

На правах рукописи

КИСЕЛЕВА МАРИНА ПЕТРОВНА

**НОВЫЕ N-ГЛИКОЗИДЫ ИНДОЛО[2,3-a]ПИРРОЛО[3,4-c]КАРБАЗОЛОВ:
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Смирнова Зоя Сергеевна

доктор медицинских наук

Покровский Вадим Сергеевич

Официальные оппоненты:

Островская Лариса Анатольевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории количественной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук.

Урлова Антонина Николаевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник подразделения «Центр лазерной и фотодинамической диагностики и терапии опухолей» Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Защита состоится «12» сентября 2019 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2019 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В Российской Федерации ежегодно злокачественными новообразованиями заболевают 500 тысяч человек. Несмотря на важные изменения в результатах лечения многих опухолевых заболеваний, эффективность существующих методов лечения остается невысокой. Основными недостатками большинства препаратов, используемых в химиотерапии злокачественных заболеваний, являются ограниченная избирательность действия и развитие устойчивости к ним опухолевых клеток. В связи с этим актуально создание новых противоопухолевых химиопрепаратов, действующих на конкретные биологические мишени опухолевых клеток. Идентификация молекулярных мишеней и изучение их взаимодействия с исследуемыми препаратами является важным этапом исследования перспективных противоопухолевых средств.

В данной работе рассматривается противоопухолевый эффект и механизм действия ЛХС-1208 — нового лекарственного средства на основе углеводсодержащего производного индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазола.

N-гликозиды замещенных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов представляют большое семейство природных и синтетических соединений, обладающих противоопухолевой, антибактериальной и иммуномодулирующей активностью. К настоящему времени синтетические аналоги и низкомолекулярные производные индолокарбазолов вызывают большой интерес в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. В клинических исследованиях за рубежом проходят испытания мидостаурин [Stone, R.M. et al., 2005], энзастаурин [Oh, Y. et al., 2008; Rampling, R. et al., 2012; Odia, Y. et al., 2016], лестауртиниб [Minturn, J.E. et al., 2011], бекатекарин [Schwandt, A. et al., 2012], эдотекарин [Saif, M.W. et al., 2010]. Результаты клинических исследований продемонстрировали широкий спектр потенциальных показаний к их применению, а также хорошую сочетаемость с известными препаратами. В то же время эффективность производных индолокарбазолов была сопоставимой с существующими лекарственными препаратами, при наличии выраженной токсичности, прежде всего, гематологической. Поэтому установление механизмов гибели опухолевых клеток при действии индолокарбазолов необходимо для поиска производных этого ряда соединений, обладающих оптимальной противоопухолевой активностью при минимальной токсичности.

Цель исследования

Скрининг новых противоопухолевых соединений в ряду производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов на моделях перевиваемых опухолей животных для отбора наиболее эффективного соединения и доклиническая оценка его противоопухолевой активности.

Задачи исследования

♦ изучить противоопухолевую активность 10 новых соединений из класса N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов в сравнительных экспериментах на опухолевых моделях мышей: лимфолейкозе P388, эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC) и меланоме B16. Оценить противоопухолевое действие соединений и отобрать из них наиболее эффективное (лидерное соединение);

♦ изучить механизмы противоопухолевого действия лидерного соединения;

♦ исследовать чувствительность лидерного соединения на расширенной панели перевиваемых опухолей мышей: аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ, рака шейки матки РШМ5 и лимфолейкоза L1210;

♦ исследовать противоопухолевую активность прототипов лекарственной формы (ЛФ) лидерного соединения для определения оптимального пути введения;

♦ провести углубленное изучение эффективности разработанной ЛФ лидерного соединения для выбора оптимальной схемы применения на моделях опухолей разного гистогенеза: гемобластозах P388, L1210, лимфаденозе Фишера L5178Y и на солидных опухолевых моделях LLC, РШМ5, меланоме B16 мышей;

♦ исследовать эффективность лекарственной формы (ЛФ) лидерного соединения на подкожных (п/к) ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 *in vivo*.

Методы и методология исследования

Высокоактивные синтезированные соединения отбирались методом скрининга в экспериментах на культивируемых клетках *in vitro* и на моделях перевиваемых опухолей мышей *in vivo*. Работа проведена в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Избранная методология соответствует общепринятой схеме поиска и доклинического изучения противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, которые рассматриваются как потенциальные агенты для создания лекарственных препаратов. Для оценки противоопухолевой активности производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов и механизма их действия использованы методы экспериментальной химиотерапии и биохимические методы соответственно. Подробное описание методов и моделей приводится в соответствующих разделах работы. Обработка результатов доклинических исследований проведена современными статистическими методами.

Научная новизна

В данной работе впервые проведен поиск потенциальных противоопухолевых агентов в ряду новых производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, полученных

«индолин-индольным» методом в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Впервые проведен анализ зависимости структуры углеводсодержащих производных и их противоопухолевой активности на моделях перевиваемых опухолей мышей P388, LLC и B16. Впервые установлено наличие достоверного противоопухолевого эффекта у соединения ЛХС-1208 на моделях перевиваемых опухолей мышей. Впервые изучен механизм действия соединения ЛХС-1208 и установлены мишени, определяющие его противоопухолевую эффективность: ингибирование активности топоизомеразы I и интеркаляция в двухцепочечную ДНК. Впервые проведено доклиническое изучение эффективности прототипов ЛФ соединения ЛХС-1208 на широком спектре опухолевых моделей. Результаты исследования позволили разработать оптимально устойчивую ЛФ нового отечественного производного индолокарбазола ЛХС-1208. На иммунодефицитных мышцах выполнена серия экспериментов с ЛХС-1208, направленных на выявление противоопухолевого действия препарата на модели рака толстой кишки человека SW620, в том числе, в сравнении с иринотеканом, ингибитором топоизомеразы I.

Теоретическая и практическая значимость

Проведение скрининга в ряду синтезированных производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов позволило отобрать среди них высокоэффективное соединение ЛХС-1208, разработать и исследовать его лекарственную форму с возможностью практического применения предлагаемого лекарственного препарата в клинике для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями. Способность индолокарбазолов к взаимодействию с несколькими внутриклеточными мишенями важно для индукции различных путей гибели опухолевых клеток и может приводить к повышению избирательности действия лекарственных препаратов, что позволит исключить или отсрочить возникновение устойчивости опухоли к проводимому лечению.

Личный вклад

Автор принимала непосредственное участие в планировании и выполнении экспериментальных исследований по оценке противоопухолевой активности производных N-гликозидов индолокарбазолов и прототипов ЛФ ЛХС-1208. Личный вклад автора в рамках представленной темы заключается в анализе, обобщении и изложении полученных результатов. В соавторстве проведено изучение механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208. Текст и выводы диссертации сформулированы и написаны автором.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология («биологические науки») и области исследования специальности п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования

цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. В ходе скрининга синтезированных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов обнаружены новые потенциальные противоопухолевые соединения, показавшие эффективность на перевиваемых опухолях мышей: P388, LLC и B16. Наиболее эффективное лидерное соединение ЛХС-1208 отобрано для дальнейшего изучения *in vivo*.

2. Проведена оценка чувствительности к лидерному соединению перевиваемых опухолей мышей L1210, АКАТОЛ и РШМ5. Показана высокая эффективность ЛХС-1208 на модели лимфолейкоза L1210 (УПЖ=47%, $p < 0,001$) при 5-кратном внутривенном введении в разовой дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг). При исследовании на опухолях солидного роста наиболее чувствительной к ЛХС-1208 оказалась модель АКАТОЛ с ТРО=97-62% ($p \leq 0,001$) в течение 16 дней после окончания лечения в суммарной дозе 375 мг/кг и УПЖ=36%. На РШМ5 эффективность ЛХС-1208 отмечена только на 7-е сутки после окончания лечения (ТРО=52%, $p=0,011$).

3. Индолокарбазол ЛХС-1208 по механизму действия проявляет свойства ингибитора топоизомеразы I и интеркалирует в двухцепочечную ДНК.

4. Исследована противоопухолевая активность девяти прототипов ЛФ ЛХС-1208 для перорального и парентерального применения.

5. При выборе оптимального пути введения в организм мышей с привитыми лимфолейкозом P388 и LLC показано, что внутривенное (в/в) применение ЛХС-1208 в виде лиофилизированной ЛФ оказалось эффективнее по сравнению с пероральным введением.

6. Установлена оптимальная схема применения разработанной инъекционной ЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1208 на опухолевых моделях мышей: гемобластозах и солидных опухолях.

7. Показана эффективность препарата ЛХС-1208 при в/в введении мышам Balb/c nude с п/к ксенографтами SW620 в сравнении с иринотеканом.

Внедрение результатов исследования

Экспериментально-практический материал, полученный в ходе изучения зависимости противоопухолевых свойств N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов от их структуры, позволит осуществить рациональный подход к разработке новых аналогов представленного класса как потенциальных противоопухолевых агентов.

При изучении связи «структура-активность» среди отобранных соединений ЛХС-1208 показал наиболее эффективный результат, что явилось основанием для создания оптимально устойчивой лекарственной формы для доклинического изучения и рекомендаций его на клинические испытания.

Внедрение новых потенциальных противоопухолевых препаратов из класса производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов в клиническую практику позволит расширить возможности химиотерапевтического лечения злокачественных новообразований и предотвратить развитие лекарственной устойчивости опухолевых клеток за счет индукторов, связанных с механизмом их действия.

Апробация

Материалы научных исследований по теме диссертации представлены на симпозиуме «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств», проводимом научным сообществом РАН, РАМН и РАСХН (9-11 июня 2008 г., Москва). По теме диссертации представлен доклад на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (17-18 марта 2016 г., Москва). Материалы работы доложены и обсуждены на заседании Ученого совета НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 10 апреля 2018 г. Апробация результатов диссертации проведена на межлабораторной конференции НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 19 июля 2018 г.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 14 научных работах, из них 7 статей в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Получено 2 патента на изобретения Российской Федерации.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, пяти глав с описанием результатов исследований, главы с обсуждением результатов, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 31 отечественных и 169 зарубежных источников. Текст диссертации проиллюстрирован 48 таблицами и 40 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на половозрелых мышах-гибридах BDF₁ (C₅₇Bl/6j x DBA/2) обоего пола, линейных мышах-самцах C₅₇Bl/6, самцах DBA/2, самках CBA Balb/c, самцах Balb/c nude массой тела 18-22 г, а также беспородных крысах-самках массой 150-180 г. Перед лечением животных распределяли по группам. Число животных в контрольных группах составляло 10-12, в опытных группах — по 6-8 животных.

Опухолевые модели: лимфолейкозы P388 и L1210, лимфаденоз Фишера L5178Y, эпидермоидная карцинома легкого Lewis (LLC), меланома B16, рак шейки матки PШМ-5, аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ мышей, полиморфноклеточная саркома M-1 (SM-1)

крыс. В опытах использованы 2–15-й пассажи *in vivo*. При трансплантации солидных опухолей инокуляцию опухолевых клеток проводили подкожно (п/к) в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1:10 (5×10^6 клеток). Лечение начинали через 24 ч после трансплантации гемобластозов и через 48 ч – солидных опухолей. Саркому М-1 перевивали п/к беспородным крысам-самкам по 0,3 мл взвеси измельченной опухоли, содержащей 2×10^6 опухолевых клеток при разведении взвеси в среде 199. Лечение начинали на 5-е сутки после трансплантации. В экспериментах на иммунодефицитных мышах использовали штамм перевиваемого рака ободочной кишки человека SW620, растущий в виде п/к ксенографтов. Каждой мыши под кожу бока трансплантировали по 0,2 мл 20% взвеси, т.е. по 40 мг опухолевой ткани. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации.

Препараты. 10 производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов с общей химической формулой (рисунок 1) и шифром ЛХС синтезированы в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (таблица 1).

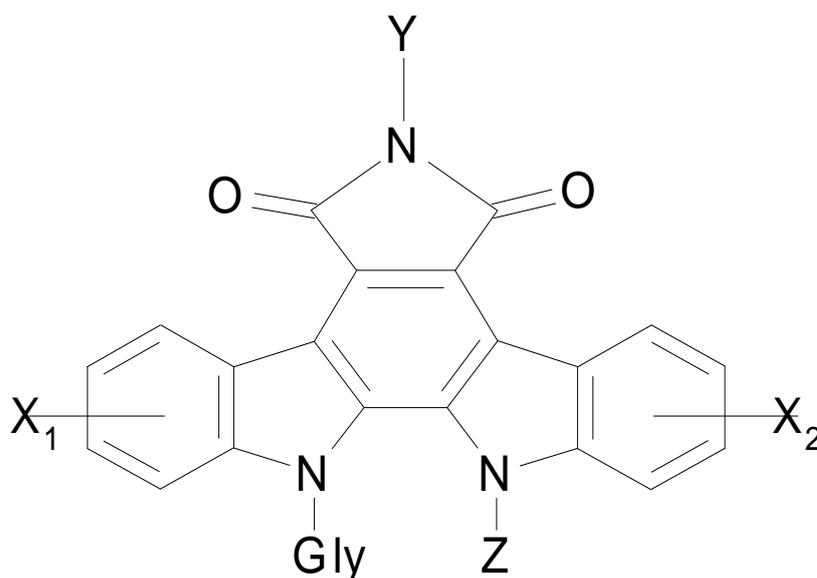


Рисунок 1 — Общая формула производных индолокарбазола.

Таблица 1 — Производные N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов.

Название соединения	X, Y, Z	Gly – углеводный остаток	Шифр соединения
6-амино-12-(α -L арабинопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y - NH ₂ , z-H	арабиноза	ЛХС-1208
6-[2-морфолиноэтил]-12-(α -L- арабинопиранозил)индоло[2,3-а] пирроло [3,4-с]карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y-CH ₂ CH ₂ N(CH ₂) ₄ O, z-H	арабиноза	ЛХС-1054
13-метил-12-(α -L-арабинопиранозил) 9-броминдоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	x ₁ -Br, x ₂ -H, y - H, z-CH ₃	арабиноза	ЛХС-1007
12-(α -L арабинопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y- H, z-H	арабиноза	ЛХС-1006
6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D- ксилопиранозил)индоло[2,3-а] пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ , z-H	ксилоза	ЛХС-1040
13-метил-12-(β -D-ксилопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y- H, z-CH ₃	ксилоза	ЛХС-976
12-(β -D -ксилопиранозил)индоло [2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7- дион	x ₁ = x ₂ -H, y- H, z-H	ксилоза	ЛХС-983
6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D- галактопиранозил)индоло[2,3-а] пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ , z-H	галактоза	ЛХС-1098
12-(β -D-галактопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	x ₁ = x ₂ -H, y- H, z-H	галактоза	ЛХС-999
12-(β -D-рибопиранозил)индоло [2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7- дион	x ₁ = x ₂ -H, y- H, z-H	рибоза	ЛХС-985

Прототипы ЛФ субстанции ЛХС-1208 с использованием солюбилизаторов Cremophor ELP, Kollisolв PEG-400/Lutrol E-400 и Kollidon 17PF (BASF The Chemical Company, Германия), созданные в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ЛХС-1208 в виде лиофилизированной ЛФ — аморфный порошок оранжевого цвета в пенициллиновом флаконе, содержащем 98,15% основного вещества. Растворитель для ЛХС-1208 — смесь диметилсульфоксида (ДМСО) и солюбилизатора Kollidon 17PF1. Для приготовления 0,3% инъекционного раствора к содержимому флакона добавлено 2,8 мл воды

для инъекций. В готовом инъекционном растворе ЛХС-1208 содержится 5,5% ДМСО и 20% Kollidon 17PF1.

В качестве препарата сравнения использован аптечный иринотекан (Кампто ЦС «ПфайзерПти Лтд.», Австрия), который вводили в/в мышам nude с п/к ксенографтами SW620 в оригинальном растворителе. Мыши контрольных групп во всех опытах получали соответствующие растворители в адекватном объеме. Дозу препаратов рассчитывали индивидуально на массу тела животного, соответственно корректировали объем инъекционных растворов.

Дозы и режимы применения. Испытание соединений ЛХС проводили по схеме, применяемой для первичного исследования потенциальных противоопухолевых препаратов, с использованием широкого диапазона доз от 5 до 175 мг/кг в соответствующих концентрациях от 0,5 мг/мл до 10 мг/мл при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 5 дней.

Оптимальный путь введения ЛХС-1208 изучали на опухолевых моделях мышей P388, LLC и S M-1 крыс. Разработанные для перорального применения прототипы ЛФ ЛХС-1208 вводили подопытным животным в желудок с помощью зонда ежедневно в течение 5 дней в дозах от 25 мг/кг до 100 мг/кг в концентрации ЛХС-1208, составляющей от 2 мг/мл до 4 мг/мл в полученном растворе. Прототипы ЛФ для парентерального применения исследовались на P-388 и LLC мышей в диапазоне доз от 10 мг/кг до 45 мг/кг в концентрациях 3 мг/мл и 5 мг/мл при ежедневном в/в введении в течение 5 дней.

Изучение спектра противоопухолевой активности инъекционной ЛФ ЛХС-1208 проводили на моделях гемобластозов и солидных опухолей мышей: P388, L1210, L5178Y, LLC, B16, PШМ5. Разные режимы применения ЛХС-1208 исследовались в разовых дозах от 10 мг/кг до 45 мг/кг (ежедневно 5-кратно), 50 и 60 мг/кг (двукратно через 96 ч) или однократно в суточных дозах 75 мг/кг и до 175 мг/кг при двукратном через 2 ч введении. Прототипы ЛФ ЛХС-1208 вводили на 1-е сутки после трансплантации лейкозов или на 2-е сутки после трансплантации солидных опухолей.

Изучение противоопухолевого эффекта препарата ЛХС-1208 на подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 проводили на иммунодефицитных мышях в оптимальной схеме применения при в/в введении в разовой дозе 75 мг/кг двукратным курсом с интервалом 96 ч (суммарно 150 мг/кг). Препарат сравнения иринотекан вводили однократно внутривенно струйно в дозе 66 мг/кг. Оценку эффективности препарата ЛХС-1208 под контролем переносимости проводили в однократных дозах 75 и 100 мг/кг и в суммарной суточной дозе 100 мг/кг в режиме двукратного через 2 ч в/в введения разовой дозы 50 мг/кг.

Оценка противоопухолевого эффекта. Эффективность лечения мышей с солидными опухолями (LLC, B16, PШМ5) оценивали по стандартным критериям: торможению роста

опухоли (ТРО%), увеличению продолжительности жизни (УПЖ%). Оценку специфической противоопухолевой активности на ксенографтах опухолей человека проводили по стандартному показателю торможения роста опухоли, рассчитанному по соотношению средних объемов опухолевых узлов в леченой и контрольной группах мышей, Т/С% («treatment/control»), принимая Т/С=100% в контрольной группе и используя максимальный критерий для экспериментов с развившимися опухолями Т/С≤42%.

Степень торможения роста опухоли (ТРО и Т/С) вычислялась по формулам:

$$\text{ТРО}\% = (V_k - V_o) / V_k \times 100 \quad \text{и} \quad \text{Т/С}\% = (V_o / V_k) \times 100,$$

где V_k и V_o – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определялся как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на разные сроки после окончания лечения.

УПЖ леченных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ}\% = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ_о и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных. Эффективными считали дозы препаратов, вызывающие ТРО≥70% продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения или УПЖ≥25%. Излечение (% случаев) — количество животных, проживших 90 дней без признаков опухолевого процесса.

Оценка переносимости лечения у мышей с опухолью. В ходе всех экспериментов наблюдение за животными продолжалось до их гибели. О переносимости химиотерапевтического воздействия судили по состоянию и поведению мышей. При этом фиксировали достоверное уменьшение массы тела (≥30%) и селезенки (косвенные признаки общей, гематологической и иммунотоксичности), а также гибель от токсичности. Токсичность изученных режимов и доз препаратов оценивали по срокам гибели леченных животных в сравнении с гибелью животных в контрольной группе. Павших или умерщвленных передозировкой эфирного наркоза мышей подвергали аутопсии для визуального определения патологических изменений внутренних органов. Трупы животных утилизировали в соответствии с санитарными правилами ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Изучение механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208. При изучении механизма противоопухолевой активности исследовали действие субстанции ЛХС-1208 на активность топоизомеразы I и взаимодействие ЛХС-1208 с ДНК.

Для изучения влияния ЛХС-1208 на каталитическую активность топоизомеразы I реакционную смесь, содержащую суперскрученную ДНК плазмиды pBR322 (ДНКсс;

«Ферментас», Литва) инкубировали с 1 ЕД топоизомеразы I в отсутствие (контроль) и присутствии ЛХС-1208 (0,5-20 мкМ) при 37°C в течение 30 мин. в буфере, содержащем 35 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 72 мМ КCl, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотрейтола, 2 мМ спермидина, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Реакцию останавливали внесением додецилсульфата натрия (до 1%). Добавляли протеиназу К и инкубировали смесь 30 мин при 37°C. Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле (состав буфера: 40 мМ Трис-основания, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 30 мМ ледяной уксусной кислоты); гели окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в УФ-свете.

Взаимодействие ЛХС-1208 с ДНК изучали в присутствии 13,7 мкМ пар оснований ДНК тимуса телят (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в растворе, содержащем 10 мМ фосфатного буфера (рН 7.8) и 100 мМ NaCl, применяя метод спектрального анализа. По изменению спектров поглощения определяли взаимодействие соединения ЛХС-1208 с ДНК. Кроме того, исследовали концентрацию связанного и концентрацию не связавшегося (свободного) ЛХС-1208. На основании этих данных строили изотерму связывания в координатах Скэтчарда. По полученным показателям судили о параметрах связывания молекул ЛХС-1208 с дуплексной ДНК.

Статистический анализ данных скрининга 10 соединений ЛХС проводили с помощью пакета IBM SPSS Statistics 21 (лицензия № 20130626-3). Для оценки статистической значимости различий групп применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим сравнением отдельных групп друг с другом по критерию Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Скрининг 10 производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов на различных моделях опухолей *in vivo*

Сравнительное изучение 10 новых отечественных производных N-гликозидов индолокарбазолов проведено в ходе анализа связи «структура–активность». Такой подход открывает возможности рациональной разработки из этого класса соединений новых противоопухолевых агентов.

Материал, полученный в ходе анализа связи «структура–активность» 10 углеводсодержащих индолокарбазолов ЛХС, показал их эффективность на P388 независимо от модификационных изменений в структуре агликона. На моделях LLC и В16 противоопухолевая активность соединений ЛХС зависела от структуры как агликона, так и гликозидного остатка.

По результатам скрининга установлено, что все соединения в оптимальных терапевтических дозах обнаружили активность по УПЖ мышей с лимфолейкозом P388,

соединения ЛХС-1054 и ЛХС-983 оказались неэффективными в отношении карциномы легкого LLC, соединения ЛХС-1007, ЛХС-1040 и ЛХС-999 не проявили противоопухолевой активности на меланоме В16. Как наиболее активные отмечены соединения ЛХС-1208, ЛХС-976, ЛХС-1098 и ЛХС-985 (таблицы 2 и 3).

Таблица 2 — Максимальный эффект соединений ЛХС в оптимальной терапевтической дозе.

Соединения	Опухолевые модели мышей		
	Р388 (УПЖ)	LLC (ТРО)	В16 (ТРО)
ЛХС-1208	119%, p<0,001	91%, p<0,012	91%, p=0,001
ЛХС-1054	129%, p<0,001	Без эффекта	56%, p=0,019
ЛХС-1007	34%, p=0,002	48%, p≤0,05	53%, p>0,05*
ЛХС-1006	41%, p>0,05*	90%, p<0,001	35%, p=0,013
ЛХС-1040	39%, p<0,001	59%, p=0,011	48%, p>0,05*
ЛХС-976	47%, p≤0,001	68%, p=0,04	70%, p=0,002
ЛХС-983	101%, p=0,006	Без эффекта	84%, p=0,014
ЛХС-1098	39%, p<0,001	67%, p=0,003	78%, p=0,006
ЛХС-999	115%, p<0,001	90%, p=0,016	Без эффекта
ЛХС-985	89%, p<0,005	56%, p=0,001	74%, p=0,045

* p>0,05 - недостоверно по отношению к контролю

Полученные результаты, направленные на исследование связи «структура–активность», позволили оценить противоопухолевое действие 10 производных N-гликозидов индола[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов и отобрать из них для дальнейшего изучения наиболее эффективное ЛХС-1208 (таблицы 2 и 3). Высокая противоопухолевая активность ЛХС-1208 обнаружена в суммарной дозе 500 мг/кг при действии на Р388 (УПЖ=119%, p<0,001) и В16 (ТРО=91%, p=0,001), на LLC — при применении суммарной дозы 375 мг/кг (ТРО=91%, p=0,012).

Таблица 3 — Результаты активности соединений ЛХС на опухолевых моделях мышей.

Соединения	Опухолевые модели			Токсичная доза (мг/кг) x число введений, опухолевая модель (гибель от токсичности, % случаев)	Соотношение токсической и терапевтической доз
	P388	LLC	B16		
ЛХС-1208	+++	+++	+++	—	—
ЛХС-1054	+++	--	++	125x5, P388 (33%) 150x5, B16 (16%)	125x5/25x5 150x5/75x5
ЛХС-1007	+ -	+ -	--	200x1, P388 (20%)	200x1/30x5
ЛХС-1006	+ -	+++	+ -	50x5, P388 (28%)	50x5/40x5
ЛХС-1040	+ -	++	--	75x5, LLC (50%) 50x5, B16 (16%)	75x5/50x5
ЛХС-976	++	++	++	—	—
ЛХС-983	+++	--	+++	100x5, LLC (33%) 50x5, B16 (14%)	50x5/10x5
ЛХС-1098	+ -	++	++	—	—
ЛХС-999	+++	+++	--	150x5, LLC (12%)	150x5/125x5
ЛХС-985	+++	++	++	—	—

-- отсутствие эффекта ТРО < 25%, УПЖ < 25% для P388;

+ - пограничный эффект ТРО 25-50%, УПЖ 25-40% для P388;

++ достоверный эффект ТРО 50-75%, УПЖ 40-70% для P388;

+++ высокий достоверный эффект ТРО > 70%, УПЖ > 70% для P388.

Разнообразие модификаций индолокарбазолов позволило выявить зависимость их противоопухолевых свойств от структуры как агликона, так и гликозидного остатка. Так,

– замена атомов в верхнем гетероцикле по имидному азоту оказывает влияние на противоопухолевую активность соединений ЛХС с разными гликозидными остатками;

– противоопухолевый эффект соединений ЛХС с одинаковым агликоном, но модифицированных по гликозидному остатку, зависит от природы гликозидного остатка;

– противоопухолевые свойства соединений ЛХС, имеющих одинаковый гликозидный остаток, зависят от различных заместителей в структуре агликона.

Однако четкой связи «структура–активность» при сравнительном изучении *in vivo* 10 производных N-гликозидов индолокарбазолов ЛХС на моделях P388, LLC и B16 не обнаружено. Вероятно, для установления соотношения «структура–активность» необходимо проведение скрининга с большим количеством производных индолокарбазолов, объединенных в определенные модификационные группы.

Определение чувствительности к ЛХС-1208 клеточных линий опухолей человека и экспериментальных опухолей мышей¹

Цитотоксическая активность субстанции ЛХС-1208 была изучена на ряде культур опухолевых клеток человека — раке яичников SKOV3 ($IC_{50}=8$ мкМ), раке предстательной железы DU145 ($IC_{50}=18$ мкМ), меланоме MeWo ($IC_{50}=26$ мкМ), раке молочной железы MCF-7 ($IC_{50}=100$ мкМ). Наиболее чувствительными к действию ЛХС-1208 оказались культуры клеток рака толстой кишки человека HCT-116 ($IC_{50}=5$ мкМ) и LS174T ($IC_{50}=8$ мкМ), что позволило продолжить исследование эффективности ЛХС-1208 на модели аденокарциномы толстой кишки мышей АКАТОЛ. Высокая противоопухолевая активность ЛХС-1208 обнаружена в суммарной дозе 375 мг/кг с ТРО=97-62% ($p\leq 0,001$) в течение 16 дней после окончания лечения и УПЖ=36%. Аналоги ребеккамицина (эдотекарин и NB-506) проявили эффективность на ксенографтах рака толстой кишки человека HCT-116 [Arakawa, H. et al., 1995; Ciomei, M. et al., 2006].

Высокий противоопухолевый эффект ЛХС-1208 в суммарной дозе 375 мг/кг наблюдался на лимфолейкозе L1210 с УПЖ мышей на 47% ($p<0,001$). Полученные данные соотносятся с результатами экспериментальных исследований ребеккамицина и его аналогов на моделях лейкозов мышей P388 и L1210 [Bush, J.A. et al., 1987; Arakawa, H. et al., 1993]. На РШМ5 в суммарной дозе 375 мг/кг также отмечено противоопухолевое действие ЛХС-1208 в течение 7 дней после окончания лечения: ТРО=97-52% ($p=0,011$).

Исследование механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208²

Воздействуя на ДНК и ДНК-зависимые топоизомеразы, противоопухолевые агенты способны вызывать накопление поврежденных молекул ДНК и приводить опухолевые клетки к

¹ Цитотоксическая активность изучена *in vitro* к.м.н. О.С. Жуковой, НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

² Исследования проведены в лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством д.м.н. А.А.Штиля.

гибели. Установлено, что арабинопиранозил ЛХС-1208 интеркалирует в двухцепочечную ДНК с образованием высокоаффинных комплексов, характеризующихся различными константами связывания и максимальным числом мест посадки лиганда. Одна молекула ЛХС-1208 занимает участок, соответствующий 4-5 нуклеотидным остаткам. Анализ функций лиганда подтверждает его влияние на проникновение через мембраны, внутриклеточную миграцию, сортировку и секрецию белков. Обнаружено, что ЛХС-1208 в микромолярных концентрациях ингибирует ядерный белковый фермент топоизомеразу I, необходимую для образования комплекса с разорванной спиралью опухолевой ДНК во время процесса репликации.

Компьютерное моделирование взаимодействия молекулы другого арабинопиранозила ЛХС-1006 с ДНК показало, что соединение интеркалирует индокарбазольной частью, а углеводная группа образует в малой бороздке дополнительные водородные связи [Kaluzhny, D.N. et al., 2009]. Особенностью взаимодействия ЛХС-1006 с ДНК является образование сильного комплекса с нативной ДНК, причем лиганд занимает ~20% всех мест связывания. При насыщении мест связывания молекулами ЛХС-1006 на каждые две пары оснований приходится одна молекула лиганда. В результате образования интеркаляционных комплексов нарушается конформация двойной спирали за счет сильного растяжения и раскручивания при максимальном заполнении ДНК лигандом. Вызываемые комплексообразованием изменения конформации двойной спирали ДНК нарушают матричные синтезы.

Гибель опухолевых клеток наступает, в основном, за счет образования сильного типа интеркаляционных комплексов между лигандом и ДНК.

Следует отметить, что структурную часть молекулы, которая статистически часто повторяется среди специфического большинства уже известных биологически активных соединений, или среди известных лигандов данного типа соединений или ингибиторов данного фермента, называют привилегированной [Kombarov, R. et al., 2010]. Исследование механизма действия способствует тому, что такие привилегированные элементы химической структуры, как у N-гликозидов индокарбазолов, могут быть предложены для разработки новых биологически активных соединений.

Углубленное изучение эффективности лекарственной формы ЛХС-1208 на чувствительных моделях опухолей мышей

Противоопухолевая активность прототипов ЛФ ЛХС-1208 изучалась в ходе определения оптимального пути введения в организм, при котором достигается наибольшая эффективность. Субстанция ЛХС-1208 нерастворима в воде и большинстве органических растворителей, поэтому для получения растворов препарата использовали соразтворители: Cremophor ELP; Kollisolv PEG-400 / Lutrol E-400; Kolliphor HS15; Kollidon 17PF [Гулякин, И.Д. и соавт., 2014]. Получить истинные растворы ЛХС-1208 удалось с применением Kollisolv PEG-400/Lutrol E-

400, которые используются только в ЛФ для перорального применения [Ланцова, А.В. и соавт., 2014]. Однако при оценке эффективности модельной пероральной ЛФ в дозах 50, 75 и 100 мг/кг (суммарные дозы 250, 375 и 500 мг/кг) на мышах с LLC терапевтического эффекта не выявлено (табл. 4).

Таблица 4 — Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 для перорального применения.

№ №	Состав прототипа	Модели опухолей	Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, (ТРО)	Гибель (n/n)**
1	Субстанция - 20 мг ДМСО - 2,7 мл Kollidon 17PF - 150 мг Вода для инъекций - 6,3 мл	P388	25	125	7%	0/7
			50	250	8%	0/7
			75	375	17%	0/7
2	Субстанция - 30 мг ДМСО - 2,7 мл Cremophor ELP - 2,971 мл Вода для инъекций - 6,3 мл	P388	25	125	8%	0/7
			50	250	10%	0/7
			75	375	14%	0/7
3	Субстанция - 100 мг Kollisolv PEG-400 / Lutrol E-400 - 17,5 мл Вода для инъекций - 20 мл	LLC	50	250	(+20%)*	1/7
			75	375	(47%)	1/7
			100	500	(+32%)*	2/7
4	Субстанция - 30 мг ДМСО - 0,5 мл Kollidon 17PF - 2000 мг Вода для инъекций - 10 мл	S M-1	25	125	(17%)	0/9
			50	250	(1%)	1/10

* знак “+” означает стимуляцию роста опухоли;

** n/n - число павших к общему числу животных в группе.

В других прототипах ЛФ для полного растворения субстанции ЛХС-1208 применяли ДМСО. При этом на мышах и крысах с экспериментальными опухолями P388 и SM-1 наблюдали отсутствие терапевтического эффекта пероральной ЛФ в исследуемых дозах. Показатели УПЖ и ТРО оказались ниже минимального критерия активности.

Изучение прототипов ЛФ ЛХС-1208 показало их активность только при в/в введении (табл. 5). Для поддержания стабильности растворов ЛХС-1208 с Cremophor ELP и Kollidon 17PF возникла необходимость лиофилизации ЛФ, так как в ходе экспериментальных технологических исследований было обнаружено, что концентрация активного вещества в ЛФ снижалась на 10% в течение 7 суток. От дальнейшего исследования активности ЛФ с Cremophor ELP пришлось отказаться, поскольку его наличие в составе не позволяет лиофилизировать ЛФ [Ланцова, А.В. и соавт., 2014].

Таблица 5 — Эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 при внутривенном введении.

№ №	Состав прототипа	Модели опухолей	Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, (ТРО)	Гибель животных (n/n)*
1	Субстанция - 30 мг ДМСО - 2,7 мл Kollidon 17PF - 150 мг Физиологический р-р - до 9 мл	P388	10	50	14%	0/8
			25	125	72%	0/8
			50	250	122%	1/8
2	Субстанция - 100 мг ДМСО - 3,325 мл Cremophor ELP - 10,0 мл Вода для инъекций - до 21,0 мл	P388	25	125	75%	0/9
			35	175	80%	0/9
3	Субстанция - 25 мг ДМСО - 0,5 мл Cremophor ELP - 2,5 мл Вода для инъекций - до 10,0 мл	P388	10	50	13%	0/7
			25	125	68%	0/7
			35	175	86%	0/7
			45	225	96%	0/7
4	Субстанция - 30 мг ДМСО - 0,5 мл Kollidon 17PF - 2000 мг Вода для инъекций - до 10,0 мл	P388	10	50	26%	0/7
			25	125	73%	0/7
			35	175	92%	0/7
5	Субстанция - 50 мг ДМСО - 1,4 мл Cremophor ELP - 4,3 мл Вода для инъекций - до 14,3 мл	LLC	25	125	(99%)	0/7

* n/n - число павших к общему числу животных в группе

Для доклинических исследований была разработана лекарственная форма ЛХС-1208 с Kollidon 17PF в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. На основании экспериментальных исследований пяти прототипов ЛФ ЛХС-1208, отобран один с наименьшим содержанием ДМСО в составе № 4 ЛФ и высокими показателями противоопухолевой активности на модели P388 мышей: УПЖ=26-92%, $p < 0,05$ (табл.5).

Очевидно, модификации в структуре молекулы индокарбазола приводят к изменению спектра противоопухолевого действия, разной степени противоопухолевого эффекта и разной биодоступности производных соединений. Кроме того, в соответствии с классификацией структуры N-гликозидов индокарбазолов можно заметить, что производные стауроспорина (мидостаурин, энзастаурин и лестауртиниб) эффективны при пероральном применении [Smith, B.D. et al., 2004; Stone, R.M et al., 2005; Oh, Y. et al., 2008], в отличие от производных ребеккамицина (бекатекарин и эдотекарин), которые проявляют активность при в/в введении

[Burstin, H.J. et al., 2007; Saif, M.W. et al., 2010]. По химическому строению молекула ЛХС-1208 относится к структурным аналогам ребеккамицина.

При выборе оптимальной схемы применения установлена зависимость активности инъекционной ЛФ ЛХС-1208 (препарата ЛХС-1208) от дозы и режима введения на моделях опухолей разного гистогенеза. На гемобластозах Р-388, L-1210 и лимфаденоза Фишера L5178Y оптимальным режимом применения препарата ЛХС-1208 является ежедневное 5-кратное в/в введение в терапевтической дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг), на солидных опухолевых моделях LLC, РШМ5 и В16 — терапевтическая суточная доза 150 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении. Приведенные данные сопоставимы с результатами экспериментального исследования антипролиферативной активности аналогов ребеккамицина, где Schurig, J.E. et al. в 1990 г. показали высокую активность двух его производных ВМУ-28175 и ВМС-250749 при в/в введении на моделях лейкозов мышей Р388, L1210 и в терапии карциномы легких LLC [Saulnier, M.G. et al., 2005].

Изучение эффективности препарата ЛХС-1208 на подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 *in vivo*³

Иринотекан вводили в/в в однократной дозе 66 мг/кг, препарат ЛХС-1208 — в разовой дозе 75 мг/кг двукратным курсом с интервалом 96 ч (суммарно 150 мг/кг). Установлено, что противоопухолевый эффект сравниваемых препаратов нарастает от 1-го до 12-го дня после окончания лечения. В группе иринотекана соотношение объемов опухолей составило соответственно Т/С=21, 15, 14%, в группе ЛХС-1208 показатель Т/С=23, 2 и 2% соответственно (критерий Т/С≤42%). Полученные результаты высоко достоверны по отношению к контролю без лечения (табл. 6).

Таблица 6 — Сравнительная эффективность препарата ЛХС-1208 и иринотекана в оптимальных схемах на п/к ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

Показатели	Сравнительная эффективность на сроки после окончания лечения					
	1-е сутки		6-е сутки		12-е сутки	
	Ирино-текан	ЛХС-1208	Ирино-текан	ЛХС-1208	Ирино-текан	ЛХС-1208
Т/С%	21	23	15	2*	14	2*
Ttest	p>0,05		p<0,05		p<0,05	
* различия между группами достоверны.						

³ Исследования проведены под руководством д.м.н., проф. Е.М. Трещалиной совместно с к.м.н. Н.В. Андроновой, к.б.н. Г.Б. Смирновой, НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Однократное применение препарата ЛХС-1208 в дозе 150 мг/кг лимитировалось объемом и скоростью введения, вызывая гибель всех опытных мышей, доза 100 мг/кг оказалась максимально переносимой. В группах мышей, получивших ЛХС-1208 в суточной дозе 50 мг/кг двукратно (суммарно 100 мг/кг) и 100 мг/кг однократно, наблюдали возрастающий во времени по уровню и степени достоверности противоопухолевый эффект на 1-е, 6-е и 12-е сутки после лечения: Т/С=16 и 20%, 14 и 16%, 9 и 15% ($p \leq 0,005$) соответственно (рисунок 2).

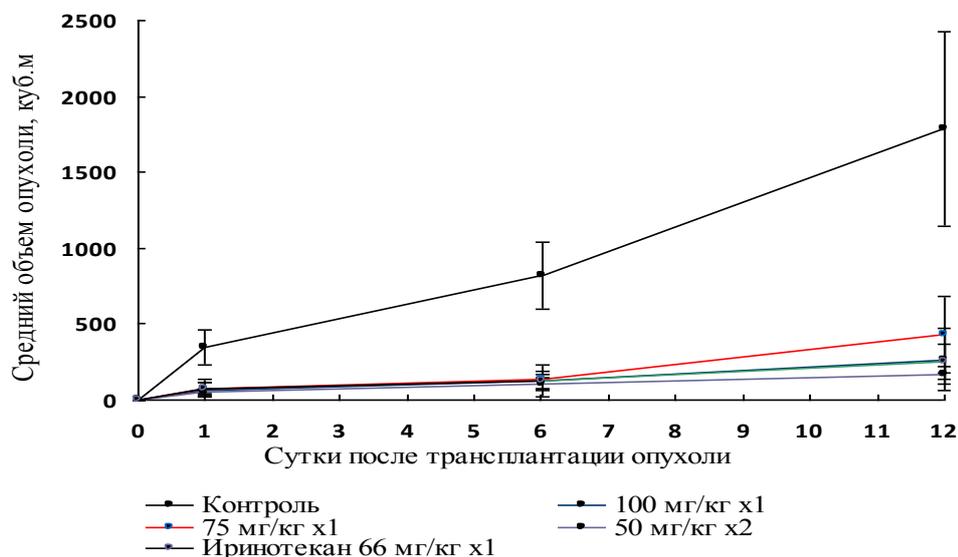


Рисунок 2 — Динамика роста SW620 под действием препарата ЛХС-1208 в диапазоне доз 50x2, 75 и 100 мг/кг в сравнении с иринотеканом.

Схема с двукратным в сутки введением препарата ЛХС-1208 в разовой дозе 50 мг/кг (суммарно 100 мг/кг) отмечена, как в 1,6 раза более эффективная по уровню ТРО на 12-й день после окончания лечения, чем однократная доза 100 мг/кг (Т/С=9% против 15%).

При переносимых дозах в рамках изученных схем применения состояние и поведение мышей в течение 20 дней было удовлетворительным без побочных эффектов или гибели от токсичности. Сравнительная динамика роста опухоли, оцененная визуально у этих мышей на 12-е и 20-е сутки после лечения, показала, что в группе ЛХС-1208 рост опухоли практически стабилизировался, так как их размеры оказались меньше опухолей мышей в контрольной группе, измеренных на 12-е сутки после окончания лечения.

ВЫВОДЫ

1. На основании изученных противоопухолевых свойств 10 производных N-гликозидов индолокарбазолов отобрано соединение ЛХС-1208, показавшее высокую эффективность на перевиваемых опухолях мышей: P388 (УПЖ=75-119%, $p < 0,0001$), LLC (ТРО=91%, $p = 0,012$) и В16 (ТРО=91%, $p = 0,001$).

2. Установлена высокая цитотоксическая активность ЛХС-1208 на клеточных линиях рака толстой кишки человека НСТ-116 и LS174Т со значениями IC_{50} 5 и 8 мкМ.

3. Определены мишени и молекулярные механизмы противоопухолевого действия ЛХС-1208 — полное ингибирование активности топоизомеразы I в концентрации ≥ 5 мкМ и интеркаляция в двухцепочечную ДНК (одна молекула ЛХС-1208 занимает участок в двойной цепи ДНК, соответствующий 4–5 нуклеотидным остаткам).

4. Выявлена эффективность ЛХС-1208 на расширенной панели перевиваемых опухолей мышей: АКАТОЛ (ТРО=97-62%, $p \leq 0,001$ до 16 дня после лечения, УПЖ=36%), РШМ5 (ТРО=52%, $p=0,011$ до 7 дня после лечения) и L1210 (УПЖ=47%, $p < 0,001$).

5. По результатам исследований предложен оптимальный состав лекарственной формы препарата «ЛХС-1208, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9 мг».

6. Препарат ЛХС-1208 показал высокую эффективность на гемобластозах мышей Р388 и лимфаденозе Фишера L5178Y (УПЖ=76% и 83% соответственно) с излечением 33% животных с L5178Y.

7. Препарат ЛХС-1208 проявил активность на солидных опухолевых моделях мышей: LLC (ТРО=95-49%, $p < 0,05$ до 17 дня после лечения), РШМ5 (ТРО=74-56%, $p < 0,05$ до 9 дня после лечения) и В16 (ТРО=59%, $p < 0,05$ до 4 дня после лечения).

8. Препарат ЛХС-1208 превосходит по уровню и длительности эффекта клинический прототип, ингибитор топоизомеразы I, иринотекан (Т/С $_{min}$ =2% против Т/С $_{min}$ =14%, $p < 0,05$ соответственно), что подтверждено на подкожно перевитых ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Объективный анализ химической модификации различных производных индолокарбазолов позволяет найти зависимость их противоопухолевых свойств от структурных особенностей и молекулярного механизма действия. Такой подход может служить основанием для синтеза более активных производных ЛХС с большей избирательностью действия и меньшей токсичностью.

Сформулированные положения, полученные в ходе экспериментального исследования прототипов лекарственной формы индолокарбазола ЛХС-1208, могут быть использованы в процессе разработки новых биологически активных аналогов или препаратов с улучшенными по сравнению с исходными прототипами свойствами.

Принимая во внимание, что ЛХС-1208 является ингибитором активности топоизомеразы I, обладает высокой цитотоксической активностью на клетках рака толстой кишки человека НСТ-116 и LS174Т, более активен, чем его функциональный аналог иринотекан на

ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620, можно предположить эффективность препарата ЛХС-1208 в клинике при злокачественных опухолях толстой кишки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Смирнова, З.С. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова, **М.П. Киселева** и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2006. — Т. 5, № 3. — С. 123-127.
2. Ланцова, А.В. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола — ЛХС-1208 / А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, З.С. Шпрах, **М.П. Киселева**, И.Д. Гулякин, З.С. Смирнова // Российский биотерапевтический журнал. — 2014. — Т. 13, № 3. — С. 25-32.
3. **Киселева, М.П.** Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов / М.П. Киселева, З.С. Смирнова, Л.М. Борисова и др. // Российский онкологический журнал. — 2015.— Т. 20, №1. — С. 33-37.
4. **Киселева, М.П.** Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I / М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 2. — С. 71-77.
5. **Киселева, М.П.** Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II / М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 3. — С. 41-48.
6. **Киселева, М.П.** Производные индолокарбазолов — перспективный класс противоопухолевых препаратов / М.П. Киселева, В.С. Покровский, В.В. Татарский и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т. 17, № 4. — С. 20-26.
7. **Киселева, М.П.** Влияние химической структуры производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов на противоопухолевую активность / М.П. Киселева, В.С. Покровский, Л.М. Борисова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2019. — Т. 18, № 2. — С. 32-39.
8. **Киселева, М.П.** Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208 / М.П. Киселева, Л.М. Борисова, З.С. Шпрах и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т. 15, № 1. — С. 46-47.

9. **Киселева, М.П.** Антиметастатическое действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 / М.П. Киселева, Л.М. Борисова, З.С. Шпрах и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 89.

10. **Киселева, М.П.** Действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на топоизомеразу I / М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.Г. Деженкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 89.

11. **Киселева, М.П.** Исследование противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных гликозидов индолокарбазолов / М.П. Киселева, Л.М. Борисова, Л.В. Эктова и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т.17, № 2. — С. 35.

12. **Киселева, М.П.** Соотношение связи «химическая структура – противоопухолевая активность» у новых соединений класса N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов. Материалы 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием MedChem Russia 2019. Екатеринбург, Россия, 9-14 июня 2019 г. / М.П. Киселева, Л.М. Борисова, И.С. Голубева и др.

13. Патент № 2548045 от 27.02.2014 г. N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью / Борисова Л.М. (RU) Голубева И.С. (RU), Горюнова О.В. (RU), Еремина В.А. (RU), Жукова О.С. (RU), Киселева М.П. (RU), Медведева Л.А. (RU), Мельник С.Я. (RU), Миникер Т.Д. (RU), Смирнова З.С., (RU), Тихонова Н.И. (RU), Эктова Л.В. (RU), Ярцева И.В. (RU); опубл.10.04.2015.

14. Патент № 2572691 от 09.10.2014 г. Противоопухолевое средство / Ланцова А.В. (RU), Оборотова Н.А. (RU), Орлова О.Л. (RU), Полозкова А.П. (RU), Шпрах З.С. (RU), Санарова Е.В. (RU), Смирнова З.С. (RU), Киселева М.П. (RU), Борисова Л.М. (RU), Игнатьева Е.В. (RU), Гулякин И.Д. (RU); опубл.20.01.2016. Бюл. № 2.