl. Compd. 2017 533. Springer, 2017. Vol. 53, № 3. P. 364–370.
- 211. González M.A. et al. Antimalarial activity of abietane ferruginol analogues possessing a phthalimide group // Bioorg. Med. Chem. Lett. Pergamon, 2014. Vol. 24, № 22. P. 5234–5237.
- Sadashiva M.P. et al. A non-cytotoxic N-dehydroabietylamine derivative with potent antimalarial activity. // Exp. Parasitol. Exp Parasitol, 2015. Vol. 155. P. 68–73.
- 213. Gowda R. et al. Targeting multiple key signaling pathways in melanoma using leelamine // Mol. Cancer Ther. Mol Cancer Ther, 2014. Vol. 13, № 7. P. 1679– 1689.
- 214. Mech D., Kurowska A., Trotsko N. The Bioactivity of Thiazolidin-4-Ones: A Short Review of the Most Recent Studies // Int. J. Mol. Sci. Int J Mol Sci, 2021. Vol. 22, № 21. P. 11533.
- 215. Li-Zhulanov N.S. et al. A novel class of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors that contains the octahydro-2H-chromen-4-ol scaffold // Molecules. MDPI AG, 2018. Vol. 23, № 10. P. 1–14.
- 216. Luzina O. et al. Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors // J. Nat. Prod. American Chemical Society, 2020. Vol. 83, № 8. P. 2320–2329.
- 217. Pang B. et al. Application of Berberine on Treating Type 2 Diabetes Mellitus // Int. J. Endocrinol. Int J Endocrinol, 2015. Vol. 2015. P. 1–12.
- 218. Yu H.H. et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus // J. Med. Food. J Med Food, 2005. Vol. 8, № 4. P. 454–461.
- Tan W. et al. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system // Int. J. Nanomedicine. Int J Nanomedicine, 2011. Vol. 6. P. 1773–1777.
- 220. Nechepurenko I. V. et al. Synthesis, hypolipidemic and antifungal activity of tetrahydroberberrubine sulfonates // Russ. Chem. Bull. 2019 685. Springer, 2019. Vol. 68, № 5. P. 1052–1060.
- 221. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 // Journal of Natural Products. American Chemical Society, 2020. Vol. 83, № 3. P. 770–803.
- 222. SCOPES ROBERT. PROTEIN PURIFICATION Principles and Practice.

SPRINGER — VERLAG NEW YORK HEIDELBERG BERLIN, 1982. Vol. 358.

- 223. Il'ina I. et al. Synthesis and analgesic activity of monoterpenoid-derived alkylsubstituted chiral hexahydro-2H-chromenes // Med. Chem. Res. 2017 267. Springer, 2017. Vol. 26, № 7. P. 1415–1426.
- 224. Nazimova E. et al. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegolderived (2R,4aR,7R,8aR)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2Hchromen-4-ol // Med. Chem. Res. 2016 257. Springer, 2016. Vol. 25, № 7. P. 1369–1383.
- 225. Chepanova A.A. et al. Effective Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Based on Monoterpenoids as Potential Agents for Antitumor Therapy // Russ. J. Bioorganic Chem. Pleiades Publishing, 2019. Vol. 45, № 6. P. 647– 655.
- 226. Galanty A., Paśko P., Podolak I. Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives // Phytochem. Rev. 2019 182. Springer, 2019. Vol. 18, № 2. P. 527–548.
- 227. Abo-Khatwa A.N., Al-Robai A.A., Al-Jawhari D.A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria // Nat. Toxins. Nat Toxins, 1996. Vol. 4, № 2. P. 96–102.
- 228. Zakharova O. et al. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors // Bioorganic Med. Chem. Elsevier, 2018. Vol. 26, № 15. P. 4470–4480.
- 229. Nikolin V.P. et al. The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors in vivo // Clin. Exp. Metastasis. Clin Exp Metastasis, 2021. Vol. 38, № 5. P. 431–440.
- 230. Zakharenko A.L. et al. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models // Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson SAS, 2019. Vol. 161. P. 581–593.
- 231. Filimonov A.S. et al. New hydrazinothiazole derivatives of usnic acid as potent TDP1 inhibitors // Molecules. MDPI AG, 2019. Vol. 24, № 20. P. 1–34.
- 232. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // Journal of Natural Products. 2016. Vol. 79, № 3. P. 629–661.
- 233. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem Biophys Res Commun, 1984. Vol. 123, № 1. P. 291–298.
- 234. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair // Mol. Biotechnol. 2004 263. Springer, 2004. Vol. 26, № 3. P. 249–261.
- 235. Acar A. In vivo toxicological assessment of diquat dibromide: cytotoxic, genotoxic, and biochemical approach // Environ. Sci. Pollut. Res. Environ Sci Pollut Res Int, 2021. Vol. 28, № 34. P. 47550–47561.
- 236. Sanz-Serrano J. et al. In vitro genotoxicity assessment of functional ingredients: DHA, rutin and α-tocopherol // Food Chem. Toxicol. Pergamon, 2021. Vol. 153. P. 112237.
- 237. Singh N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA

damage in individual cells // Exp. Cell Res. Exp Cell Res, 1988. Vol. 175, № 1. P. 184–191.

- 238. Speit G., Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair // Methods Mol. Biol. Methods Mol Biol, 2006. Vol. 314. P. 275–286.
- 239. Tice R.R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing // Environmental and Molecular Mutagenesis. 2000. Vol. 35, № 3. P. 206–221.
- 240. Tavassoli M. et al. Apoptin: Specific killer of tumor cells? // Apoptosis 2005 104. Springer, 2005. Vol. 10, № 4. P. 717–724.
- 241. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // Toxicologic Pathology. Toxicol Pathol, 2007. Vol. 35, № 4. P. 495–516.
- 242. Zhu H. et al. A Simple Bioluminescence Imaging Method for Studying Cancer Cell Growth and Metastasis after Subcutaneous Injection of Lewis Lung Carcinoma Cells in Syngeneic C57BL/6 Mice. // React. Oxyg. species (Apex, N.C.). React Oxyg Species (Apex), 2018. Vol. 5, № 14. P. 118–125.
- 243. Shtro A.A. et al. Derivatives of usnic acid inhibit broad range of influenza viruses and protect mice from lethal influenza infection // Antivir. Chem. Chemother. Antivir Chem Chemother, 2015. Vol. 24, № 3–4. P. 92–98.
- 244. Turner P. V et al. Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. American Association for Laboratory Animal Science, 2011. Vol. 50, № 5. P. 600–613.

Российская Академия наук Сибирское отделение Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Приложение к работе

# Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в качестве сенсибилизаторов действия ингибитора топоизомеразы 1

Чепанова Арина Александровна

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна к.х.н. Захаренко Александра Леонидовна

Новосибирск 2022

# оглавление

Таблица 1.1 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций производных хромена и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.
Таблица 1.3 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций цианопроизводных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. 
Таблица 1.4 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций арилиденфураноновых производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток
Таблица 1.5 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций тиазольных и аминотиазольных производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.
Таблица 1.6 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций арилиденгидразонотиазольных производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток.
Таблица 1.7 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций гетарилиденгидразонотиазольных производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток170
Таблица 1.8 Значения полуингибирующих и полуцитотоксических концентраций терпеногидразонотиазольных производных УК и их влияние на цитотоксический эффект топотекана в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток
Таблица 2. Влияние топотекана, <b>20d</b> и их комбинации на рост опухоли LLC, количество метастазов и морфофизиологические показатели самцов мышей C57BL/6186

# ТАБЛИЦА 1.1 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМЕНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC50, мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия	Структура			
Производные хромена							
4 <i>S</i> -(If)	2.01 ± 0.10	A549 >50	Нет синергии	HN H H OH			
4 <i>S</i> -(Ie)	2.00 ± 0.28	A549 >50	Нет синергии	HN H H OH			
4 <i>R</i> -(If)	2.19 ±0.26	A549 20,6	Нет синергии	HN H H OH			
4 <i>R</i> -(Ie)	$2.43 \pm 0.04$	A549 >50	Нет синергии	HN H H OH			
4 <i>R</i> -10	2.9 ±0.8		Нет синергии	H, O, S, NH			
4S-10	$5.8 \pm 3.0$		Нет синергии	H, O, S, NH O, S, NH			

4 <i>R</i> -11	4.0 ± 0.4	T98G >50	Нет синергии	H OH H
4 <i>S</i> -11	1.4 ± 0.3	T98G >50	Нет синергии	H, O, S, NH
4 <i>R</i> -13	2.8± 0.6	T98G >50	Нет синергии	Ad H OH
4 <i>S</i> -13	1.24 ±0.02	T98G >50	Нет синергии	Ad O H O O NH O NH
4 <i>S</i> -12	5.05± 1.5	T98G >50	Нет синергии	H, O, S, NH H, O, S, NH
4 <i>R</i> -12	3.3±0.2	T98G >50	Нет синергии	H, O, S, NH O, S, NH

# ТАБЛИЦА 1.2 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОИЗВОДНЫХ АДАМАНТАНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC <sub>50</sub> , мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия топотекана, раз	Структура
		Π	роизводные адамант	гана
44a	>75	A549 >80	Нет синергии	O H
44b	>75	A549 >80	Нет синергии	O N Y
45a	5,2±0,2	A549 >80	Нет синергии	
45b	2,5±0,1	A549 >80	Нет синергии	O N
46a	3,3±0,5	A549 >80	5	s H
47a	0,64±0,17	A549 >80	Нет синергии	S H N
50a	>75	A549 >80	Нет синергии	L O N H
50b	13,4±3	A549 >80	Нет синергии	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

51	2,3±0,8	A549 >80	Нет синергии	Jacobia S N A A A A A A A A A A A A A A A A A A
----	---------	-------------	--------------	---

# ТАБЛИЦА 1.3 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЦИАНОПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC <sub>50</sub> , мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Структура				
Цианопроизводные УК							
УК	>50	MCF7 50	он о но о				
MR-137-1	15.6±2.1	MCF7 >80					
OL7-43	2.86±0.79	MCF7 >80					
18 OL8-44	1.6±0.6	MCF7 >80	OH O OH O OH OH OH OH OH OH OH OH				
OL9-9	10.0±5.0	MCF7 >80					

OL8-114	1.16±0.35	MCF7 >50	
OL8-95	1.01±0.12	MCF7 >80	
MR-150-3	11.2±4.5	MCF7 >80	ОН О ОН

### ТАБЛИЦА 1.4 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АРИЛИДЕНФУРАНОНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC <sub>50</sub> , мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия топотекана,раз	Структуры
		Арилиде	нфураноновые произ	водные УК
ба	0.72±0.08	-	-	
6b	0.98±0.26	-	-	

6с	1.22±0.15	_	-	
6d	0.15±0.03	A549 10,0±0,4 HEK- 293 4,6±0,5	A549 0,68 HEK-293 2,4	Br O OH
бе	0.23±0.06	A549 4,56±0,0 8 HEK- 293 15,9±1,5	A549 2,3 HEK-293 1,14	
6f	0.232±0.00 4	A549 11,4±2,3 HEK- 293 14,5±0,7	A549 0,84 HEK-293 2,4	OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH O
бд	0.53±0.28	_	_	Br Br

	1	r		
6h	0.39±0.13	-	-	
6i	0.34±0.04	A549 3±3,6 HEK- 293 15,8±0,6	A549 1,2 HEK-293 1,09	
6j	1.02±0.18	-	-	
6k	0.34±0.06	A549 4,6±0,4 HEK- 293 20±2	A549 2,31 HEK-293 4,8	
61	1.59±0.07	-	_	

бm	0.025±0.00 2	A549 6,8±2,4 HEK- 293 14,5±0,7	A549 0,19 HEK-293 1,5	
бп	0.86±0.39	_	_	
бо	0.45±0.07	-	-	
бр	0.81±0.28	-	-	
бq	3.65±1.38	-	-	
бг	5.50±1.35	_	_	

6s	0.16±0.04	A549 >50 HEK- 293 >50	A549 2,77 HEK-293 1,09	
6t	6.73±1.42	-	_	
би	0.90±0.17	-	-	
бv	0.84±0.04	_	_	
бw	0.63±0.29	-	_	
6x	0.063±0.00 2	A549 8,7±1,0 HEK- 293 15,7±0,5	A549 2,36 HEK-293 1,84	OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH O

бу	0.60±0.14	-	_	Br S
6z	3.30±1.05	-	-	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O
6zz	>15	-	_	
7m	0.064±0.02 1	-	-	
7x	0.081±0.01 1	-	-	Br S

# ТАБЛИЦА 1.5 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТИАЗОЛЬНЫХ И АМИНОТИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC50, мкМ	Структура
	Тиазольные и амин	ютиазольные производных УК
18a	4.1±1.2	
18b	1.12±0.45	
18c	1.21±0.35	
19a	3.8±1.9	



# ТАБЛИЦА 1.6 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АРИЛИДЕНГИДРАЗОНОТИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC50, мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия топотекана,раз	Структура
	$\mathbf{A}_{\mathbf{I}}$	рилиденги,	дразонотиазольны	е производные УК
20a	0.172±0.00 7	_	_	HO HO N S HN-N

20b	0.150±0.03 5	_	-	
20c	0.068±0.00 4	_	_	
20d	0.026±0.01 1	HCT116 7,8±3,6 A549 3,9±0,14 MCF7 9,3±2,2	HCT116 7,9 A549 7,3 MCF7 7,9	
20e	0.457±0.17 8	-	-	
20f	0.158±0.04 5	-	-	



# ТАБЛИЦА 1.7 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГЕТАРИЛИДЕНГИДРАЗОНОТИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC <sub>50</sub> , мкМ	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия топотекана,раз	Структура	
Гетарилиденгидразонотиазольные производные УК					
(+)УК	IC <sub>50</sub> /nM				

16a	160 ± 16	A549 5±1,1	-	HO HO N HN-N HBr N HBr
16b	492 ± 88	A549 11,2±5	-	OH HO HO N HBr HBr
16c	353 ± 17	-	-	HO HO HO HN-N HBr
16d	$70\pm4$	HeLa 18,9±4,2 A549 4±0,8	2,24	
16e	91 ± 7	A549 13,8±3,6	_	

16f	88 ± 3	HeLa >50	-	HO HO HN-N S HN-N S Br
16g	52 ± 18	A549 19±7,4	-	
16h	70 ± 18	A549 12,3±5,5	_	HO HO HN-N S HN-N Br
16i	72 ± 3	A549 16,8±6,7	-	
16j	107 ± 31	A549 10,5±2	-	

16k	120 ± 15	A549 16,2±6,5	-	
161	$77\pm 6$	A549 4,7±2,9	-	
16m	188 ± 3	A549 16±6,4	-	
16n	151 ± 14	A549 18,7±0,9	_	
160	1690 ± 890	A549 >50	-	

16p	138 ± 3	A549 27,8±3,3	-	
16q	21 ± 6	A549 >50	_	
16r	55 ± 8	-	-	
17a	$26\pm8$	HCT116 14,2±2 A549 18,5±0,7 MCF7 26±4,2 HeLa >50	HeLa 2,75	
17b	26 ± 4	HCT116 16,9±7,4 A549 58±0,03 MCF7 >50 HeLa >50	HeLa 2,66	

17c	41 ± 7	A549 15,06±1, 4	-	
17d	77 ± 3	A549 19,1±5,2	-	
17e	64 ± 6	A549 15,3±5,1	-	
17f	60 ± 1	A549 >50	-	
17g	122 ± 25	A549 >50	-	

17h	74 ± 1	A549 >50	_	
17i	$80\pm7$	A549 >50	_	
17j	69 ± 14	A549 >50	-	
17k	54 ± 8	A549 >50	-	HO + O + O + O + O + O + O + O + O + O +
(-)УК	IC <sub>50</sub> , nM	СС <sub>50</sub> , мкМ	Усиление действия топотекана,раз	Структура

16a	139 ± 38	_	_	HO HO N HN-N HBr N HBr
16b	$1480\pm265$	A549 13,7±2,7	-	OH OH HO S HN N N HBr HBr
16c	154 ± 18	A549 13,7±9,3	-	OH HO HO N HBr HBr
16d	142 ± 4	HeLa 19±0,7 A549 >50	HeLa 2,75	HO OH O OH HO OH S N HN-N S NO <sub>2</sub>
16e	54 ± 25	A549 12,3±2,5	-	HO OH O OH HO OH S N HN-N S

16f	43 ± 1	HeLa >50 A549 >50	-	HO OH O OH HO OH S N HN-N S Br
16g	169 ± 6	A549 16,7±2,8	-	OH O OH HO N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
16h	$56\pm4$	A549 4,1±2,3	-	
16i	121 ± 25	A549 17,4±7	-	
16j	40 ± 3	A549 11±3,4	-	

16k	46 ± 24	A549 15±6,1	-	
161	178 ± 4	A549 18,3±7,2	_	
16m	18 ± 1	A549 15,8±0,2	-	
16n	$29 \pm 9$	A549 20,6±4,2	-	
160	570 ± 109	A549 >50	-	

16p	57 ± 1	A549 >50	-	
16q	81 ± 20	A549 >50	-	
16r	53 ± 3	A549 15,6±3,4	-	
17a	54 ± 3	HeLa >50	2,39	
17b	78 ± 3	HeLa >50 A549 >50	2,96	
17c	37 ± 10	A549 16,4±2,2	-	
-----	---------	------------------	---	--
17d	18 ± 1	A549 5±0,6	-	
17e	30 ± 11	A549 14,3±2,8	-	
17f	21 ± 5	A549 19,7±6	-	
17g	94 ± 20	A549 >50	-	

17h	48 ± 2	A549 >50	-	
17i	59 ± 5	A549 >50	_	
17j	71 ± 15	A549 >50	-	
17k	46 ± 5	A549 >50	-	HO + O + O + O + O + O + O + O + O + O +

## ТАБЛИЦА 1.8 ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ПОЛУЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЕРПЕНОГИДРАЗОНОТИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОПОТЕКАНА В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.

Шифр	IC <sub>50</sub> nM	CC50	Усиление	Структуры			
Т		мкм действия Трс,раз					
	Терпеногидразонотиазольные производные УК						
9a	10.3±0.4	HeLa 33±9 A-549 35±11 T98G 14±2 HCT 16,5±6	HeLa 3,4	OH O OH O OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH			
9Ъ	16.4±0.1	HeLa 77±17 A-549 >100 T98G 17±3	HeLa 9,7				

9c	139±1	HCT >50	-	
9d	88±16	HCT 17,4±2,2	-	
9e	27±2	HeLa 65±9 A-549 95±21 T98G 19±5 MCF7 19,3±0,9 HCT 17,5±5	HeLa 4,4 A-549 4 HCT 2	
9f	45±12	HeLa >100 A-549 >100 T98G >100 HCT 23±4	HeLa 2,2	

9g	46±2	HeLa 15±5 A-549 19±3 T98G 17±4 HCT 4,1±1,3	HeLa 1,7	
9h	31±11	HeLa 11±4 A-549 34±7 T98G 13±3 HCT 4,6±0,1	HeLa 2,2	

## ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ТОПОТЕКАНА, 20D И ИХ КОМБИНАЦИИ НА РОСТ ОПУХОЛИ LLC, КОЛИЧЕСТВО МЕТАСТАЗОВ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ САМЦОВ МЫШЕЙ С57BL/6.

	Группа 1,	Группа 2,	Группа 3,	Группа 4,
	контроль	Т <b>рс</b>	<b>Tpc + 20d</b>	<b>20d</b>
Начальная масса, г	$22,9{\pm}0.78$	$24,5\pm0.46$	24,3±0.32	21,1±0.91
Масса тела с опухолью до забоя, г	23,9	24,3	23,2	21,9
Масса тела без опухоли, г	20,6	21,4	21,8	18,6
Масса тела без опухоли, % от начальной массы	90.0	88.1	89.7	88.2
Вес опухоли, г	3.3±0.28	2.9±0.28	1.4±0.22***	3.3±0.20
Индекс печени, %	5.8±0.38	5.8±0.11	6.5±0.15	6.0±0.32
Вес селезенки, мг	252±12	260±25	326±22	281±17
Среднее количество метастазов в легких	16.4±2.22	7.6±1.80	0.9±0.61	21.4±2.84

\*\*\*Звездочками отмечены значения, достоверно (p<0,001) отличающиеся от

соответствующих значений во всех остальных группах.