

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н.Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Смирнова Зоя Сергеевна

доктор медицинских наук

Покровский Вадим Сергеевич

Москва – 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1 Производные индолокарбазолов — перспективный класс противоопухолевых препаратов	13
Обзор литературы	
1.1 Структура и физико-химические свойства соединений группы индолокарбазолов.....	13
1.2 Природные источники индолокарбазолов и их биологические свойства	18
1.3 Антипролиферативная активность производных индолокарбазолов (результаты экспериментальных исследований)	21
1.4 Антипролиферативная активность производных индолокарбазолов (результаты клинических исследований)	33
1.5 Возможные механизмы противоопухолевого действия производных индолокарбазолов.....	41
1.6 Рациональные подходы к созданию новых противоопухолевых препаратов на основе производных индолокарбазолов.....	48
Глава 2 Материалы и методы.....	52
2.1 Животные	52
2.2 Опухолевые модели	52
2.3 Препараты	54
2.4 Дозы и режимы применения	56
2.5 Оценка противоопухолевого эффекта.....	58
2.6 Оценка переносимости лечения у мышей с опухолью	59
2.7 Изучение цитотоксической активности производного индолокарбазола ЛХС-1208	59
2.8 Изучение механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208.....	61
2.9 Статистическая обработка.....	61

Глава 3 Скрининг соединений класса индолокарбазолов на различных моделях опухолей <i>in vivo</i>	63
3.1 Скрининг производных индолокарбазолов на модели лимфолейкоза P388 мышей.....	63
3.2 Скрининг производных индолокарбазолов на модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) мышей.....	78
3.3 Скрининг производных индолокарбазолов на модели меланомы B16 мышей.....	93
Глава 4 Определение чувствительности к ЛХС-1208 клеточных линий опухолей человека и экспериментальных опухолей мышей	110
4.1 Цитотоксичность субстанции ЛХС-1208.....	110
4.2 Определение чувствительности к ЛХС-1208 аденокарциномы толстой кишки мышей АКАТОЛ	111
4.3 Определение чувствительности к ЛХС-1208 рака шейки матки мышей РШМ5.....	113
4.4 Определение чувствительности к ЛХС-1208 лимфолейкоза мышей L1210	115
Глава 5 Изучение механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208.....	117
Глава 6 Углубленное изучение эффективности лекарственной формы ЛХС-1208 на чувствительных моделях опухолей мышей	120
6.1 Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 для перорального применения.....	120
6.2 Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 при внутривенном введении.....	122
6.3 Изучение спектра противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 в разных режимах применения при внутривенном введении	125
Глава 7 Изучение эффективности ЛХС-1208 на подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 <i>in vivo</i>	135

Глава 8 Обсуждение полученных результатов с перспективой дальнейшей разработки противоопухолевых препаратов на основе производных индолокарбазолов	138
8.1 Анализ результатов скрининга соединений класса индолокарбазолов на различных моделях опухолей <i>in vivo</i>	138
8.2 Анализ результатов чувствительности к ЛХС-1208 клеточных линий опухолей человека и экспериментальных опухолей мышей	143
8.3 Анализ результатов выбора лекарственной формы ЛХС-1208 в ходе определения ее эффективности на чувствительных моделях опухолей мышей	144
8.4 Анализ механизма противоопухолевого действия соединений класса N-гликозидов индолокарбазолов	147
Выводы	149
Список сокращений и условных обозначений	151
Список литературы	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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 лекарственной терапии опухолевых заболеваний, являются возникновение устойчивости к ним опухолевых клеток, ограниченная избирательность действия и отсроченная токсичность.

В связи с вышесказанным, современный подход при создании новых противоопухолевых препаратов основан на идентификации молекулярных мишеней, специфических для раковой клетки, и рациональном использовании ингибиторов таких мишеней. В этом направлении ведется активный поиск индукторов апоптоза опухолевых клеток, ингибиторов ангиогенеза, важнейших ферментов обмена нуклеиновых кислот, регулирующих процессы внутриклеточного метаболизма и оказывающих влияние на клеточный цикл.

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

N-гликозиды замещенных индолокарбазолов и родственных соединений представляют большое семейство природных и синтетических соединений, обладающих противоопухолевой, антибактериальной и иммуномодулирующей активностью. К настоящему времени N-гликозиды замещенных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов вызывают большой интерес в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов, и некоторые из них уже проходят за рубежом клинические испытания.

Таким образом, разработка препаратов из группы производных индолокарбазолов является актуальной в связи с их уникальной способностью взаимодействовать со многими внутриклеточными мишенями и возможностью

индуцировать разные пути гибели опухолевых клеток, что позволяет расширить диапазон противоопухолевого действия препарата и улучшить результаты лечения онкологических больных. Кроме того, использование препаратов, направленных сразу на несколько внутриклеточных мишеней предпочтительней, так как потенциально они позволяют избежать, или отсрочить появление резистентности к ним опухолевых клеток.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время опубликовано большое количество научных работ, посвященных изучению гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло[2,3-а]карбазолов. Многочисленными исследованиями установлено, что природные и синтетические соединения из группы гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов воздействуют на разные внутриклеточные мишени: ДНК, интеркаляция которой приводит к конформации двойной спирали и вызывает ее повреждения; топоизомеразы, контролирующие транскрипцию, репликацию и репарацию ДНК; киназы, в частности циклинзависимую киназу CDK-1, протеинкиназу C, участвующие в передаче пролиферативных сигналов.

За рубежом в клинических исследованиях активно изучается эффективный ингибитор протеинкиназы C алкалоид стауроспорин и ряд его аналогов (энзастаурин, мидостаурин, лестауртиниб), а также близкий к стауроспорину по структуре антибиотик ребеккамицин и его водорастворимое производное бекатекарин, обладающий противоопухолевой активностью, связанной с подавлением топоизомеразы I. Энзастаурин в сочетании с цитостатическими препаратами показал эффективность в лечении немелкоклеточного рака легкого [149]. Отмечена результативность комбинаций энзастаурина с темозоломидом у пациентов с рецидивом глиобластомы и с бевацизумабом при рецидивах злокачественных глиом [150; 151]. Оценена эффективность применения мидостаурина у пациентов с диагнозом острый нелимфобластный лейкоз и острый миелобластный лейкоз, а также для лечения устойчивых к иматинибу желудочно-кишечных стромальных опухолей [14; 144; 146].

Лестауртиниб продемонстрировал клиническую активность у пациентов с рецидивом острого миелобластного лейкоза [153], а в комбинации с камптотецином усиливал эффективность химиотерапии у детей с рефрактерной нейробластомой [155].

Клинические испытания показали умеренную эффективность бекатекарина в терапии рака молочной железы [160]. Отмечено, что бекатекарин при лечении мелкоклеточного рака легкого оказался менее активным в сравнении с существующими препаратами [156]. При метастатическом колоректальном раке бекатекарин оказался практически неэффективным [162]. Ингибитор топоизомеразы I эдотекарин проходит исследование в комбинации с цисплатином у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями (рак пищевода, рак желудка) [167].

Результаты клинических исследований различных производных индолокарбазолов продемонстрировали широкий спектр потенциальных показаний к применению, а также хорошую сочетаемость с известными препаратами. В то же время эффективность производных индолокарбазолов была сопоставимой с другими изучаемыми препаратами, при наличии существенной токсичности, прежде всего, гематологической.

Все вышеперечисленное позволяет считать, что разработка новых потенциальных противоопухолевых препаратов из класса производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов необходима для расширения химиотерапевтических возможностей лечения злокачественных новообразований и перспективна для преодоления лекарственной резистентности опухолевых клеток за счет индукторов, связанных с механизмом их действия.

Цель и задачи исследования

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.

Поставленная цель определяет следующие задачи:

- 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;
- определить чувствительность к лидерному соединению расширенной панели перевиваемых опухолей мышей: аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ, рака шейки матки PШМ5 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, PШМ5, меланоме B16 мышей;
- исследовать эффективность ЛФ лидерного соединения на подкожных (п/к) ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 *in vivo*.

Научная новизна

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 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. По результатам первичного исследования противоопухолевых свойств новых производных гликозидов индолокарбазолов для углубленного изучения отобрано соединение ЛХС-1208.

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 P388, LLC и B16.

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 лекарственную форму нового отечественного производного индолокарбазола ЛХС-1208.

На иммунодефицитных мышах выполнена серия экспериментов с ЛХС-1208, направленных на выявление противоопухолевого эффекта препарата на опухоль человека SW620, в т.ч., в сравнении с клиническим прототипом Иринотеканом, ингибитором топоизомеразы I.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы определяется выявлением противоопухолевой активности и установлением механизма действия у новой группы соединений N-гликозидов индолокарбазолов. 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.

В работе обобщены и проанализированы данные антипролиферативной активности известных за рубежом и применяемых в онкологической практике лекарственных средств на основе производных индолокарбазолов, а также их

аналогов — возможных кандидатов для создания новых лекарственных препаратов.

Теоретические данные обзорного материала послужили основанием для проведения экспериментальных исследований по разработке нового препарата из класса N-гликозидов индолокарбазолов для терапии злокачественных новообразований. Проведение скрининга в ряду синтезированных производных индолокарбазолов позволило отобрать среди них высокоэффективное соединение ЛХС-1208, разработать и исследовать его лекарственную форму с возможностью практического применения предлагаемого препарата в клинике для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями.

Представленный в работе экспериментально-практический материал, полученный в ходе изучения зависимости противоопухолевых свойств индолокарбазолов от их структуры, поможет в дальнейшем найти рациональный подход к разработке новых аналогов как потенциальных противоопухолевых агентов.

Сформулированные положения о модификационных особенностях в структуре производных индолокарбазолов могут быть использованы для создания более активных соединений с большей избирательностью действия и меньшей токсичностью.

О практической значимости результатов настоящей работы свидетельствует наличие 2 патентов РФ на изобретение «N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью» № RU 2548045 и «Противоопухолевое средство» № RU 2572691 C1.

Методология и методы исследования

Избранная методология соответствует общепринятой схеме поиска и доклинического изучения противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных N-гликозидов индолокарбазолов, которые рассматриваются как потенциальные агенты для создания лекарственных препаратов. 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 [22]. Для оценки противоопухолевой активности производных N-гликозидов индолокарбазолов 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.

Положения, выносимые на защиту

1. В ходе скрининга синтезированных производных 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 эффективность ЛХС-1208 на модели лимфолейкоза L1210 (УПЖ=47%, $p < 0,001$) при 5-кратном внутрибрюшинном 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 модели 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 активности топоизомеразы I и интеркалирует в двухцепочечную ДНК.

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

5. При выборе оптимального пути введения в организм мышей с перевитыми Р388 и LLC показано, что внутривенное 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 опухолях солидного роста.

7. Показана эффективность ЛХС-1208 при в/в введении мышам Balbc/ nude с п/к ксенографтами SW620 в сравнении с клиническим прототипом иринотеканом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждена использованием современных методик исследования и воспроизводимостью результатов.

По теме диссертации представлен доклад на симпозиуме «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств», проводимом научным сообществом РАН, РАМН и РАСХН 9-11 июня 2008 г. в Москве.

Материалы работы доложены на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова 17-18 марта 2016 г., Москва.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на заседании Ученого совета НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 10 апреля 2018 г. и межлабораторной конференции 19 июля 2018 г.

ГЛАВА 1**ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ****1.1 Структура и физико-химические свойства соединений группы
индолокарбазолов**

Индол (бензопиррол, 2,3-бензпиррол) и карбазол (дибензопиррол, дифениленимин) имеют циклическую сопряженную систему, в которой участвует гетероатом со своей неподеленной электронной парой. Индол, как электронодонорное соединение и слабое основание, реагирует с различными электрофильными реагентами. В отличие от пиррола в индоле реакционным центром является углеродный атом в положении 3, что обусловлено влиянием бензольного цикла. В то же время индол является слабой NH-кислотой и дает соли [1].

Карбазол представляет собой более сложную, чем индол, конденсированную систему, содержащую пиррольное ядро. Карбазол и его производные получают конденсацией двух бензольных колец с пиррольными ядрами. По химическим свойствам карбазол является очень слабым основанием и слабой NH-кислотой [1].

Индол, карбазол и их производные — бесцветные твердые кристаллические вещества, не растворяющиеся в воде. В стандартных условиях (25° С, 100 кПа) температура плавления индола – 52° С, температура кипения – 253° С. Карбазол плавится при 247 - 248° С, кипит при 354 - 355° С [2].

Карбазол не содержит таких реакционноспособных углеродных центров, как индол и пиррол, поэтому химические свойства карбазола отличаются от химии вышеупомянутых гетероциклов. Он устойчив по отношению к кислотам и основаниям, однако легко окисляется с образованием радикальных частиц. Некоторый остаточный ароматический характер пятичленного цикла подтверждается тем фактом, что карбазол представляет собой гораздо более

слабое основание, чем его ациклический аналог дифениламин. Карбазол не растворим в разбавленных минеральных кислотах. Подобно пирролу и индолу, карбазол образует калиевую, магниевую и литиевую соли и его можно алкилировать и ацилировать по атому азота в присутствии оснований [3].

Большинство соединений из группы индолокарбазолов содержит характерную индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольную циклическую структуру, сформированную двумя молекулами триптофана. Ядро индола является R-группой триптофана и присутствует во многих белках. Триптофан служит каркасом для димеризации и ферментативной дериватизации (включая хлорирование, гидроксילирование и пренилирование) производных индольных алкалоидов, обеспечивая им различные химические и биологические свойства [4; 32].

Индолокарбазолы состоят из двух индольных групп, связанных с гетероциклической частью через бензол, и гликозида (пентозы или гексозы), соединенного с одной или двумя индольными группами. В качестве функциональных, связанных с углеводородным радикалом, групп в гетероциклической части молекулы индолокарбазола могут выступать азотсодержащие или кислородосодержащие группы атомов.

В структуру индолокарбазолов входят производные сахаров — гликозиды, связанные через атом азота с органическим радикалом, называемым агликоном. Среди индолокарбазолов известны соединения с моносахаридными, дисахаридными остатками и индолокарбазолы, содержащие в качестве углевода остатки аминсахаров. Следует отметить, что в зависимости от природы атомов, формирующих гликозидную связь с агликоном через атом азота, кислорода, серы или непосредственно с органическим радикалом, различают соответственно N-гликозиды (-N-НН-О-С₆Н₁₁О₅), O-гликозиды (-О-НН-О-С₆Н₁₁О₅), S-гликозиды (-S-НН-О-С₆Н₁₁О₅) и C-гликозиды (-С-НН-О-С₆Н₁₁О₅).

Интерес представляют гетероциклы, содержащие фрагмент индоло[2,3-а]карбазола присоединенный к малеимидному или лактонному остатку. N-

гликозиды этого ряда соединений известны как высоко активные вещества в отношении клеточных ферментов — топоизомераз и протеинкиназ [33-36].

В 1977 году одним из первых в группе N-гликозидов индолокарбазолов, обладающих биологической активностью, был выделен стауроспорин и установлено его строение (культура *Streptomyces staurosporeus*) [37]. Позже в 1983 году из актинобактерий *Nocardia aerocolonigenes* получен известный в ряду N-гликозидов индолокарбазолов противоопухолевый антибиотик ребеккамицин [38].

Для повышения растворимости и увеличения активности исходные природные индолокарбазолы стауроспорин и ребеккамицин подвергались различным модификациям: а) присоединение заместителей к верхнему гетероциклу, замену атомов в верхнем гетероцикле или удаление гетероцикла; б) модификации плоского хромофора; в) модификации замены или удаления углеводной части [39-41].

Известно, что у представителей производных стауроспорина гликозид связан с двумя индольными группами через атомы азота в отличие от аналогов ребеккамицина, у которых сахар присоединяется только к одному индолу. Гетероцикл стауроспорина соединен с лактонным кольцом, гетероцикл ребеккамицина — с имидным кольцом.

Принято считать, что верхний гетероцикл отвечает за связывание индолокарбазолов с киназами и топоизомеразами, плоский хромофор с ненасыщенными группами атомов позволяет встраиваться (интеркалировать) индолокарбазолам между основаниями молекулы ДНК, а углеводный остаток обеспечивает ковалентную связь с ДНК. Модификации в строении углеводной части молекулы меняют не только аффинность к ДНК, но и способность к ингибированию топоизомеразы I [33; 40; 42].

Уникальность структуры, а также биологические свойства соединений, относящихся к классу индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, стимулировали поиск и создание активных противоопухолевых агентов среди синтетических

аналогов стауроспорина и ребеккамицина и их низкомолекулярных производных (таблица 1).

Таблица 1 — Классификация производных индолокарбазола с установленной противоопухолевой активностью

Представители	
Производные стауроспорина	Производные ребеккамицина
4-N-метил-5-гидроксистауроспорин	6-(2-диэтиламин)ребеккамицин
К-252а, К-252с	8-N-(диэтиламиноэтил)ребеккамицин
КТ5926	ВЕ-13793 С
СЕР-1347, СЕР-751(или КТ-6587)	АТ2433
СЕР-701 (или лестауртиниб)	NSC655649 (BMS 181176, или бекатекарин)
UCN-01	ЭД-110
РКС-412 (СРР 4125, или мидостаурин)	МСR-47
N-формилмидостаурин	NB-506
N-карбоксимидостаурин	J-107088 (ED-749, или эдотекарин)
Сотрастаурин	РНА 782615
ZHD-0501	BMS-250749
Аркириафлавин, аркириарубин	ВМУ-28175
ВМУ-41950 (или РК 1409)	
Ro 31-8220, Ro 32-0234	
GF 109203X	
Go 6976	
LY- 317615 (или энзастаурин)	
СЕР-7055	
СЕР-5214	
СЕР-11981 (цефалон)	

В лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России был разработан оригинальный метод синтеза N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, позволяющий получать ряды аналогов, отличающихся структурой углеводного остатка и/или агликона. Метод обеспечивает стереоспецифичность гликозидной связи и использование легко удаляемых защитных групп. В разработанном синтезе в качестве ключевых соединений выступают защищенные гликозиды индола, полученные «индолин-индольным» методом [43]. Последующее взаимодействие гликозидов с оксалилхлоридом и дальнейшая конденсация с индолилуксусной кислотой приводит к выделению N-гликозидов бис(индолил)фуран-2,5-диона, которые в результате фотохимического окисления образуют производные индоло[2,3-а]фурано[3,4-с]карбазола. Обработка последних водным аммиаком в диметилформамиде дает возможность получить незащищенные гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов с различными заместителями в агликоне, а также различными углеводными остатками для сопоставления биологических свойств модифицированных соединений и выявления среди них наиболее активных [5].

Различные модификации природных и синтетических производных индолокарбазолов приводят к изменениям их физико-химических свойств и биологической активности, что важно для разработки соединений в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

В рамках настоящей работы изучена противоопухолевая активность 10 соединений в ряду N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, созданных в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, и проведен поиск наиболее эффективного соединения для его доклинического исследования.

1.2 Природные источники индолокарбазолов и их биологические свойства

Индол-содержащие метаболиты обнаружены у разных видов морских и наземных организмов.

Ряд индолокарбазолов содержится в актиномицетах (тип *Actinobacteria*), которые являются производителями большого количества природных соединений с различными видами биологической активности, в том числе противоопухолевой [44]. Стауроспорин был выделен из морских актиномицетов *Streptomyces sp.* [45]. Из *Streptomyces sp.* TP-A0274 и *S. longisporoflavus* клонирован кластер генов стауроспорина, 3 из которых кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе индолкарбазолового агликона, 8 – ферменты, участвующие в биосинтезе дезоксисахаров, 2 – белки, отвечающие за связывание агликона и дезоксисахаров и 1 – транскрипционный фактор [46; 47]. Два природных аналога стауроспорина 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин и 5'-гидроксистауроспорин выделены из *Micromonospora sp.* L-31-CLCO-002 [48]. N-формил- и N-карбоксамидо-стауроспорины содержатся в морской культуре *Streptomyces sp.* QD518 [49]. Из штамма *Actinomadura sp.* 007 получен еще один природный аналог стауроспорина ZHD-0501 [50].

В *Actinomadura melliaura* и *Nocardia aerocolonigenes* обнаружен другой индолокарбазол ребеккамицин и его родственные соединения AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1 и AT2433-B2 [51; 52]. Продуценты ребеккамицина (штамм ATCC 39243 и его кластерные мутанты) выделены из *Lechevalieria aerocolonigenes* [53; 54].

Помимо актиномицетов, индолокарбазолы обнаружены у слизевиков (миксомицеты *Arcyria ferruginea*, *Arcyria cinerea*, *Lycogala epidendrum*), цианобактерий (*Nostoc sphaericum*, *Tolypothrix tjipanasensis*, *Fischerella ambigua*) и морских беспозвоночных (личиночнохордовые, моллюски, плоские черви, губки). Как и в случае актиномицетов, для этих организмов характерно существенное разнообразие различных производных индолокарбазолов.

В миксомицетах *Arcyria cinerea*, *Lycogala epidendrum* содержатся цитотоксические вещества, представленные бисиндольными алкалоидами [6]. Из

Arcyria denudata выделены соединения содержащие индол[2,3-а]карбазольный хромофор — аркириафлавины А, В и С, а также бис(индол-3-ил)малеимиды — аркириарубины А, В и С структурно родственные индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолам. Установлено, что аркириафлавины и аркириарубины подавляют активность протеинкиназ, блокируя внутриклеточную передачу сигналов [55].

Разнообразные цианобактерии, распространенные в придонных частях Антарктических озер, широко используются для исследования и обнаружения новых антибиотиков и веществ, обладающих противоопухолевой активностью [56]. Фототрофные цианобактерии, или сине-зеленые водоросли, осуществляют фотосинтез с выделением молекулярного кислорода и могут фиксировать атмосферный азот. Показано, что они способны продуцировать индол-3-уксусную кислоту, которая синтезируется в процессе установления симбиотических отношений между цианобактерией и высшим растением [57; 58].

Имеются данные о противоопухолевой активности вторичных метаболитов морских беспозвоночных, в частности, индольных алкалоидов — активных цитостатиков из губок, оболочников и других моллюсков [7; 59]. β -карболин-алкалоиды из морских оболочников *Eudistoma olivaceum* и *Dendrodota grossulatia* известны своим антимикробным, антипаразитарным, противоопухолевым действием [60].

Некоторые морские алкалоиды активно используются в качестве химических инструментов для углубленного изучения механизмов функционирования основных клеточных белков и регуляторных ферментов, главным образом протеинкиназ и различных факторов транскрипции, которые принимают непосредственное участие в реализации таких важнейших биологических процессов, как деление, дифференцирование, апоптоз нормальных и опухолевых клеток [7]. Например, пиридоиндольный алкалоид из морских тропических губок *Fascaplysinopsis sp.* и *Smenospongia sp.* фаскаплизин — первый селективный ингибитор циклин-зависимой киназы 4, ключевого фермента клеточного цикла [8; 61].

Dragmacidin выделен из глубоководной губки *Dragmacidon* sp., topsentin из *Spongosorites ruetzleri* [62]. Из губки рода *Penares*, собранной в Южно-Китайском море, были получены два новых алкалоида: 7-бром-1-(6-бром-1H-индол-3-ил)-9H-карбазол и 3,11-дибром-13H-индоло[3,2-k]фенантридин. Установлено, что выделенные алкалоиды являются представителями новых структурных типов. Случаи выделения бромированных карбозольных алкалоидов из морских и наземных организмов крайне редки, а индоло[3,2-k]фенантридины не были ранее известны ни среди природных, ни среди синтетических алкалоидов [9].

Из почвенных бактерий *Nocardiosis* sp. в 1985 году [WO 97/38120] был выделен липофильный алкалоид К-252а, имеющий индолокарбазольный скелет [63]. Исследования показали, что К-252а ингибирует протеинкиназу С (PKC), которой принадлежит центральная роль в регуляции клеточных функций, и обладает активностью при ингибировании секреции серотонина [64]. К-252а тормозит передачу сигналов от фактора роста тромбоцитов (PDGF) [65], оказывает ингибирующее влияние на удлинение аксонов (нейронов) [66], подавляет высвобождение гистамина [67], проявляет ингибирующее действие на киназу легких цепей миозина MLCK (myosin light chain kinase) гладкой мускулатуры [68] и оказывает противовоспалительное действие [69]. Также установлено, что К-252а подавляет выработку интерлейкина-2 [70].

Индольные алкалоиды — глюкозинолаты, такие как глюкобрассицин и неоглюкобрассицин содержатся в растениях семейства крестоцветных (*Cruciferae*), или брассиковых (*Brassicaceae*) [71; 72]. Наиболее известные из них — употребляемые в пищу овощи (различные виды капусты, репа), масличные растения (рапс, горчица), пряно-вкусовые (хрен, васаби).

Следует отметить антиканцерогенные свойства глюкозинолатов и продуктов их расщепления [73-75]. Такими веществами являются индол-3-карбинол, аскорбиген и, образующийся из аскорбигена в организме, 5,1 1-дигидроиндоло[3,2-b]карбазол [76], который взаимодействует в клетке с арил-гидрокарбоновым рецептором (AhR). Этот комплекс активирует пул генов

ферментов цитохрома P-450, что усиливает дезактивацию ряда канцерогенов [10; 77; 78].

1.3 Антипролиферативная активность производных индолокарбазолов (результаты экспериментальных исследований)

Антипролиферативная активность установлена у различных производных индолкарбазола, стауроспорина и ребеккамицина [47; 79-81].

Цитотоксическая активность стауроспорина, 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорина и 5'-гидроксистауроспорина выявлена на культуре устойчивых к доксорубину клеток P388D1 (IC_{50} составила 0,01, 0,02 и 0,04 мкг/мл соответственно), клетках аденокарциномы легкого человека A549 (IC_{50} — 0,0005, 0,002 и 0,004 мкг/мл), рака толстой кишки HT-29 (IC_{50} — 0,02, 0,004 и 0,004 мкг/мл) и меланомы SK-MEL-28 (IC_{50} — 0,001, 0,002 и 0,004 мкг/мл). Стауроспорин продемонстрировал максимальную цитотоксичность на культурах клеток P388D1, A549 и SK-MEL-28, в то время как 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин и 5'-гидроксистауроспорин были максимально активны против HT-29 [48].

Цитотоксическая активность N-формил- и N-карбоксамидо-стауроспорина была изучена на панели из 37 культур клеток солидных опухолей человека, со средними значениями IC_{50} 0,063 и 0,016 мкг/мл [49]. ZHD-0501 ингибирует пролиферацию культуры клеток аденокарциномы легкого A549, гепатокарциномы BEL-7402, промиелоцитарного лейкоза HL60, лимфолейкоза мышей P388, карциномы молочной железы мышей tsFT210 путем задержки клеточного цикла в фазе G2/M [50].

K-252c (агликон стауроспорина) и аркириафлавин A способны индуцировать апоптоз клеток хронического миелолейкоза человека [82]. Установлено также, что K-252c и аркириафлавин A способны снижать резистентность клеток, трансфицированных ABCG2, к SN-38 (активному метаболиту ряда производных камптотецина) [83].

К-252а показал цитотоксическую активность на клеточных линиях глиобластомы человека U87 и T98G (IC_{50} составила 1170 нМ и 529 нМ, соответственно). Кроме того, К-252а индуцировал апоптоз клеток U87 в концентрации 1000 нМ [84].

СЕР-751 (КТ-6587) продемонстрировал уменьшение роста подкожно перевитых ксенографтов медуллобластомы D283 и трех клеточных линий нейробластомы IMR-5, NBL-S и CHP-134 с пограничным и высоким статистически значимым эффектом. Значительная разница в размерах нейродермальных опухолей наблюдалась у леченых и контрольных мышей с D283 на 39 день ($p=0,031$), с IMR-5 на 8-й день ($p=0,01$), с NBL-S на 17-й день ($p=0,016$) и с CHP-134 на 15-й день ($p=0,034$). Установлено, что воздействие СЕР-751 связано с ингибированием рецептора тирозинкиназы (TrkB) [85].

Другой мультикиназный ингибитор TrkB, СЕР-701 (или лестауртиниб) проявил активность в доклинических исследованиях на ксенографтах нейробластомы SY5Y. Так, лестауртиниб в монотерапии значительно ингибировал рост опухоли ($p=0,0004$) и усиливал противоопухолевую эффективность комбинации топотекана с циклофосфамидом ($p<0,0001$) или иринотекана с темозоломидом ($p=0,01$). Лестауртиниб в комбинации с бевацизумабом вызывал резкое торможение роста подкожных ксенографтов нейробластомы человека у иммунодефицитных мышей ($p<0,0001$), однако при этом усиливалось общетоксическое действие [86].

В настоящее время СЕР-701 применяется как мощный ингибитор рецепторной тирозинкиназы FLT3 в терапии больных острым нелимфобластным лейкозом с активирующими FLT3-мутациями [87].

Проводятся исследования по применению других производных стауроспорина в качестве лекарственного средства, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с неконтролируемой активностью рецепторной тирозинкиназы FLT3, и профилактической терапии лейкозов и миелодиспластических синдромов с целью предотвращения рецидива. Например, N-Benzoylstaurosporin (или мидостаурин) ингибировал пролиферацию клеток

Ba/F3-FLT-ITD, экспрессирующих мутантную FLT3 с «внутренней тандемной дупликацией» (ITD) в примембранном домене рецептора, и клеток Ba/F3-FLT-D835Y, экспрессирующих FLT3 рецептор, содержащий мутацию, в результате которой происходит замена аспарагина 235 на тирозин ($IC_{50} < 10$ нМ). Применение мидостаурина на этих клетках индуцировало остановку клеточного цикла в фазе G1 и апоптоз через 24-72 часа ко-инкубации. Показано, что производные стауроспорина подавляют активность рецепторной тирозинкиназы FLT3 при концентрации ингибитора от 0,01 до 1,0 мкМ [11].

Несколько потенциальных ингибиторов FLT3 было исследовано на клеточных культурах и в опытах на мышах. Мидостаурин (PKC412, или GGP41251) проявил антипролиферативную активность на панели из 29 клеточных линий солидных опухолей человека в диапазоне суб-микромольных значений IC_{50} [88; 89]. В условиях *in vivo* мидостаурин показал активность при индуцированном лейкозе мышей, продлевая латентный период до развития заболевания и увеличивая выживаемость животных [90].

Ингибиторы FLT-3, прежде всего производные стауроспорина, являются эффективными при лечении альвеолярной рабдомиосаркомы (aRMS), которая экспрессирует химерный гибридный белок PAX3/FKHR вследствие хромосомной транслокации t (2,13). Установлено, что PKC412 эффективно подавлял рост клеток aRMS *in vitro* и индуцировал апоптоз благодаря повышенной активности каспазы 3 [12].

Цитотоксическая активность VMY-41950, аналога стауроспорина из *Streptomyces hygroscopicus*, была исследована в сравнении с цисплатином и митомицином С на клеточных линиях меланомы мыши B16F10 (IC_{50} составила 0,98, 3,9 и 0,98 мкг/мл, соответственно) и раке толстой кишки человека HCT-116 (IC_{50} составила 0,24, 15,6 и 0,98 мкг/мл, соответственно). Противоопухолевая активность VMY-41950 была изучена на модели лимфолейкоза P-388 (мышь CDF₁) в суммарных дозах 10 и 30 мг/кг, и по увеличению продолжительности жизни мышей составила 125% и выше [91].

Установлено, что аналог 4'-N-бензоил стауроспорина CGP 41251 при введении перорально в дозе 75 мг/кг 3 раза в день в течение 9 дней на 36% увеличивал продолжительность жизни мышей с меланомой B16. CGP 41251 показал широкий спектр противоопухолевой активности на подкожно перевитых ксенографтах. Так, при введении перорально в дозе 200 мг/кг один раз в день в течение 4 нед, CGP 41251 на 58–80% ингибировал рост опухолевых клеток рака желудка (H-55), колоректального рака (H-26), рака молочной железы (H-31) и рака легкого (H-74 и LC-376) [92].

Аналоги стауроспорина оказывают повышенную селективность по отношению к ингибированию РКС. Известно, что протеинкиназа С высоко экспрессирована в клетках злокачественных опухолей, в том числе мультиформной глиобластомы. Ингибитор РКС bisindolylmaleimide Ro 31-8220 (синтетический аналог стауроспорина и K-252a [93]) был исследован на клеточных линиях глиобластомы U87 и A172. Показано, что Ro 31-8220 в концентрации 2,5 мкМ приводил к накоплению протеина p53, далее к фрагментации ДНК и апоптозу [94].

Ro 31-8220 и структурно родственные производные стауроспорина GF 109203X и Go 6976, которые также являются ингибиторами РКС [95], были протестированы на клеточной линии нейробластомы мыши Нейро-2А (N2A). Все три соединения индуцировали апоптоз в концентрации от 2 до 12 мкМ [96].

В экспериментальных исследованиях *in vitro* установлено и подтверждено *in vivo*, что производное индолокарбазола и ингибитор РКС Ro 32-0234 дозозависимо снижает плотность васкулярных каналов, сформированных опухолевыми клетками [97].

Карбазольный алкалоид clauszoline-I, выделенный из экстракта азиатского кустарника *Clausena vestita*, является ингибитором РКС δ (Ser643) и вызывает задержку клеточного цикла в фазах S и G2/M. Clauszoline-I ингибирует пролиферацию культуры опухолевых клеток печени человека HepG2 со значением IC₅₀ 15,8 мкМ, и оказывает минимальный цитотоксический эффект в отношении нормальных клеток печени линии LO2 [98].

Ингибитор РКСβ LY-317615 (известный как энзастаурин) впервые описан в 2003 году. Среди ациклических производных стауроспорина LY-317615 продемонстрировал $IC_{50} = 40-50$ нМ в отношении РКСβ1 и РКСβ2 изоферментов человека и селективно ингибировал РКСβ по сравнению с другими РКС (α , γ , δ , ϵ , λ и η) [99].

Цитотоксическая активность энзастаурина была исследована на панели из 60 клеточных линий солидных опухолей человека: лейкозах (K562 и MOLT-4), немелкоклеточном раке легких (A549, EKVX и HOP-92), раке ободочной кишки (COLO205, HCT116, KM12 и SW-620), опухолях центральной нервной системы (SF-295, SF-539 и U251), меланоме (LOXIMVI, M14, SK-MEL-5, SK-MEL-28 и UACC-257), раке яичников (OVCAR-3, OVCAR-4 и OVCAR-8), раке почки (CAKI-1), раке предстательной железы (PC-3) и раке молочной железы (MCF-7, NCI/ADR-RES и MDA-MB-435). Ингибитор РКСβ энзастаурин подавлял пролиферацию культивируемых опухолевых клеток и индуцировал апоптоз в диапазоне низких микромолярных концентраций. Наиболее чувствительны к энзастаурину оказались клеточные линии K-562, MOLT-4, HOP-92 и PC-3 [100; 101].

СЕР-5214 и его водорастворимый аналог СЕР-7055, воздействуя на рецепторы васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), оказывают мощный ингибирующий эффект на ангиогенез. СЕР-7055 в дозах от 11,9 до 23,8 мг/кг при пероральном применении на 50 – 90% ингибировал рост подкожно перевитых ксенографтов: меланомы A375, глиобластомы U251MG и U87MG, карциномы легких CALU-6, рака поджелудочной железы ASPC-1, карциномы ободочной кишки HT-29 и HCT-116, карциномы молочной железы MCF-7 и ангиосаркомы SVR [102].

Противоопухолевую эффективность СЕР-7055 исследовали на ксенографтах глиобластомы в сочетании с темозоломидом, и рака толстой кишки в сочетании с иринотеканом и оксалиплатином. При длительном пероральном приеме СЕР-7055 (23,8 мг/кг) в комбинации с темозоломидом наблюдали увеличение продолжительности жизни мышей с ксенотрансплантатами ортотопической

глиобластомы человека, чем при действии темозоломида в монотерапии (261 против 192 дней, соответственно, $p \leq 0,02$). CEP-7055 в комбинации с иринотеканом (20 мг/кг \times 5 дней, в/б), и в меньшей степени с оксалиплатином (10 мг/кг, в/в), показал снижение первичных метастазов карциномы толстой кишки и печени, чем при монотерапии иринотеканом или оксалиплатином [103]. Однако дальнейшее исследование было прекращено, так как CEP-7055 не проявил активности в ходе I фазы клинических испытаний [104].

Продолжение поиска антиангиогенных агентов среди аналогов CEP-7055 привело к созданию CEP-11981, который обнаружил ингибирующие свойства в отношении рецепторов Tie-2, FGF-R1 и VEGF-R 1, 2, 3 [105].

Оценка противоопухолевой эффективности CEP-11981 проводилась на ксенографтах меланомы A375 и мультиформной глиобластомы U251MG. Показано, что CEP-11981 был более эффективен в отношении меланомы. На данном этапе завершена I фаза клинических испытаний этого соединения [106].

Другое индольное производное 3-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (или MIPP) инициирует накопление вакуолей в цитоплазме культивируемых клеток U251MG в течение нескольких часов, и приводит к потере жизнеспособности клеток в течение 48 ч [107]. На основании полученных результатов авторы высказали предположение о новой форме гибели опухолевых клеток, так называемом «метуозис» (methuosis), при котором снижение метаболической активности клетки сопровождается характерной обширной вакуолизацией [108].

Создано несколько индольных аналогов MIPP, среди них 3-(5-methoxy, 2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (или MOMIPP) прошел исследования на клеточной линии мультиформной глиобластомы U251MG в сравнении с MIPP. IC_{50} для MOMIPP составила 1,9 мкМ, для MIPP — 4,8 мкМ [109].

Синтезированное индольное производное (5-Methoxy-1H-2-indolyl)-phenylmethanone и его аналоги продемонстрировали цитотоксическую активность в диапазоне IC_{50} от 20 до 75 нМ на клеточных линиях солидных опухолей

человека: карциноме шейки матки (HeLa/KB), карциноме яичников (SKOV3) и астроцитоме (U373). Антипролиферативная активность изучаемых агентов была отмечена одновременно с ингибированием полимеризации белка микротрубочек тубулина, что приводило к остановке митоза. (5-Methoxy-1H-2-indolyl)-phenylmethanone был активен при пероральном введении в дозе 200 мг/кг в экспериментах у бестимусных мышей с подкожно перевитой амеланоцитарной (беспигментной) меланомы человека MEXF989 [110].

7-метил индол-3-этил-изотиоцианат (7Me-IEITC) проявил цитотоксический эффект на клеточной линии рака эндометрия при $IC_{50} \sim 2,5-10$ мкМ. При исследовании терапевтического действия 7Me-IEITC на опухолевые клетки эндометрия установлено, что индукция апоптоза сопровождалась генерацией активных форм кислорода [111].

При испытании 7Me-IEITC на клеточных линиях нейробластомы (SMS-KCNR, SK-N-SH, SH-SY5Y и IMR-32) диапазон IC_{50} составил 2,5–5,0 мкМ. Действие 7Me-IEITC приводит к активации апоптоз-специфических протеаз — каспазы-3, -8 и -9, про-апоптотических киназ p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) и SAP/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase), преобразует активность киназы Akt в сигнальном каскаде для участия в индукции апоптоза в клетках нейробластомы линии SMS-KCNR [112].

Индол-3-карбинол (I3C, или 3-гидроксиметил индол) активней подавлял рост клеток рака молочной железы MDA MB468 ($IC_{50}=30$ мкМ), чем рост неопухолевых клеток HBL100 ($IC_{50}=120$ мкМ). При этом I3C индуцировал апоптоз в клеточной линии MDA MB468 и приводил к некрозу клетки линии HBL100. Индукция апоптоза происходила путем ингибирования фосфорилирования и активации протеинкиназы B (PKB) в антиапоптотическом сигнальном пути с участием фосфатидилинозитол 3'-киназы и протеинкиназы B (PKB)/Akt [113; 114].

На клеточных линиях рака толстой кишки человека HT29 и SW480 индол-3-карбинол ингибировал пролиферацию клеток путем задержки клеточного цикла в

фазе G2/M [115]. I3C снижал пролиферацию опухолевых клеток рака толстой кишки человека в концентрациях $>0,1$ мМ [116].

Индол-3-карбинол и сульфорафан (органическое соединение растительного происхождения) подавляли рост клеточной линии рака предстательной железы человека PC-3 в соответствующих концентрациях 0,2 мМ/литр и 0,02 мМ/литр [117].

На клеточной линии PC-3 установлено, что I3C в концентрациях от 25-100 мкМ индуцировал задержку клеточного цикла в фазе G1 и вызывал апоптоз. В условиях *in vitro* индол-3-карбинол дозо- и время-зависимо ингибировал рост андрогензависимых (LNCaP) и андрогеннезависимых (PC-3, DU145) клеточных культур рака предстательной железы человека. При этом подавлялась экспрессия стимуляторов клеточного цикла – циклинов и циклин-зависимых киназ и, напротив, повышался уровень белков-ингибиторов клеточного деления — p21, p27 [118; 119]. Важнейшим биологическим свойством I3C является способность данного соединения блокировать передачу пролиферативных сигналов в клетках андрогензависимого рака предстательной железы на самых первых этапах их реализации посредством ингибирования экспрессии андрогеновых рецепторов [120].

I3C продемонстрировал антиметастатическую активность в экспериментах *in vivo*. При предварительной инкубации вводимых животным опухолевых клеток с I3C, частота образования метастазов в легких уменьшалась в 8 раз (для опухолей, индуцированных гормонозависимыми клетками MCF-7) и в 4 раза (для опухолей, индуцированных гормонорезистентными клетками MDA MB468). При этом в контроле метастатическая активность гормонорезистентных опухолевых клеток превышала метастатическую активность гормоночувствительных опухолевых клеток в 2,5 раза [121].

В экспериментах на модели рака простаты при внутривенном или внутрибрюшинном введении животным индол-3-карбинола, повышение выживаемости экспериментальных животных достигало 75% по сравнению с 15%

в не леченом контроле. При этом метастазирование в легкие снижалось на ~ 90%, или ~ в 13 раз [122].

В ряду гликозидов индолокарбазолов известен противоопухолевый антибиотик ребеккамицин. Цитотоксическое действие ребеккамицина установлено на клеточных линиях солидных опухолей человека: аденокарциномы легкого A549, карциномы толстой кишки и назофарингеальной карциномы (IC_{50} в диапазоне от 0,4–98 мкМ). Дальнейшие исследования показали его активность в отношении меланомы В16 и лимфолейкозов Р388 и L1210, имплантированных мышам [123]. Исследования, направленные на улучшение растворимости ребеккамицина, привели к появлению его водорастворимых модифицированных аналогов [13]. Среди них 8-N-(диэтиламиноэтил) ребеккамицин проявил противоопухолевую активность в экспериментальном исследовании на лимфолейкозе Р388 мышей в дозах от 16 до 128 мг/кг путем внутрибрюшинного введения. Наилучший эффект был достигнут в дозе 64 мг/кг и по увеличению продолжительности жизни мышей, которым вводили 8-N-(диэтиламиноэтил) ребеккамицин, составил 165%. При самой высокой дозе испытания (128 мг/кг) токсичности не наблюдалось [124].

В процессе синтеза производных гликозидов индолокарбазолов и их цитотоксической оценки получен водорастворимый диэтиламиноэтил аналог ребеккамицина NSC 655649, позже известный как бекатекарин [125]. В лабораторных исследованиях была показана цитотоксическая активность бекатекарина в отношении клеточных линий Юинга, саркомы, медуллобластомы, нейробластомы и рабдомиосаркомы при концентрациях IC_{50} в диапазоне от 0,015 до 15,0 мкМ [126].

Из серии производных фторогликозилированных фториндолокарбазолов был отобран BMS-250749 с широким спектром противоопухолевой активности на ксенографтах опухолей человека и эффективный в терапии карциномы легких Lewis мышей. BMS-250749 по ингибирующему действию на топоизомеразу I превосходит СРТ-11 (иринотекан) [127].

Противоопухолевый антибиотик ВМУ-28175, продуцируемый путем ферментации из *Actinomadura verrucosospora*, ингибировал рост клеток мышинной карциномы легких М109, толстой кишки С26 и саркомы мышей М5076 при IC_{50} от 1,5 до 13,5 нг/мл. В экспериментальном исследовании *in vivo* ВМУ-28175 при внутривенном введении был активен на модели лейкозов мышей Р388 и L1210. ВМУ-28175 в 60% тестируемых образцов ингибировал рост первичной опухоли мышей с подкожно перевитой меланомой В16, увеличивая при этом продолжительность жизни животных. ВМУ-28175 подавлял рост ксенотрансплантата опухоли молочной железы человека МХ-1, вживленного под капсулу почки иммунодефицитных мышей. Оптимальная доза для ВМУ-28175 составляла от 0,16 мг/кг в режиме 9-кратного ежедневного введения или 51,2 мг/кг однократно [128].

Эдотекарин (J-107088, ранее ED-749) был изучен на перевиваемых подкожных ксенографтах у иммунодефицитных мышей: мультиформных глиобластомах D-456MG, D-245MG и прокарбазин-резистентной сублинии D-245MG/PR, медуллобластоме D-341MED и анапластической астроцитоме D-54MG. Наблюдали регрессию и значительное торможение роста D-245MG и D-456MG от 7,6 дней до 62,1 дней, соответственно, ($p < 0,001$). Результаты были сопоставимы с применяемыми в клинике известными ингибиторами топоизомеразы I иринотеканом (СРТ-11) и топотеканом [129].

Эдотекарин (edotecarin) был более эффективен, чем производные камтотецина, и обладал высоким ингибирующим действием на пролиферацию клеток при использовании в комбинации с другими агентами, тестируемыми *in vitro* против различных линий опухолевых клеток. Ciomei M. и соавторы охарактеризовали противоопухолевый эффект эдотекарина при использовании отдельно или в комбинации с 5-фторурацилом, иринотеканом, цисплатином, оксалиплатином и мультитаргетным ингибитором тирозинкиназы SU11248 на модели ксенотрансплантата рака толстой кишки человека НСТ-116. Во всех исследованиях эдотекарин был активен как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми агентами. Токсичность в опытах

была минимальной. Из 359 мышей, шесть животных погибли от токсичности в группе комбинации эдотекарина с оксалиплатином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эдотекарин может применяться в качестве эффективной химиотерапии рака толстой кишки при использовании стандартных режимов в сочетании с другими ингибиторами топоизомеразы или с новыми агентами, такими как SU11248 [130].

Ингибиторы топоизомеразы I, индолокарбазол BE-13793C и его производное ЭД-110, выделены из культивируемых актинобактерий *Streptoverticillium* [131]. BE-13793C показал ингибирующее действие на рост клеток лимфолейкоза мышей P388, устойчивых к винкристину (V) и адриамицину (ADR). Полумаксимальная ингибирующая концентрация BE-13793C составила 0,7 мкМ для клеток P388/V и 1,0 мкМ для P388/ADR [132-134].

ЭД-110 был изучен на клеточных линиях солидных опухолей человека: аденокарциноме желудка MKN-45, раке толстой кишки LS-180 и крупноклеточной карциноме легкого PC-13 со значениями IC_{50} 0,28 мкг/мл, 1,65 мкг/мл и 1,70 мкг/мл соответственно. На модели фибросаркомы Meth A, растущей подкожно у мышей линии Balb/c, ЭД-110 ингибировал рост спонтанных метастазов [135].

В экспериментах *in vivo* ЭД-110 проявил активность на перевиваемых лейкозах мышей P388, L1210 и L5178Y. На P388 ЭД-110 в дозах от 2,5 мг/кг до 160 мг/кг с 10-кратным ежедневным режимом введения на 25% увеличивал продолжительность жизни леченых животных в сравнении с не леченым контролем [136].

С целью улучшения растворимости было создано несколько аналогов ЭД-110. Среди них NB-506 проявил более мощный, чем ЭД-110, ингибирующий эффект в отношении топоизомеразы I на различных клеточных линиях и некоторых подкожно перевитых ксенографтах [137].

Изучая антипролиферативную активность NB-506 на солидных опухолях мышей BDF₁ и CD-1 при внутривенном (в/в) введении в дозе 300 мг/м², наблюдалось торможение роста саркомы M5076 и карциномы Эрлиха на 76 и

96%, соответственно. Кроме того, NB-506 в дозе 90 мг/м² в/в вызывал регрессию опухоли рака легких человека PC-13 и рака желудка человека MKN-45, подкожно имплантированных мышам BALB/c nude. NB-506 в дозе 300 мг/м² в/в также ингибировал рост опухолевых клеток рака толстой кишки человека HCT116 и LS 180, растущих в виде подкожных ксенографтов на иммунодефицитных мышах. Кумулятивная токсичность NB-506 была низкой, LD₅₀ одной инъекции и 10-ти повторных внутривенных инъекций мышам CDF₁ составила 990 и 810 мг/м² соответственно [138].

Эти результаты позволили предположить, что модификационные изменения в структуре 6-N-аминоаналогов NB-506 могут обеспечить лучшую противоопухолевую активность ингибиторов топоизомеразы I [139; 140].

Наряду с хорошо известными представителями класса индолокарбазолов, продолжаются исследования новых метаболитов в качестве противоопухолевых агентов. Так, изучение культивируемой цианобактерии *Fischerella sp.* (штамм SAG номер 46.79) привело к выделению четырех нитрил-содержащих индольных алкалоидов: 12-эпи-фишериндол I-нитрила (I R=Cl), дехлор-I (II R=H), 12-эпи-фишериндол W-нитрила (III R=Cl) и дехлор-III (IV), наряду с известным метаболитом гапалосином (V). Изучена цитотоксическая активность соединений I-V в отношении линий раковых клеток человека и ингибирование 20S протеасомы. Соединение II проявило слабый цитотоксический эффект на клеточной линии рака толстой кишки HT-29 со значением ED₅₀ 23 мкМ, а соединение V — в отношении клеток HT-29 и рака молочной железы MCF-7 со значениями ED₅₀ 22 и 27 мкМ соответственно, а также умеренное ингибирование 20S протеасомы со значением IC₅₀ 12 мкМ [141].

Из двух культивируемых цианобактерий *Westiellopsis sp.* и *Fischerella muscicola* получены 3 алкалоида (I-III), структуры которых подтверждены спектральными данными. В испытаниях *in vitro* соединения I-III показали цитотоксическую активность от слабой до умеренной на клеточных линиях HT-29, MCF-7, рака легких NCI-H460 и глиобластомы SF268 [142]. Выделенные из губки *Penares sp.* индоло[3,2-k]фенантридины проявили умеренную

цитотоксическую активность на клеточных линиях промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 и рака шейки матки HeLa [143].

Таким образом, открытие ряда биологических активностей у природных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов привело к поиску и созданию их синтетических аналогов и низкомолекулярных производных, представляющих терапевтически важный класс противоопухолевых средств с меньшими токсическими свойствами. К настоящему времени накоплена обширная база данных об антипролиферативной активности индолокарбазолов различной химической структуры, позволяющая считать соединения этого класса перспективными для дальнейшего изучения. Одновременно следует отметить, что в ряде работ предложены различные подходы к химической модификации соединений указанного класса, позволяющие повысить их противоопухолевый эффект.

1.4 Антипролиферативная активность производных индолокарбазолов (результаты клинических исследований)

Различные производные индолокарбазолов были изучены в клинических исследованиях в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Среди наиболее хорошо исследованных препаратов следует выделить аналоги стауроспорина — мидостаурин, энзастаурин, UCN-01 и CEP-701, а также аналоги ребеккамицина, обладающие способностью ингибировать топоизомеразы I и II, такие, как бекатекарин (RA), NSC 655649, эдотекарин.

В 2005 году получены результаты первого клинического исследования эффективности применения мидостаурина. В исследование были включены 20 пациентов с рецидивом острого нелимфобластного лейкоза, или с рефрактерностью к ранее проведенной химиотерапии. У 18 больных обнаружена активация FLT3/ITD, у 2 — мутации в киназном домене FLT3. У 14 из 18 больных цитогенетическое исследование показало нормальный кариотип. Препарат назначали внутрь по 75 мг 3 раза в день. Лечение отменили 8 пациентам из-за негематологической токсичности (гипербилирубинемия) или осложнений

(бронхопневмония). У 14 из 20 больных после месячного лечения достигнуто более чем 50% уменьшение числа бластных клеток в периферической крови, у 6 больных наблюдали их полное исчезновение от 9 до 47 недель (средняя продолжительность ответа —13 недель), и на 50% снижение числа бластных клеток в костном мозге. У 3 больных констатирована полная ремиссия, но при сниженной клеточности костного мозга [144].

Дальнейшее изучение мидостаурина позволило использовать его для лечения пожилых пациентов с диагнозом острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) при наличии FLT3 мутации (обнаруживается в 35% случаев заболевания) [145; 146]. Начиная с 30-го дня после трансплантации гемопоэтических клеток, пациенты получали мидостаурин перорально 2 раза в сутки с 1 по 28-й дни. Лечение повторялось каждые 28 дней до 12 курсов при отсутствии прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. После завершения лечения пациенты находились под наблюдением в течение 30 дней и до 1 года [147]. К настоящему времени мидостаурин достиг третьей фазы клинических испытаний в терапии ОМЛ в сочетании с даунорубицином и цитарабином [148].

Эффективность мидостаурина была также показана при лечении пациентов с желудочно-кишечными стромальными опухолями с мутациями KIT T6701, V454A и PDGFR α D842V, обуславливающими устойчивость к иматинибу [14].

Результаты II фазы клинического испытания энзастаурина в сочетании с цитостатическими лекарственными препаратами оказались оправданными в лечении метастатического немелкоклеточного рака легких (III и IV стадии). В исследование были включены 55 пациентов от 44 до 82 лет, из них 55% пациентов мужского и 45% пациентов женского пола. 78% больных имели IV стадию заболевания. Самым распространенным диагнозом была аденокарцинома (65%). Режим системного лечения состоял из одной или более схем химиотерапии на основе производных платины и 500 мг энзастаурина перорально один раз в день. До лечения лучевую терапию получали 73% пациентов, а ингибиторы тирозинкиназы эпидермального фактора роста — 29% пациентов. Медиана

выживаемости без прогрессирования (ВБП) составила 1,8 мес (95% ДИ от 1,7 до 1,9 мес). Медиана общей выживаемости (ОВ) достигла 8,4 мес (95% ДИ от 6,0 до 13,6 мес). Шесть месяцев ВБП соответствовали 13% (95% ДИ 3,9% до 21,5%). ОВ за 12 мес составила 44% (95% ДИ 30,5% до 57,3%). Из 55 пациентов у 19 (35%) была отмечена стабилизация. Выживаемость без прогрессирования составила 6 мес у 7 (13%) пациентов, из них у 3 — более 10 мес. Из побочных реакций у 17 пациентов наблюдались утомляемость и головная боль. Токсичность выражалась в единичных случаях тромбоэмболией, атаксией и анемией [149].

I фаза клинического исследования эффективности комбинации энзастаурина и темозоломида проведена у 28 пациентов с рецидивом глиобластомы или впервые диагностированным заболеванием. Пациенты получали стандартную дозу темозоломида (200 мг/м² в течение 5 дней каждые 4 недели) и ежедневно перорально энзастаурин. Были исследованы три уровня доз энзастаурина: 250 мг и 500 мг однократно, и 250 мг 2 раза в сутки. Дозу ограничения токсичности определяли в течение первых двух циклов, но лечение продолжали до выявления усугубления токсичности или прогрессии заболевания. В дозах 250 мг или 500 мг однократно токсичности не наблюдалось. Тем не менее, при дозировке 250 мг 2 раза в сутки, было отмечено 2 случая тромбоцитопении. Поэтому рекомендуемая доза для энзастаурина в комбинации со стандартной 4-недельной схемой применения темозоломида составила 500 мг однократно [150].

Оценена эффективность комбинации энзастаурина и бевацизумаба при рецидивах злокачественных глиом у 81 пациента: 40 больных с мультиформной глиобластомой (GBM) и 41 — с анапластической глиомой. Пациенты получали энзастаурин в разовой нагрузочной дозе 1125 мг, затем в поддерживающей дозе по 500 мг или 875 мг ежедневно в зависимости наличия или отсутствия у пациентов эпилептических приступов, соответственно. Признаки эпилептиформной активности определялись на электроэнцефалограмме. Бевацизумаб вводили в дозе 10 мг/кг внутривенно каждые 2 нед. Циклы повторяли каждые 4 нед. Медиана общей выживаемости составила 7,5 мес для

больных мультиформной глиобластомой и 12,4 мес для пациентов с анапластической глиомой, медиана безрецидивной выживаемости — 2,0 мес и 4,4 мес, соответственно. Из группы пациентов с GBM 3/40 (7,5%) больных не ответили на лечение, 8/37 (22%) имели частичный или полный ответ и у 20/37 (54%) достигнута стабилизация в течение 2 мес. Из 39 пациентов с анапластической глиомой 18 (46%) показали объективный ответ и 16 (41%) проявили стабилизацию эффекта в течение 2 мес. Токсичность была выражена лимфопенией (15%), гипофосфатемией (8,8%) и тромбообразованием (7,5%). Как отметили авторы исследования, энзастаурин в комбинации с бевацизумабом при рецидивах злокачественных глиом хорошо переносится, выживаемость пациентов соответствовала лучшим результатам клинических исследований других новых препаратов [151].

7-гидроксипроизводное стауроспорина UCN-01 прошёл II фазу клинических испытаний в лечении гемобластозов, солидных опухолей, меланомы и мелкоклеточного рака легких, однако дальнейшие клинические исследования UCN-01 были затруднены из-за его высокого связывания с белками плазмы человека [152].

СЕР-701 (или лестауртиниб), являясь ингибитором FLT3, показал эффективность при монотерапии в дозе 60 мг перорально 2 раза в сутки у пациентов с рецидивом или рефрактерным к терапии острым миелобластным лейкозом [153]. II фаза клинических испытаний СЕР-701 проведена у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями. В исследование были включены 22 пациента с первичной или рецидивирующей истинной полицитемией/эссенциальной тромбоцитемией с мутацией JAK2 (JAK2V617F). СЕР-701, обладающий ингибирующей активностью в отношении киназы JAK2, продемонстрировал общий показатель ответов 27% при средней продолжительности жизни 14 месяцев. Основные осложнения у пациентов включали миелосупрессию (анемия 14%, тромбоцитопения 23%) и желудочно-кишечные расстройства (диарея 72%, тошнота 50%, рвота 27%) [154].

Проведена оценка эффективности применения CEP-701 в комбинированной терапии с камптотецином при рефрактерной нейробластоме. У детей с рефрактерной нейробластомой препарат в дозе 120 мг/м^2 2 раза в сутки переносится без гематологической токсичности и усиливает противоопухолевую эффективность химиотерапии [155].

Аналог ребеккамицина бекатекарин прошел I-II фазу клинических испытаний в монотерапии при раке легкого. При рецидивах мелкоклеточного рака легкого бекатекарин вводили пятикратно в дозе 140 мг/м^2 в течение 5 дней, всего до 5 циклов. Из 20 пациентов у 2 (10%) была отмечена частичная ремиссия, у 6 (30%) — стабилизация заболевания, что позволило достичь общего контроля роста опухоли в 40%. Медиана выживаемости без прогрессирования составила 2 мес, медиана выживаемости — 6,7 мес (95% ДИ, 3,3-8,0 мес.). Нейтропения или тромбоцитопения IV степени были отмечены у 23% или 14% пациентов соответственно. Авторами исследования был сделан вывод о том, что бекатекарин обладает умеренной эффективностью при мелкоклеточном раке легкого и управляемой токсичностью, однако не имеет значительных преимуществ по сравнению с существующими препаратами [156].

При немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) было изучено два режима введения бекатекарина во второй линии химиотерапии. 42 пациента были рандомизированы в две группы: однократное введение 500 мг/м^2 1 раз в 3 нед или пятикратное введение 140 мг/м^2 1 раз в сутки с повторением цикла через 3 нед. Частота стабилизаций составила 52 и 37% в двух группах, соответственно. Медиана выживаемости и однолетняя выживаемость составили 5,6 мес и 33%, 9,7 мес и 42%, соответственно. Несмотря на отсутствие ремиссий после лечения, высокая частота стабилизации и однолетняя выживаемость были сопоставимыми с другими изучаемыми режимами второй линии химиотерапии НМРЛ [157].

Особый интерес был связан с лечением бекатекарином опухолей желчевыводящего тракта, поскольку он выделяется печенью с достижением концентрации в желчи, превышающей концентрацию в плазме крови более чем в 100 раз. Так, в I-II фазе клинических исследований бекатекарин

продемонстрировал эффективность у пациентов с опухолями желчного пузыря и желчевыводящего протока. Из 46 пациентов у 2 были отмечены частичные ремиссии, и у 16 — стабилизация заболевания. Медиана выживаемости составила 6,3 мес. Снижение уровня онкомаркера СА19.9 более чем на 20% было отмечено у 20% пациентов из числа пациентов с исходно повышенными уровнями. Нейтропения или тромбоцитопения IV степени были отмечены у 35% и 5% пациентов, фебрильная нейтропения — у 16% пациентов [158].

Бекатекарин (или NSC 655649) проявил цитотоксическую активность *in vitro* в отношении клеток различных опухолей у детей, включая рабдомиосаркому, нейробластому, саркому Юинга и медуллобластому, что послужило основанием для его изучения при этих опухолях у детей. Препарат вводили в дозе 650 мг/м² каждые 3 нед, с возможным увеличением дозы до 780 мг/м² при повторных циклах, для достижения максимальной концентрации в плазме крови >5 мкг/мл. Всего в исследование было включено 126 пациентов, из которых только 4 продемонстрировали объективный ответ: 3 пациента с рабдомиосаркомой (1 полная ремиссия и 2 частичные ремиссии) и 1 пациент с нейробластомой (частичная ремиссия). Миелосупрессия III или IV степени была отмечена после 81% курсов, признаки гепатотоксичности — после 14% курсов. Транзиторный панкреатит или повышение активности амилазы и липазы зафиксированы у 6 пациентов. Таким образом, эффективность препарата NSC 655649 при солидных опухолях у детей была оценена исследователями как низкая при высокой гематологической токсичности [159].

У пациенток с рефрактерным к химиотерапии распространенным раком молочной железы были изучены различные режимы введения NSC 655649: 500 мг/м² в виде внутривенного болюса 1 раз в 21 день, или 140 мг/м² внутривенно в течение 5 дней каждый 21 день (по 21 пациентке в каждой группе). До включения в исследование пациентки получали антрациклиновые антибиотики (88% пациенток), таксаны (67% пациенток) и схемы химиотерапии на основе фторурацила (50% пациенток). Всего было отмечено 5 частичных ремиссий (эффективность 12%), 2 в случае однократного болюсного введения и 3 при

пятикратном введении NSC 655649, все у пациенток с адьювантной химиотерапией с антрациклиновыми антибиотиками в анамнезе. Медиана времени до прогрессирования составила 2,1 месяца. У 9 пациенток была отмечена стабилизация. Анемия, нейтропения или тромбоцитопения III-IV степени были зафиксированы у 5, 33 и 12%, соответственно, переливание компонентов крови потребовалось 14% пациенткам. Спектр токсических эффектов между группами не отличался. Эффективность терапии была оценена исследователями как умеренная, но значимая, с учетом предшествующих циклов химиотерапии [160].

При распространенном почечно-клеточном раке применение NSC 655649 дало 2 частичных ремиссии (2/24, 8%) и 11 стабилизаций (46%). Наиболее существенными признаками токсичности была миелосупрессия (38% пациентов, III-IV степени) и анемия (33%). 30% больных со стабилизацией прожили без признаков прогрессирования 6 мес. Медиана выживаемости для всех пациентов составила 10 мес, однолетняя выживаемость 39% [161].

При метастатическом колоректальном раке NSC 655649 оказался практически неэффективным: объективных ответов отмечено не было, у 3 из 13 пациентов была зафиксирована стабилизация. Медиана времени до прогрессирования составила 8 недель [162].

В отдельных исследованиях I и II фазы показан синергизм производных ребеккамицина и других противоопухолевых препаратов. Так, бекатекарин продемонстрировал эффективность в сочетании с оксалиплатином при различных опухолях, рефрактерных к стандартной терапии (n=17) [163]. NSC 655649 при многократном применении может быть использован с цисплатином: у 20 пациентов с различными солидными опухолями сочетание NSC 655649 и цисплатина хорошо переносилось при использовании в дозах 440 и 50 мг/м² при отсутствии фармакокинетического взаимодействия [164].

Ингибитор топоизомеразы I эдотекарин в комбинации с 5-фторурацилом (5-ФУ) проявил аддитивный противоопухолевый эффект на клеточной линии рака ободочной кишки человека (HCT-116), что определило ход дальнейших клинических испытаний эдотекарина для установления МПД и исследований его

комбинации с 5-ФУ и лейковорином (ЛВ) у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями. Группы состояли из 3–6 пациентов, которые были последовательно включены во все более высокие уровни доз эдотекарина, вводимые в виде 1-часовой внутривенной инфузии каждые 2 нед. Начальная доза эдотекарина составляла 6 мг/м^2 в сочетании с 200 мг/м^2 лейковорина внутривенно в течение 2 ч с последующим болюсом фторурацила 400 мг/м^2 и с 46-часовой непрерывной инфузией фторурацила 2400 мг/м^2 . 14 пациентов (10 мужчин и 4 женщины) прошли в общей сложности 90 курсов химиотерапии (3–18 циклов). Дозолимитирующие токсические эффекты наблюдались у 5 из 14 получавших лечение пациентов. Все ограничения по токсичности были связаны с нейтропенией. Применение инфузионного режима комбинированной химиотерапии эдотекарина с фторурацилом/лейковорином 1 раз каждые 14 дней, даже без болюсного введения фторурацила, не приводило к восстановлению показателей крови у пациентов. Были исследованы только две дозы эдотекарина 6 и 8 мг/м^2 . Максимальная переносимая доза не установлена. Из 14 пациентов 7 проявили стабилизацию, у одного пациента с гепатоцеллюлярной карциномой достигнут подтвержденный полный ответ [165].

Эдотекарин в комбинации с темозоломидом, кармустином или ломустином был изучен в IV фазе клинических исследований у пациентов с прогрессирующей, или рецидивирующей после хирургического вмешательства и химиолучевой терапии мультиформной глиобластомой [166]. В настоящее время проводится клиническое исследование эдотекарина с учетом эскалации дозы и изучение эффективности комбинации эдотекарина и цисплатина у взрослых пациентов с прогрессирующими солидными опухолями (IV стадия рака пищевода, IV стадия рака желудка) [167].

Эдотекарин проходит II фазу клинических испытаний у женщин с метастатическим раком молочной железы, рефрактерным к терапии антрациклинами и/или таксанами. Критериями эффективности применения эдотекарина при в/в введении станет оценка побочных реакций препарата, определение частоты происхождения осложнений после химиотерапии и

проведение фармакокинетического анализа исследуемого препарата и продуктов его распада при выведении из крови [167].

1.5 Возможные механизмы противоопухолевого действия производных индолокарбазолов

Современные требования, предъявляемые к исследованию новых лекарственных препаратов, способных оказывать влияние на процессы жизнедеятельности опухолевой клетки, предполагают изучение механизмов их действия на внутриклеточные мишени. Идентификация молекулярных мишеней и изучение их взаимодействия с исследуемыми препаратами является важным этапом в создании высокоактивных соединений производных индолокарбазолов как противоопухолевых средств.

У производных индолокарбазолов обнаружен широкий спектр различных биологических эффектов, включая фунгицидное, гипотензивное действие и способность ингибировать протеинкиназы [168]. Из наиболее значимых эффектов действия на клетки млекопитающих необходимо выделить способность индолокарбазолов ингибировать ряд протеинкиназ, эукариотические ДНК-топоизомеразы и связываться с ДНК. Следует отметить, что классические киназные ингибиторы имеют минимальную молекулярную основу, определяющую биологическую активность соединения, называемую фармакофором, в котором соседние ароматическая аминогруппа и ароматический азот или кислород карбонильной группы образуют пару координированных водородных связей с шарнирной областью киназного домена (АТФ-связывающий участок), имитируя водородные связи молекулы АТФ.

Стауроспорин стал одной из первых молекул, использованных в качестве фармакофорной основы для моделирования идеальной структуры ингибиторов протеинкиназ [169]. Возможность использования моделирования фармакофора позволила синтезировать высокоспецифичные ингибиторы целого ряда протеинкиназ, включая протеинкиназу С (PKC), циклинзависимые киназы,

киназы, связанные с G-протеином, тирозинкиназы и белок pUL97 цитомегаловируса [170].

Учитывая, что экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 регулируется PKC-зависимым путем сигнальной трансдукции, ингибиторы PKC могут снижать экспрессию Р-гликопротеина в резистентных опухолевых клетках и тем самым повышать их чувствительность к химиотерапии [171]. Исследования, выполненные *in vitro* и *in vivo*, показали, что селективный ингибитор протеинкиназы 7-гидроксистауроспорин UCN-01 повышает противоопухолевую активность митомицина С и карбоплатина за счет усиления апоптоза, индуцируемого химиотерапевтическими агентами [41; 172].

PKC активирует гликопротеины, участвующие в выбросе лекарственных веществ из клетки и определяющие множественную лекарственную устойчивость опухолей. Кроме того, активация PKC необходима для ангиогенеза опухоли [173]. К настоящему времени идентифицировано большое количество про- и антиангиогенных факторов, а также их рецепторов и путей сигнальной трансдукции. Все они могут быть мишенями для терапии. Многие из этих факторов связаны с тирозинкиназной активностью. Являясь клеточными рецепторами VEGF, тирозинкиназы инициируют процесс ангиогенеза [174]. Производное карбазола CEP-5214 и его водорастворимый аналог CEP-7055 оказались мощными ингибиторами VEGF, инактивируя при этом внутриклеточные тирозинкиназы и нарушая каскад фосфорилирования, что задерживает пролиферацию эндотелиальных клеток и тормозит рост новых сосудов [102].

Активация регуляторных белков (циклинов) на разных стадиях клеточного цикла происходит с образованием комплекса с циклоспецифичной циклинзависимой киназой CDK1. Блокирование киназ приводит к остановке клеточного цикла. Среди индолокарбазолов способность ингибировать циклинзависимые киназы 1 и 2 проявили стауроспорин и его 7-гидроксианалог UCN-01 [175].

Другой производный аналог стауроспорина РКС-412 (мидостаурин) относится к агентам, ингибирующим внутриклеточную тирозинкиназу FLT3. Как известно, FLT3-киназа экспрессирована на тех же стволовых CD34⁺ кроветворных клетках, на которых определяется высокий уровень экспрессии фактора стволовых клеток (c-kit) [176]. Однако следует отметить, что мидостаурин не имеет узконаправленного действия. Угнетая активность c-kit, мидостаурин ингибирует рецепторные тирозинкиназы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR), отвечающие за пролиферацию и рост клеток [145].

Ациклический бисиндолмалеимид энзастаурин (LY-317615), разработанный в качестве мощного и селективного АТФ конкурентного ингибитора РКСβ, инициирует гибель опухолевых клеток путем подавления пролиферативной активности и ингибирует процесс опухоль-индуцированного ангиогенеза [177].

Энзастаурин, при клинически нетоксичных концентрациях, индуцирует апоптоз и влияет на передачу сигналов киназы Akt [178]. Необходимо отметить, что РКС способствует активации PI3K/Akt-сигнального внутриклеточного пути, интегрирующего митогенные и антиапоптотические стимулы. PI3K (фосфатидилинозитол 3-киназа) является одним из важнейших регуляторных белков, находящихся на пересечении разных сигнальных путей и контролируемых ключевые функции клетки. PI3K/Akt путь вовлечен в рост и выживание гематологических злокачественных новообразований, и ингибирование этого пути рассматривается в качестве терапевтической мишени [179].

Другие производные индолокарбазолов – ребеккамицин и его аналоги способны эффективно подавлять активность топоизомераз - ядерных ферментов, отвечающих за образование разрывов в цепи ДНК в процессе репликации и транскрипции. Ингибиторы топоизомеразы I вызывают обратимые нарушения отдельных нитей ДНК. Химиотерапевтические агенты, подавляющие активность топоизомеразы II, приводят к обратимым нарушениям разрыва двойных нитей. Ингибиторы топоизомеразной активности стабилизируют ДНК-топоизомеразный

комплекс, делая клетку неспособной к синтезу ДНК, и являются эффективными индукторами апоптоза [180].

Ребеккамицин и его водорастворимый аналог бекатекарин (NSC-655649) интеркалируют в ДНК, ингибируют связь топоизомеразы I и II с местом расщепления ДНК, предотвращая дальнейшие действия в каталитическом цикле, и инициируют апоптоз [181].

К эффективным ингибиторам топоизомеразы I относится эдотекарин (J-107088), который образует стабильный комплекс ДНК – топоизомераза I, что приводит к нарушению синтеза ДНК [182].

Индолокарбазолы ЭД-110 и NB-506, воздействуя на ДНК-зависимые топоизомеразы опухолевой клетки, нарушают структуру двойной спирали, и, препятствуя репарации разрывов, активизируют накопление поврежденных молекул ДНК, вызывая гибель клетки [131; 140].

Из представленных в настоящей работе производных индолокарбазолов, подробно изучен механизм противоопухолевого действия арабинопиранозила ЛХС-1006 [15].

Внутриклеточной мишенью для индолокарбазола ЛХС-1006 является двухцепочечная ДНК. Количественный расчет констант связывания ЛХС-1006 с ДНК позволил установить, что соединение образует два типа комплексов с высокой и низкой константой связывания. Так, при взаимодействии индолокарбазола с нативной ДНК формируется комплекс с высокой константой связывания с двуспиральной ДНК ($K^1 = 60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Анализ сайт-специфичности связывания показал, что предпочтительными для ЛХС-1006 являются пары GC, что также характерно для углеводных производных индолокарбазола. Эти участки представлены местами первоначального связывания ЛХС-1006 и образования высокоаффинных комплексов с нативной ДНК (~20% всех мест связывания). С возрастанием концентрации лиганда и заполнением этих участков формируются более слабые комплексы. При насыщении мест связывания молекулами ЛХС-1006 на каждые две пары оснований приходится одна молекула лиганда, с меньшей константой связывания [183].

Встраивание молекулы индолокарбазола ЛХС-1006 между основаниями нуклеиновых кислот способствует раскручиванию двойной спирали ДНК и вносит изменения в ее конформацию. Такие изменения могут приводить к ингибированию комплекса ДНК – топоизомеразы I, блокированию матричных синтезов и активации сенсоров повреждений ДНК, в том числе p53, что инициирует программированную клеточную гибель (апоптоз).

Так как фиксация комплекса ДНК – топоизомеразы I является характерной для ряда индолокарбазолов, авторами исследовательской работы был проведен анализ действия ЛХС-1006 на релаксацию суперскрученной ДНК в бесклеточной системе. Ингибирование 50% реакции релаксации суперскрученной ДНК обнаружено при концентрации ЛХС-1006 ~ 2 мкМ, полное ингибирование активности топоизомеразы I наблюдалось при концентрации 5 мкМ. Для других производных индолокарбазолов было показано, что ингибирование активности топоизомеразы I происходило на этапе сшивки нитей ДНК, что приводило к образованию множества одноцепочечных разрывов ДНК при репликации. Блокирование репликации исследовали по включению ³H-тимидина клетками линии рака толстой кишки НСТ-116. По полученным данным ЛХС-1006 эффективно ингибировал репликацию в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мкМ уже в течение 3 часов [184].

Следует отметить, что повреждение ДНК и ингибирование репликации вызывает активацию АТМ и АТР киназ с последующей активацией каскада ответа на ДНК повреждение (в том числе стабилизацию и активацию p53 chk1 и chk2, p21 и т.д.), блокирование прохождения клеток по клеточному циклу и индукцию апоптоза [185; 186].

Результатами взаимодействия ЛХС-1006 с ДНК являются нарушение конформации дуплекса, снижение активности топоизомеразы I и p53-зависимая трансактивация генной транскрипции. Так, p53-зависимая активация транскрипции была изучена на сублинии НСТ-116, стабильно трансфицированной плазмидой с репортерным геном, находящимся под контролем p53-зависимого промотора. При обработке клеток препаратом активация p53 возрастала до

трехкратного увеличения экспрессии репортерного гена при концентрации 1 мкМ, а затем падала до уровня, составляющего половину от контрольного. Необходимо отметить, что такое падение типично для агентов, связывающихся с ДНК, таких как цитарабин, митоксантрон, этопозид, доксорубицин, и может быть связано с ингибированием транскрипции при увеличении концентраций или невозможности для p53 связаться со своими респонсивными элементами в промоторе. В установлении значимости p53 для цитотоксичности, авторы проводили сравнение гибели клеток в МТТ-тесте для линии НСТ-116 с диким типом гена TP53 и делецией этого гена (НСТ-116p53КО). Полученные различия между кривыми гибели не превышали погрешность метода, что определило второстепенную роль p53 в цитотоксичности ЛХС-1006. Это могло быть обусловлено ролью ингибирования активности топоизомеразы I в цитотоксичности, так как в ряде исследований показано, что ингибиторы топоизомеразы I могут вызывать активацию апоптоза независимо от статуса p53 в клетке [187].

Ингибирование репликации, повреждение ДНК, активация p53 могут приводить к блокированию клеток в одной или нескольких фазах клеточного цикла и запуску запрограммированной клеточной гибели. Анализ распределения клеток по фазам цикла показал, что увеличение концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 приводило к увеличению количества клеток с деградацией ДНК (до максимума 70% при наиболее высокой изученной концентрации). При этом цитотоксическое действие ЛХС-1006 сопровождалось фрагментацией ядерного материала у большинства клеток. Количество клеток в G1- и S-фазах стабильно падало при увеличении концентрации. Процент клеток, находящихся в G2/M фазе незначительно возрастал до максимума в 42% при концентрации 1 мкМ, а затем резко снижался при дальнейшем увеличении концентрации. Предположительно, блокирование клеток в G2/M фазе может предотвращать клеточную гибель, которая происходит в других фазах цикла. При этом уменьшение процента клеток в G2/M фазе происходит в тех же концентрациях, что и падение p53-зависимой транскрипции, что может свидетельствовать о важности этого механизма для блокирования клеток в G2/M фазе при действии индолокарбазола ЛХС-1006.

Другой причиной уменьшения количества клеток в этой фазе цикла может служить ингибирование транскрипции, и соответствующего уменьшения экспрессии белков необходимых для блока митоза. Также возможно, что при увеличении концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 происходит ингибирование других внутриклеточных мишеней, что вызывает гибель клеток в G2/M фазе [16].

ЛХС-1006 эффективно воздействует на клетки рака молочной железы с делецией каспазы 3 (MCF-7), подтверждая, что апоптоз не является единственным индуцируемым видом гибели при действии ЛХС-1006. Таким образом, делеции генов, контролирующих процесс апоптоза, не блокируют гибель клеток, обработанных индолокарбазолом, что является важным свойством вещества как потенциального средства для химиотерапии [17].

По результатам морфологического анализа при действии ЛХС-1006 в клетках HCT-116 отмечаются фрагментированные ядра, а также формирование апоптотических телец. Это согласуется с данными, полученными с помощью анализа плоидности и изучения характера деградации ДНК в вышеописанных экспериментах, и подтверждает, что основным типом клеточной гибели является апоптоз.

Итак, механизмы гибели клеток при действии ЛХС-1006 включают ингибирование пролиферации, остановку клеточного цикла и активацию апоптоза. Эти механизмы проявляются в зависимости от концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 и его взаимодействия с конкретными внутриклеточными мишенями.

Таким образом, непосредственными мишенями производных индолокарбазолов могут служить топоизомеразы I и II, серин-треониновые протеинкиназы, протеинкиназа C, связанная с G-протеином и Р-гликопротеином, Akt и PI3K киназы, циклинзависимые киназы 1 и 2, тирозинкиназа FLT3. Вместе с тем, ингибирование этих киназ не всегда достаточно для реализации цитотоксичности, тогда как не только антипролиферативный эффект, а именно индукция гибели существенна для элиминации опухолевых клеток.

Кроме того, действие индолокарбазолов может стимулировать дополнительные механизмы, например, вакуолизацию цитоплазмы, связанную с активацией вакуолярной АТФазы. Так, отличительной особенностью гибели клеток при действии ЛХС-1006 является фенотип вакуолизации цитоплазмы, связанный с быстрым расширением лизосомального компартмента в результате активности вакуолярной АТФазы [15].

Следует добавить, что установление механизмов гибели опухолевых клеток при действии индолокарбазолов необходимо для поиска производных этого ряда соединений, обладающих оптимальной противоопухолевой активностью при минимальной токсичности.

1.6 Рациональные подходы к созданию новых противоопухолевых препаратов на основе производных индолокарбазолов

Химическая структура противоопухолевого цитотоксического вещества должна обеспечивать препарату, как правило, три основных свойства. Во-первых, он должен обладать благоприятной фармакокинетикой, то есть при введении в организм концентрироваться главным образом в тканях, пораженных опухолями. Во-вторых, препарат должен легко преодолевать мембранные барьеры и попадать внутрь опухолевых клеток. В-третьих, внутри опухолевых клеток или на их поверхности активное соединение должно поражать ключевые биохимические процессы, чтобы необратимо вызвать повреждение опухолевых клеток или торможение пролиферации. Соотношение этих факторов обеспечивает избирательность противоопухолевого действия и определяет ценность цитостатика как противоопухолевого препарата. В то же время поиск новых противоопухолевых препаратов среди известных классов химических соединений осуществляется как с целью усиления их специфической активности, так и для уменьшения токсического действия на нормальные ткани [18; 19].

Основными недостатками большинства препаратов, используемых в химиотерапии опухолевых заболеваний, являются ограниченная избирательность действия и возникновение устойчивости к ним опухолевых клеток. В связи с этим

актуально создание новых противоопухолевых препаратов, направленно действующих на опухолевые клетки-мишени [188].

Результаты клинических исследований препаратов различных производных индолокарбазолов продемонстрировали достаточно широкий спектр потенциальных показаний к применению (опухоли билиарного тракта, почечно-клеточный рак, НМРЛ и др.), а также хорошую сочетаемость с известными препаратами, в частности, комплексными соединениями платины. В то же время эффективность производных индолокарбазолов была сопоставимой с существующими препаратами, при наличии выраженной токсичности, прежде всего, гематологической. В этой связи разработка новых препаратов из группы индолокарбазолов требует тщательного подбора чувствительных моделей в эксперименте и особого внимания к соотношению риска и пользы под контролем переносимости лечения.

В перспективе синтеза новых потенциально активных N-гликозидов индолокарбазолов изучение связи химической структуры и их цитотоксических свойств, представляет не только теоретический, но и практический интерес. Очевидно, что на противоопухолевый эффект могут оказывать влияние как заместители в агликоне, так и природа гликозидного остатка. Это может быть связано с изменением спектра противоопухолевого действия, либо разной силой противоопухолевого эффекта, либо разной биодоступностью соединений, что впоследствии повлияет на величину терапевтической дозы соединения. Следовательно, индолокарбазолы и их углеводсодержащие производные перспективны для дальнейшей оптимизации химической структуры. Выявление связи химической структуры веществ с их биологической активностью открывает оптимальные пути для создания лекарственных препаратов высокой избирательности и эффективности.

Известно, что производные индолокарбазолов с двумя N-гликозидными связями, такие как стауроспорин и родственные ему соединения (сотрастаурин, мидостаурин и другие), являются мощными ингибиторами протеинкиназы C – фермента, участвующего во внутриклеточной передаче сигналов [189-191].

Соединения, содержащие индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольный хромофор с одной N-гликозидной связью, например, ребеккамицин и его аналоги, обладают высокой противоопухолевой активностью, которую связывают с их способностью ингибировать фермент топоизомеразу [192; 193].

В настоящее время в ряду соединений N-гликозидов инлокарбазолов ведется активный поиск и отбор природных ингибиторов топоизомеразы I, а также создание новых синтетических аналогов и производных, способных изменять каталитическую активность фермента, стабилизируя ковалентные ДНК-белковые комплексы. Существует два основных подхода к такому отбору. Первый - это система направленного поиска лекарственных соединений, исходя из их структурных особенностей и молекулярного механизма действия. Именно к такому типу относится поиск мишень-специфических противоопухолевых агентов. Вторым подходом является, так называемый, «случайный скрининг», когда для выявления противоопухолевой активности изучаются все доступные соединения, как синтетические, так и выделенные из природных источников.

Следует отметить, что большинство режимов химиотерапии содержат, по меньшей мере, один агент, повреждающий ДНК. Такая стратегия использует преимущества различий в клеточной пролиферации между нормальными и опухолевыми клетками [194; 195].

Внесение топоизомеразой одно-(топоизомераза I) и двухцепочечных (топоизомераза II) разрывов, с последующей их сшивкой и восстановлением целостности молекулы ДНК, обуславливает мобильность, необходимую для конформационных изменений ДНК в процессах матричного синтеза и подвижности хромосом в митозе. Топоизомеразы являются ядерными ферментами, которые решают топологические дилеммы в ДНК, такие как недокручивание, перекручивание и образование цепочек, которые обычно возникают во время репликации, транскрипции и, возможно, других процессов в ДНК. Эти ферменты позволяют ДНК срелаксировать путем образования нитевых разрывов с ферментными мостиками, которые действуют как неустойчивые проходы или основные точки для прохождения других нитей ДНК. Лекарства,

действующие на топоизомеразу, влияют на эту реакцию разрыв-соединение в топоизомеразах ДНК. В присутствии активных по отношению к топоизомеразе агентов промежуточный продукт, называемый "расщепляемым комплексом", аккумулируется и приводит к прекращению репликации/транскрипции, что приводит к гибели клеток. Следовательно, расширение круга активных по отношению к топоизомеразе I агентов обеспечивает новый подход в арсенале терапевтических средств, используемых в клинике для лечения рака [196].

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Животные

В опытах использовали 810 мышей-гибридов первого поколения BDF_1 ($C_{57}Bl/6j$ x $DBA/2$) обоего пола, 135 линейных мышей-самцов $C_{57}Bl_6$, 135 самцов $DBA/2$, 55 самок CBA и 26 самок $Balb/c$ массой тела не менее 18 г, а также беспородных крыс-самок массой тела 150-180 г. Животных получали из разведения экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». В исследовании использованы 50 особей половозрелых мышей-самцов $Balb/c$ nude массой тела 20-22 г из разведения лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [29]. Иммунодефицитных мышей содержали в условиях специализированного кондиционированного вивария со свободным доступом к воде. Мышей линий BDF_1 , $C_{57}Bl_6$, $DBA/2$, CBA , $Balb/c$ и беспородных крыс содержали в виварии с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перед лечением животных распределяли по группам ($n = 6-8$). В одной группе препараты животным не вводили и считали ее контрольной ($n = 10-12$).

2.2 Опухолевые модели

Использованы модели гемобластозов и солидных опухолей мышей: лимфолейкоз P388, лимфолейкоз L1210, лимфаденоз Фишера L5178Y, эпидермоидная карцинома легкого Lewis (LLC), меланома B16, рак шейки матки РШМ-5, аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ и полиморфноклеточная саркома M-1 (S M-1) крыс.

Вышеперечисленные модели широко применяются в экспериментальной онкологии для доклинической оценки противоопухолевой активности, как новых субстанций, так и готовых лекарственных форм [20; 21; 197; 198].

В опытах использованы 2–15-й пассажи *in vivo*. Клетки P388 и L1210 трансплантировали внутрибрюшинно (в/б) самкам гибридам BDF₁ по 10⁶ клеток на мышь в 0,4 мл (для P-388) и 0,2 мл (для L1210) питательной среды 199 при подсчете клеток в камере Горяева. Лимфаденоз Фишера перевивали мышам DBA/2 в/б по 10⁶ клеток в 0,1 мл питательной среды 199. LLC и B16 трансплантировали подкожно (п/к) мышам-самцам BDF₁, PШМ5 в эксперименте перевивали мышам-самкам линии СВА, АКАТОЛ — мышам-самкам Balb/c. Трансплантацию опухолей выполняли по стандартной методике, принятой в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [22]. При трансплантации солидных опухолей инокуляцию опухолевых клеток проводили п/к в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1:10 (5 × 10⁶ клеток).

Лечение начинали через 24 ч после трансплантации гемобластозов и через 48 ч — солидных опухолей. Начало лечения соответствовало времени интенсивного размножения опухолевых клеток, что обеспечивает их нахождение в наиболее чувствительном к химиотерапии состоянии [199].

Саркому М-1 перевивали п/к беспородным крысам-самкам по 0,3 мл взвеси измельченной опухоли, содержащей 2 × 10⁶ опухолевых клеток при разведении взвеси в среде 199. Лечение начинали на 5 день после трансплантации опухоли [20].

В экспериментах на иммунодефицитных мышах использовали штамм перевиваемого рака ободочной кишки человека SW620, растущий в виде п/к ксенографтов. Ампулу 1,0 мл с опухолевой взвесью, полученную из Криобанка, размораживали *ex tempore* в термостате 10 мин при t=37°C. Затем опухолевую взвесь имплантировали под кожу бока 2-м мышам-самкам Balb/c nude по 0,5 мл на мышь (первый пассаж). После достижения объема 0,8-1,0 см³ полученные узлы пассировали на мышах-донорах (n=5) для получения нужной трансплантационной

массы опухоли. Для получения 20% трансплантата опухолевые узлы нужной массы механически измельчали с помощью средних ножниц с закругленными краями и добавляли к взвеси питательную среду 199. Каждой мыши под кожу бока трансплантировали по 0,2 мл 20% взвеси, т.е. по 40 мг опухолевой ткани на мышь. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли.

2.3 Препараты

Изучена противоопухолевая активность 10 соединений — производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов с общей химической формулой (рисунок 1), синтезированных в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (таблица 2).

Исследуемые соединения нерастворимы в воде, плохо растворимы в этаноле и ацетоне, растворимы в диметилсульфоксиде (ДМСО) и диметилформамиде [23].

Для работы исходные соединения растворяли в ДМСО и разводили физиологическим раствором до 10% концентрации ДМСО.

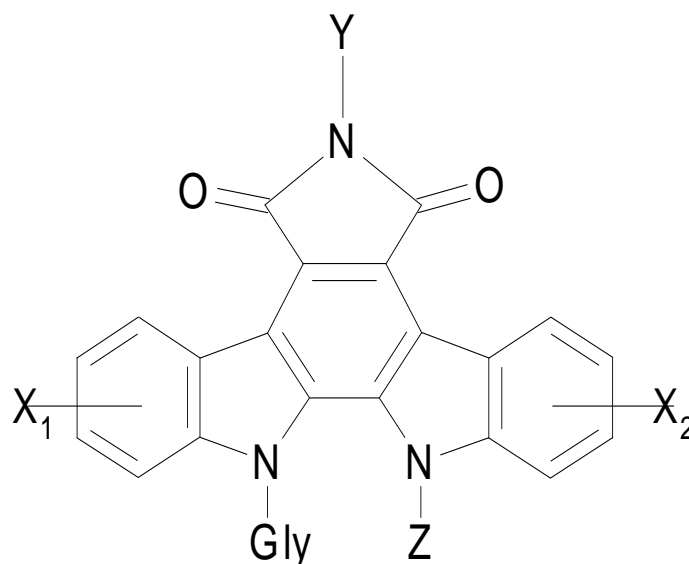


Рисунок 1 — Общая формула производных индолокарбазола

Таблица 2 — Представленные к изучению N-гликозиды 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-бром индоло [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

Сравнительное исследование 10 соединений производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов позволило отобрать для углубленного изучения соединение ЛХС-1208.

В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в ходе экспериментальных технологических исследований созданы прототипы лекарственных форм на основе субстанции индолокарбазола ЛХС-1208 с использованием различных солюбилизаторов (Cremophor ELP, Kollisolv PEG-400 / Lutrol E-400 и Kollidon 17PF, BASF The Chemical Company, Германия).

Изучение противоопухолевой активности прототипов позволило выбрать для доклинического исследования лекарственную форму ЛХС-1208 в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций следующего состава: субстанция ~ 9,0 мг; ДМСО - 110 мг; Kollidon 17PF - 600 мг. Перед введением экспериментальным животным лиофилизат регидратировали 2,8 мл воды для инъекций с целью получения раствора для в/в введения с концентрацией действующего вещества 3 мг/мл [24].

В качестве препарата сравнения использован аптечный иринотекан (Кампто ЦС «ПфайзерПти Лтд.», Австрия), который вводили мышам Balb/c 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.

2.4 Дозы и режимы применения

Эффективность и избирательность противоопухолевого действия производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов определялась в сравнительных экспериментах на опухолевых моделях мышей P388, LLC и B16.

Испытание проводили по схеме, применяемой для первичного исследования потенциальных противоопухолевых препаратов в широком диапазоне доз от 5 до

175 мг/кг в соответствующих концентрациях от 0,5 до 10 мг/мл при ежедневном внутривенном (в/в) введении в течение 5 дней [25].

Определение оптимального пути введения лекарственной формы ЛХС-1208 проводилось на опухолевых моделях мышей P388, LLC и S M-1 крыс. Разработанные для перорального применения прототипы лекарственных форм 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 лекарственных форм для парентерального применения изучались на опухолевых моделях мышей P-388 и LLC в диапазоне доз от 10 мг/кг до 45 мг/кг в концентрациях 3 мг/мл и 5 мг/мл при ежедневном внутривенном (в/в) введении в течение 5 дней.

Оптимальным считали путь введения, при котором достигалась максимальная результативность по всем критериям эффективности [22].

Изучение спектра противоопухолевой активности инъекционной лекарственной формы 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 лекарственной формы 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 мышах 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 [30]. 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 [31].

Лечение начинали через 48 часов после трансплантации SW620.

2.5 Оценка противоопухолевого эффекта

Эффективность лечения мышей с солидными опухолями (LLC, B16, PИМ5) оценивали по стандартным критериям: торможению роста опухоли (ТРО%), увеличению продолжительности жизни (УПЖ%). Показатели эффективности определяли в сравнении с контрольными группами мышей [22].

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 $T/C \leq 42\%$.

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

$$TPO\% = (V_k - V_o) / V_k \times 100;$$

$$T/C\% = (V_o / V_k) \times 100,$$

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.

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ) леченных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле:

$$UPJ\% = (СПЖ_o - СПЖ_k) / СПЖ_k \times 100,$$

где СПЖ_о и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных.

Показатели эффективности изучаемого препарата определяли в сравнении с контрольными группами. Эффективными считали дозы препаратов, вызывающие

ТРО \geq 70% продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения или УПЖ \geq 25%.

Излечение (% случаев) — количество животных, проживших 90 дней без признаков опухолевого процесса.

2.6 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 (\geq 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. Состояние животных визуально оценивали ежедневно. Павших или умерщвленных передозировкой эфирного наркоза мышей подвергали аутопсии для визуального определения патологических изменений внутренних органов. Селезенку взвешивали на торсионных весах с ценой деления 20 мг и рассчитывали массовые коэффициенты. Трупы животных утилизировали в соответствии с санитарными правилами ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

2.7 Изучение цитотоксической активности производного индолокарбазола ЛХС-1208

Оценку цитотоксической активности производного индолокарбазола — ЛХС-1208 проводили на клетках рака толстой кишки человека линии НСТ-116, толстой кишки LS174T, яичников SKOV3, предстательной железы DU145, молочной железы MCF-7 и меланомы MeWO. Все линии клеток выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка при 5% содержании CO₂ и температуре 37⁰C. Цитотоксическую активность тестируемого ЛХС-1208 оценивали по выживаемости клеток. Выживаемость клеток определяли с помощью стандартного МТТ-теста с использованием МТТ-реагента (3,4,5-

диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Метод основан на способности дегидрогеназ живых метаболически активных клеток восстанавливать МТТ-реагент до голубых нерастворимых кристаллов формазана [22]. Клетки рассеивали в 180 мкл полной питательной среды и выращивали в течение 24 часов в указанных выше условиях. Затем добавляли ЛХС-1208 в диапазоне концентраций 0,01 мкМ – 100 мкМ в объеме 20 мкл. Время инкубации ЛХС-1208 с клетками составляло 48 ч. Контролем служили образцы клеток, к которым ЛХС-1208 не добавляли. Через 48 ч в лунки с клетками добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч в тех же условиях.

Выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 20 мин при температуре 37⁰С. Контролем служили образцы клеток, к которым ЛХС-1208 не добавляли. Через 48 ч в лунки с клетками добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч в тех же условиях. Выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 20 мин при температуре 37⁰С. Оптическое поглощение окрашенных растворов ДМСО измеряли на счетчике оптического поглощения Titertek Multiskan MCC/340 при длине волны 540 nm. Оптическое поглощение растворенного в ДМСО формазана пропорционально количеству живых клеток в пробе. Результаты оценивали по отношению к контрольным образцам (без ЛХС-1208). Выживаемость клеток (в %) для каждой концентрации ЛХС-1208 определяли по формуле:

$$(P_0/P_k) \times 100,$$

где P_0 – оптическое поглощение в опыте, P_k – оптическое поглощение в контроле.

На основании полученной кривой «доза-эффект» вычисляли значение ингибирующей концентрации (IC_{50} , мкМ) ЛХС-1208, при которой поглощение в опытных образцах составляет 50% от контроля. ЛХС-1208 считали активным, если его IC_{50} была меньше или равна 50 мкМ. Ошибка измерений в экспериментах не превышала 5% [26].

2.8 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 КСl, 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 K и инкубировали смесь 30 мин при 37°C. Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле (состав буфера: 40 мМ Трис-основания, 1 мМ ЭДТА, 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 теленка (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в растворе, содержащем 10 мМ фосфатного буфера (рН 7.8) и 100 мМ NaCl, применяя метод спектрального анализа. Реагенты приобретали в компании Хеликон (Москва). По изменению спектров поглощения определяли взаимодействие исследуемого соединения с ДНК. Кроме того, исследовали концентрацию связанного и концентрацию не связавшегося (свободного) соединения. На основании этих данных строили изотерму связывания в координатах Скэтчарда. По полученным показателям судили о параметрах связывания молекул ЛХС-1208 с дуплексной ДНК.

2.9 Статистическая обработка

Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности.

Статистический анализ данных 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. В качестве описательных статистик в работе приведены среднее арифметическое (M) и среднеквадратическое отклонение ($M \pm s$), на графиках представлены средние и их доверительные интервалы. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3

**СКРИНИНГ СОЕДИНЕНИЙ КЛАССА ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ
НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ *IN VIVO***

Изучение противоопухолевой активности 10 новых соединений в ряду N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов проводилось в сравнительных экспериментах на опухолевых моделях мышей P388, LLC и B16.

**3.1 Скрининг производных индолокарбазолов на модели
лимфолейкоза P388 мышей**

ЛХС-1208. Противоопухолевую активность ЛХС-1208 (*6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 100 мг/кг (суммарные дозы 50–500 мг/кг), таблица 3, рисунок 2.

Таблица 3 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1208 (арабинопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на P388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
Контроль	-	-	-
10	50	75	<0,001
25	125	97	<0,001
50	250	84	<0,001
75	375	115	<0,001
100	500	119	<0,001

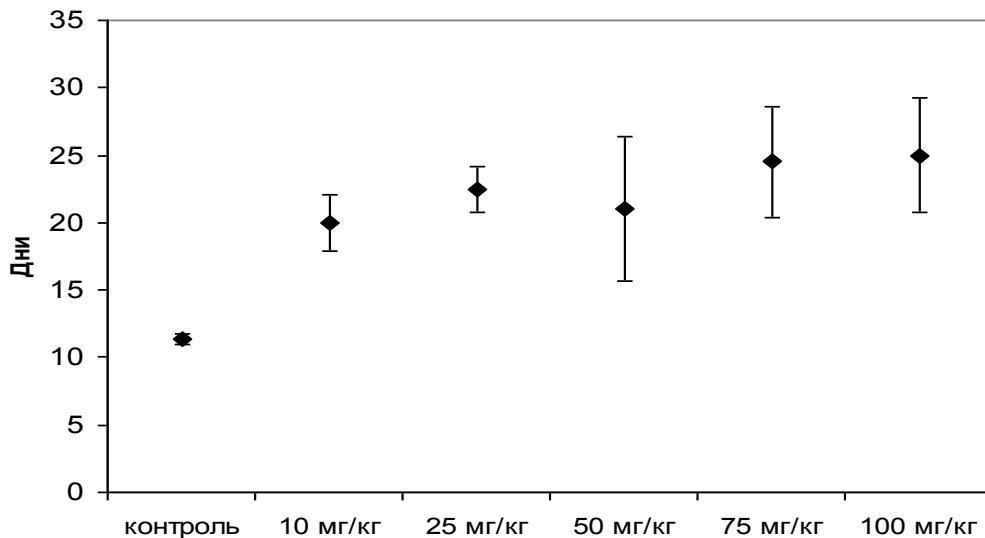


Рисунок 2 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1208 при пятикратном внутрибрюшинном введении

При применении ЛХС-1208 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) было достигнуто достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=75% ($p<0,001$). Повышение дозы продемонстрировало явный дозозависимый эффект. Так, в дозе 25 мг/кг УПЖ составило 97% ($p<0,001$), а в дозе 75 мг/кг — 115% ($p<0,001$). Максимальное УПЖ=119% отмечали при применении наибольшей из изученных доз, суммарная доза 500 мг/кг ($p<0,001$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

ЛХС-1054. Противоопухолевую активность ЛХС-1054 (6-[2-морфолиноэтил]-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 25 до 125 мг/кг (суммарные дозы 125–625 мг/кг), таблица 4, рисунок 3.

При применении ЛХС-1054 в дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) отмечалось недостоверное по отношению к контрольной группе мышей УПЖ=77% ($p=0,097$). При повышении разовой дозы до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) было достигнуто достоверное по отношению к контрольной группе

УПЖ=80% ($p=0,05$). Максимальный эффект наблюдался в разовой дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) и соответствовал УПЖ=129% ($p<0,001$).

Таблица 4 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1054 (арабинопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	Гибель от токсичности	p к контр. группе
контроль	-	-	-	-
25	125	77	0/6	0,097
50	250	80	0/6	0,050
75	375	129	0/6	<0,001
100	500	119	0/6	0,001
125	625	85	2/6*	0,034

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

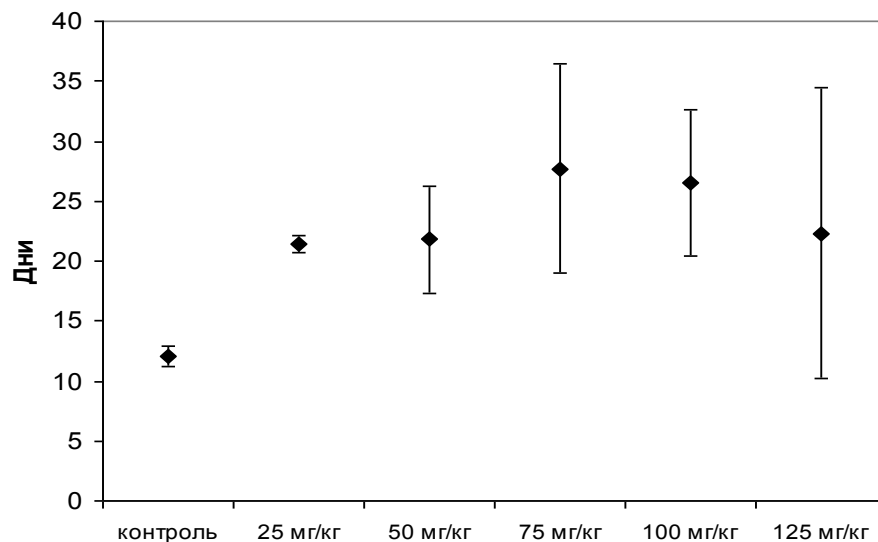


Рисунок 3 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1054 при пятикратном внутрибрюшинном введении

При увеличении разовой дозы до 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) УПЖ мышей составляло 119% ($p=0,001$). Применение ЛХС-1054 в дозе 125 мг/кг (суммарная доза 625 мг/кг) вызывало УПЖ=85% ($p=0,034$) и инициировало гибель мышей непосредственно после окончания лечения (на 6-е сутки после трансплантации Р388) в 33% случаев.

Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных на 15% от исходного веса, снижении двигательной активности. При аутопсии отмечены спайки в брюшной полости.

ЛХС-1007. Противоопухолевую активность ЛХС-1007 (*13-метил-12-(α -L-арабинопиранозил)9-броминдоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 30 и 40 мг/кг (суммарные дозы 150 и 200 мг/кг) и однократном внутрибрюшинном введении в дозах 60 и 200 мг/кг (таблица 5, рисунок 4).

Таблица 5 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1007 (арабинопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении на Р388

Режим введения: доза (мг/кг) / интервал (час) x число введений	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	Гибель от токсичности	p к контр. группе
Контроль	-	-	-	-
30 / 24 x 5	150	34	0/5	0,002
40 / 24 x 5	200	27	0/5	0,016
60 x 1	60	19	0/5	0,155
200 x 1	200	12	1/5*	0,557
* n/n - число павших к общему числу животных в группе				

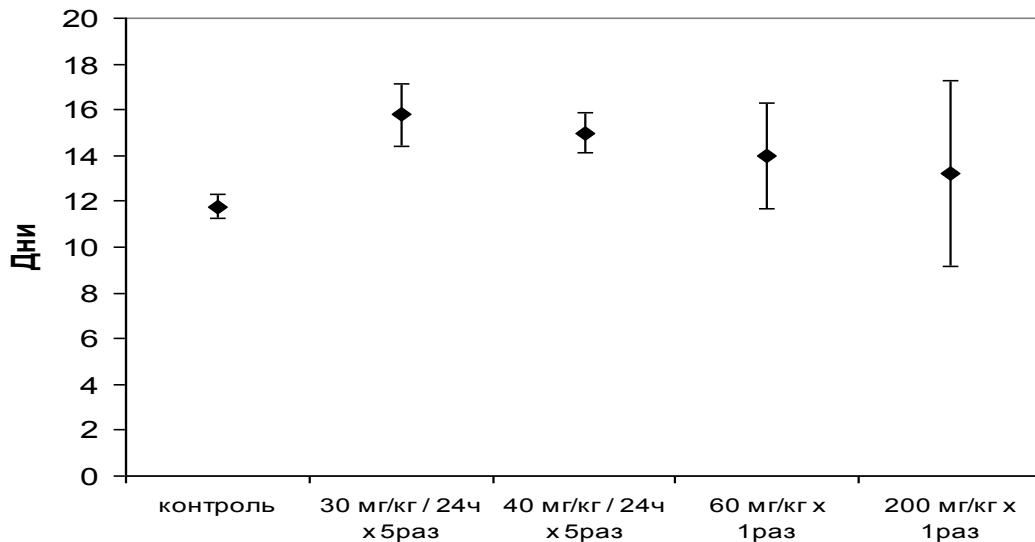


Рисунок 4 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1007 при внутрибрюшинном введении

При применении ЛХС-1007 в дозе 30 мг/кг (суммарная доза 150 мг/кг) наблюдалось максимальное достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=34% ($p<0,002$). Повышение разовой дозы до 40 мг/кг (суммарная доза 200 мг/кг) показало УПЖ=27% ($p<0,016$).

Однократные дозы 60 и 200 мг/кг оказались неэффективными: УПЖ=19% ($p=0,155$) и 12% ($p=0,557$), соответственно. Кроме того, однократное применение максимальной дозы 200 мг/кг приводило к гибели мышей в 20% случаев на 7-е сутки после трансплантации Р388. При этом отмечалась значительная, на 35% от исходного веса, потеря массы тела.

ЛХС-1006. Противоопухолевую активность ЛХС-1006 (*12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах от 40 до 70 мг/кг (суммарные дозы 200–350 мг/кг), таблица 6, рисунок 5.

Таблица 6 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1006 (арабинопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	Гибель от токсичности	р к контр. группе
контроль	-	-	-	-
40	200	41	0/7	0,444
50	250	25	2/7**	0,841
60	300	-14*	4/7	0,977
70	350	-51	7/7	0,236

* знак «←→» означает уменьшение продолжительности жизни леченых животных по сравнению с не леченым контролем;

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

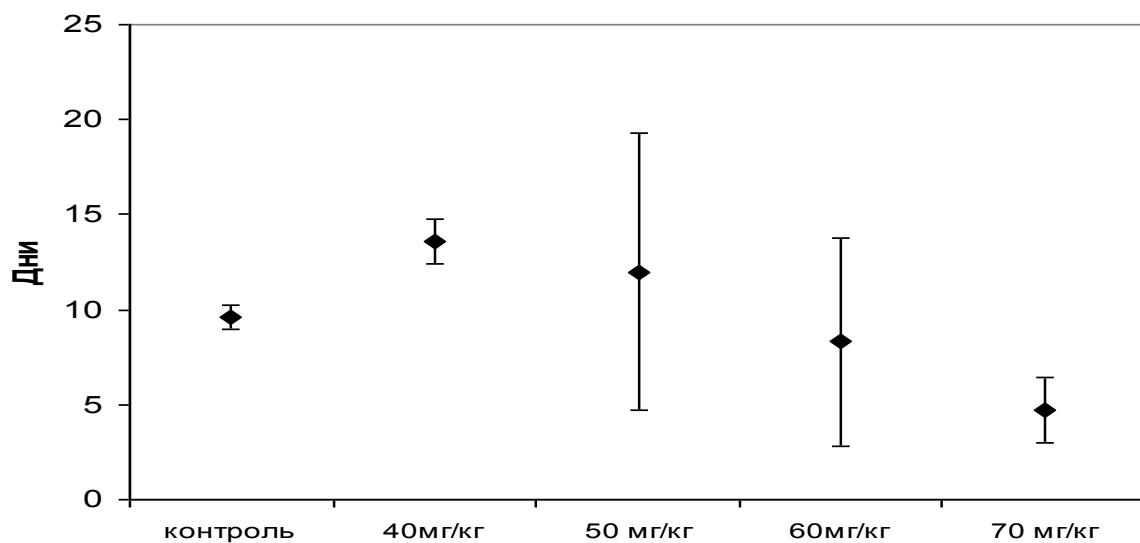


Рисунок 5 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1006 при пятикратном внутрибрюшинном введении: достоверность отличий между суммарными дозами 200 и 350 мг/кг ($p=0,007$); достоверность отличий между суммарными дозами 250 и 350 мг/кг ($p=0,035$)

Доза 40 мг/кг (суммарная доза 200 мг/кг) вызывала наибольшее, но недостоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=41% ($p<0,444$). Повышение дозы ЛХС-1006 до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) приводило к гибели мышей в 28% случаев на 2–5 сутки после трансплантации Р-388 и соответствовало более низкому показателю УПЖ=25% ($p<0,841$), также недостоверному по отношению к контрольной группе животных. При применении ЛХС-1006 в дозе 60 мг/кг (суммарная доза 300 мг/кг) наблюдалось уменьшение продолжительности жизни леченых животных по сравнению с не леченым контролем в связи с гибелью мышей от токсичности на 2–4 сутки после трансплантации лимфолейкоза. Доза 70 мг/кг (суммарная доза 350 мг/кг) оказалась летальной (ЛД₁₀₀), мыши погибли на 2-е сутки после окончания лечения. Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных. При аутопсии отмечены спайки в брюшной полости. В опытных группах отличия были достоверными между суммарными дозами 200 мг/кг и 350 мг/кг ($p=0,007$) и между суммарными дозами 250 мг/кг и 350 мг/кг ($p=0,035$).

ЛХС-1040. Противоопухолевую активность ЛХС-1040 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 75 мг/кг (суммарные дозы 50–375 мг/кг), таблица 7, рисунок 6.

При применении ЛХС-1040 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) было достигнуто достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=35% ($p<0,001$). Максимальное УПЖ=39% ($p<0,001$) отмечено в дозе 25 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг).

При повышении дозы дозозависимый эффект не наблюдался. Так, в дозе 50 мг/кг УПЖ составило 35% ($p<0,001$), а в дозе 75 мг/кг — 31% ($p<0,001$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей от токсичности не наблюдалась.

Таблица 7 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1040 (ксилопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
контроль	-	-	-
10	50	35	<0,001
25	125	39	<0,001
50	250	35	<0,001
75	375	31	<0,001

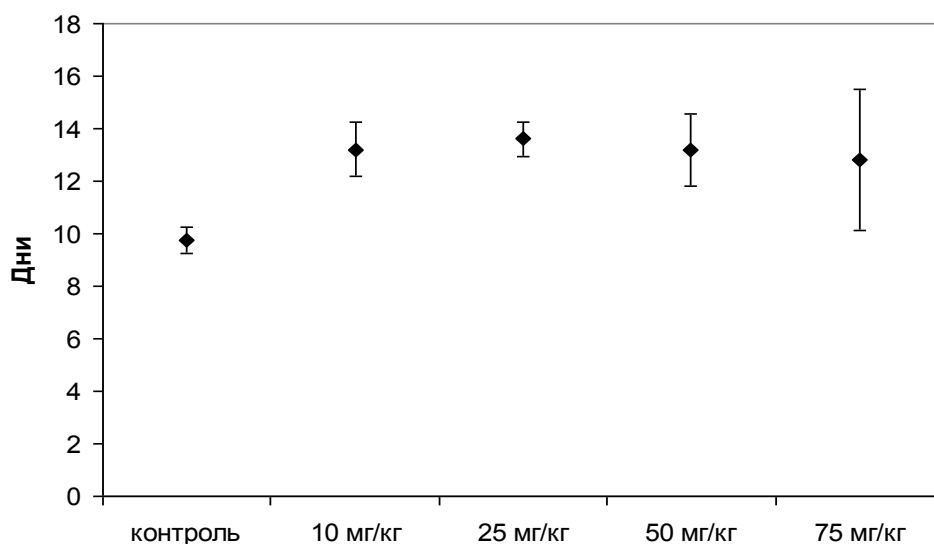


Рисунок 6 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1040 при пятикратном внутрибрюшинном введении

ЛХС-976. Противоопухолевую активность ЛХС-976 (*13-метил-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах от 10 до 75 мг/кг (суммарные дозы 50–375 мг/кг), таблица 8, рисунок 7.

Таблица 8 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-976 (ксилопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
контроль	-	-	-
10	50	25	0,001
25	125	36	<0,001
50	250	47	<0,001
75	375	43	<0,001

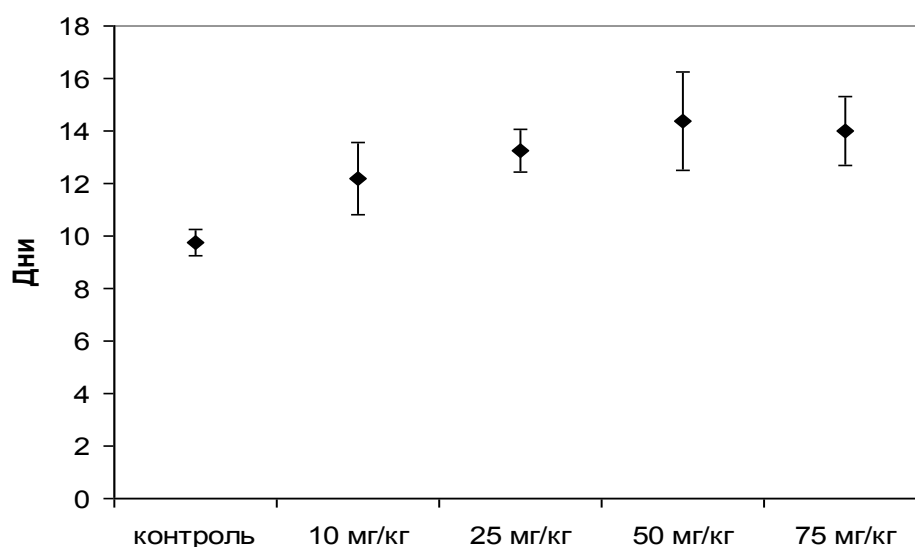


Рисунок 7 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-976 при пятикратном внутрибрюшинном введении: достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 250 мг/кг ($p = 0,012$)

Применение ЛХС-976 во всех исследуемых дозах показало достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ. Так, ЛХС-976 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) проявил противоопухолевый эффект по УПЖ=25% ($p=0,001$), в дозе 25 мг/кг УПЖ составило 36% ($p<0,001$). Максимальное

УПЖ=47% ($p<0,001$) отмечалось в разовой дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг), а в дозе 75 мг/кг эффект снижался и соответствовал УПЖ=43% ($p<0,001$). При этом в опытных группах отличия были достоверными между суммарными дозами 50 мг/кг и 250 мг/кг ($p=0,012$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

ЛХС-983. Противоопухолевую активность ЛХС-983 (12- (β -D - ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10, 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50, 125 и 250 мг/кг), таблица 9, рисунок 8. При применении ЛХС-983 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) УПЖ составило 44%, и было недостоверным по отношению к контрольной группе ($p<0,414$). Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) приводило к достоверному увеличению продолжительности жизни леченых мышей на 96% ($p<0,01$), а в дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) отмечалось максимальное УПЖ=101% ($p<0,006$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей от токсичности не наблюдалась.

Таблица 9 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-983 (ксилопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	p к контр. группе
Контроль	-	-	-
10	50	44	0,414
25	125	96	0,01
50	250	101	0,006

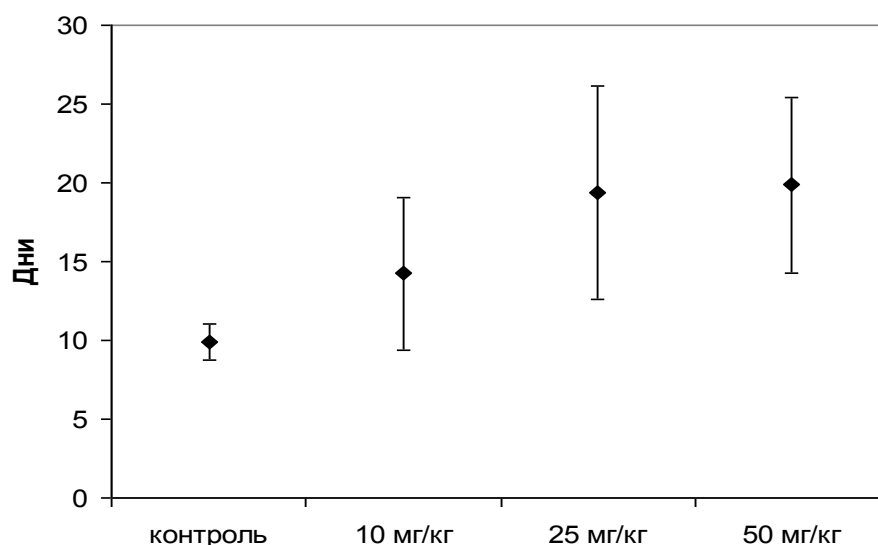


Рисунок 8 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-983 при пятикратном внутрибрюшинном введении

ЛХС-1098. Противоопухолевую активность ЛХС-1098 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β-D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10, 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50, 125 и 250 мг/кг), таблица 10, рисунок 9. ЛХС-1098 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) вызывал максимальное и достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=39% ($p < 0,001$). Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) приводило к достоверному уменьшению продолжительности жизни леченых мышей на 19% ($p = 0,04$), а в дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) отмечалось близкое к минимальному критерию УПЖ=28% ($p = 0,003$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

Таблица 10 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1098 (галактопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
контроль	-	-	-
10	50	39	<0,001
25	125	19	0,040
50	250	28	0,003

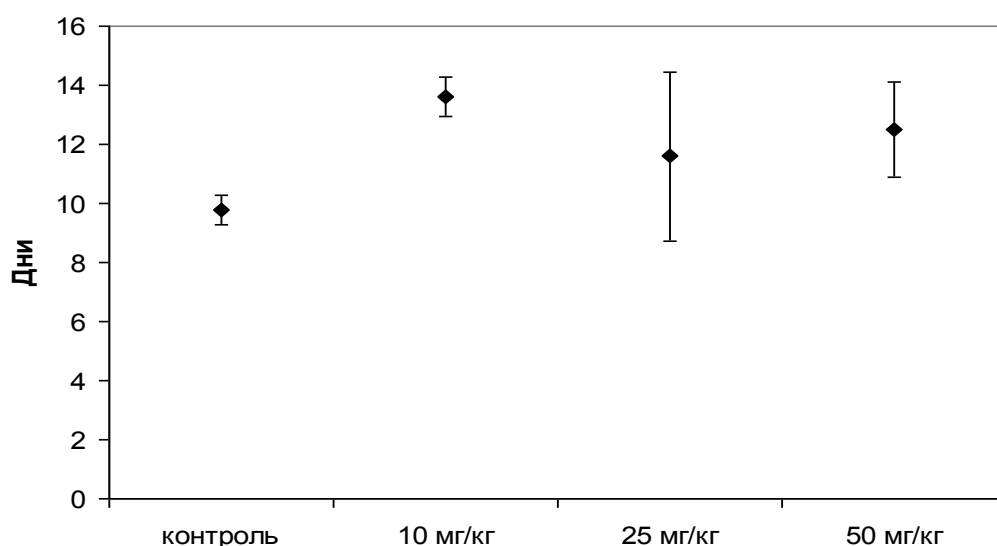


Рисунок 9 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-1098 при пятикратном внутрибрюшинном введении

ЛХС-999. Противоопухолевую активность ЛХС-999 (*12-(β-D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 25 до 175 мг/кг (суммарные дозы 125–825 мг/кг), таблица 11, рисунок 10.

Таблица 11 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-999 (галактопиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза, (мг/кг)	Суммарная доза, (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
контроль	-	-	-
25	125	49	0,022
50	250	61	0,002
125	625	79	<0,001
150	750	115	<0,001
175	875	98	<0,001

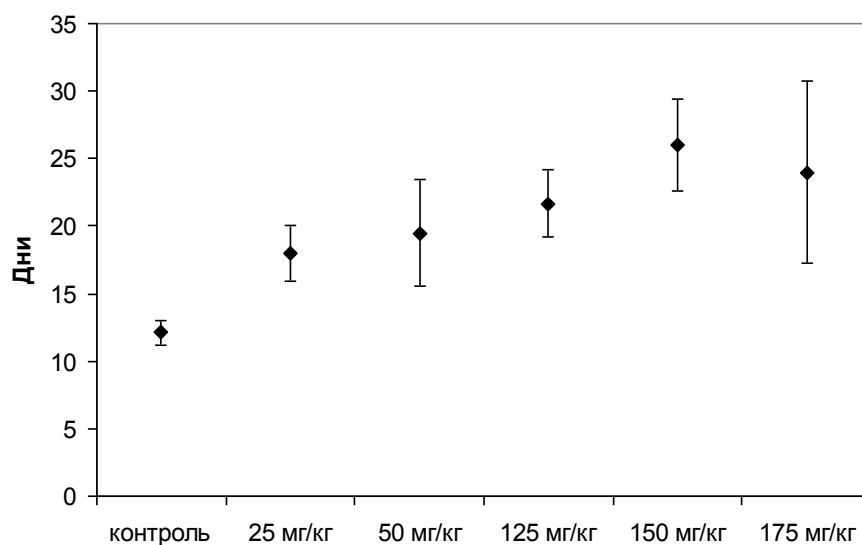


Рисунок 10 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-999 при пятикратном внутрибрюшинном введении: достоверность отличий между суммарными дозами 125 и 750 мг/кг ($p=0,003$); достоверность отличий между суммарными дозами 125 и 875 мг/кг ($p=0,045$); достоверность отличий между суммарными дозами 250 и 750 мг/кг ($p=0,024$)

При применении ЛХС-999 в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) было достигнуто достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=49% ($p=0,022$). Повышение дозы показало дозозависимый эффект. Так, в дозе 50 мг/кг УПЖ составило 61% ($p=0,002$), а в дозе 125 мг/кг — 79% ($p<0,001$). Максимальное УПЖ=115% ($p<0,001$) отмечали в разовой дозе 150 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг), однако в дозе 175 мг/кг эффект снижался и соответствовал УПЖ =98% ($p<0,001$).

В опытных группах отличия были достоверными между суммарными дозами 125 мг/кг и 750 мг/кг ($p=0,003$), между суммарными дозами 125 мг/кг и 875 мг/кг ($p=0,045$) и между суммарными дозами 250 мг/кг и 750 мг/кг ($p=0,024$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечалось.

ЛХС-985. Противоопухолевую активность ЛХС-985 (*12-(β -D-риботиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 125 и 250 мг/кг), таблица 12, рисунок 11.

Таблица 12 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-985 (риботиранозил) от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на Р388

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	р к контр. группе
Контроль	-	-	-
25	125	89	<0,005
50	250	53	<0,111

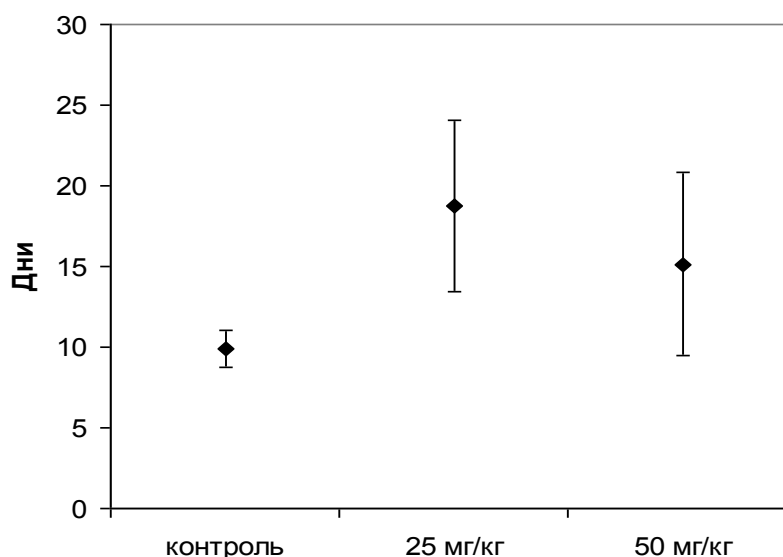


Рисунок 11 — Зависимость продолжительности жизни мышей с Р388 от дозы ЛХС-983 при пятикратном внутрибрюшинном введении

При применении ЛХС-985 в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) УПЖ составило 89% ($p < 0,005$). Повышение разовой дозы до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) приводило к УПЖ=53% ($p < 0,111$) и было недостоверным по отношению к контрольной группе.

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей от токсичности не наблюдалась.

Таким образом, показано, что на лимфолейкозе Р388 мышей выраженным противоопухолевым эффектом обладали ЛХС-1208, ЛХС-1054 и ЛХС-999. Так, ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 5 дней ЛХС-1208 в дозе 100 мг/кг, ЛХС-1054 в дозе 75 мг/кг и ЛХС-999 в дозе 150 мг/кг достоверно увеличивало продолжительность жизни подопытных мышей по сравнению с контрольными животными на 119%, 129% и 115% ($p < 0,001$) соответственно.

ЛХС-983 и ЛХС-985 в разовых дозах 50 и 25 мг/кг (суммарные дозы 250 и 125 мг/кг) увеличивали продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р-388 на 101% ($p < 0,006$) и 89% ($p < 0,005$) соответственно.

ЛХС-1007, ЛХС-1098, ЛХС-1040 и ЛХС-976 в разовых дозах 30, 10, 25 и 50 мг/кг на Р388 показали противоопухолевую активность, близкую к минимальному критерию эффективности: УПЖ=34% ($p<0,002$), 39%, 39% и 47% ($p<0,001$) соответственно.

ЛХС-1006 в разовой дозе 40 мг/кг вызывал максимальное, но недостоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=41% ($p<0,444$).

3.2 Скрининг производных индолокарбазолов на модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) мышей

ЛХС-1208. Противоопухолевую активность ЛХС-1208 (6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 25 до 100 мг/кг (суммарные дозы 125–500 мг/кг), таблица 13, рисунок 12.

При применении ЛХС-1208 в разовой дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=91% на 1-е сутки после окончания лечения ($p=0,012$). Далее эффект снижался и на 15-й день соответствовал 53%.

Таблица 13 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1208 от дозы при внутрибрюшинном введении в течение 5 дней на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
25	125	78	51	38	32	34	30	>0,05
50	250	45	+16**	5	3	11	16	>0,05
75	375	91*	71	72	53	32	29	0,012*
100	500	90	88	61	58	45	30	>0,05

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

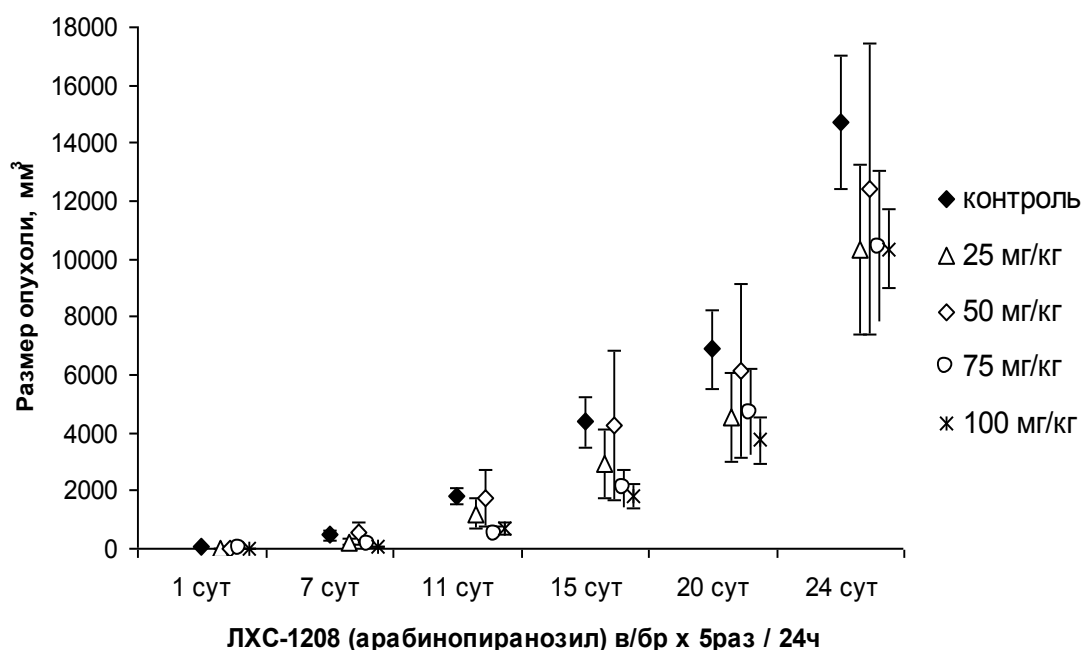


Рисунок 12 — Изменение размера опухоли LLC мышей при пятикратном внутривенном введении ЛХС-1208, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 75 мг/кг против контроля $p=0,012$

Суммарные дозы 125, 250 и 500 мг/кг в указанные сроки наблюдения не проявили статистически значимых различий по отношению к контрольной группе ($p>0,05$). Противоопухолевое действие ЛХС-1208 в исследуемых дозах оказалось также недостоверным при сравнении между опытными группами ($p>0,05$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

ЛХС-1054. Противоопухолевую активность ЛХС-1054 (6-[2-морфолиноэтил]-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутривенном введении в разовой дозе 75 (суммарная доза 375 мг/кг), таблица 14, рисунок 13.

Статистически значимых различий в указанные сроки наблюдения не выявлено ($p>0,05$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не отмечалась.

Таблица 14 — Противоопухолевый эффект ЛХС-1054 при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
75	375	49	58	29	35	32	34	>0,05

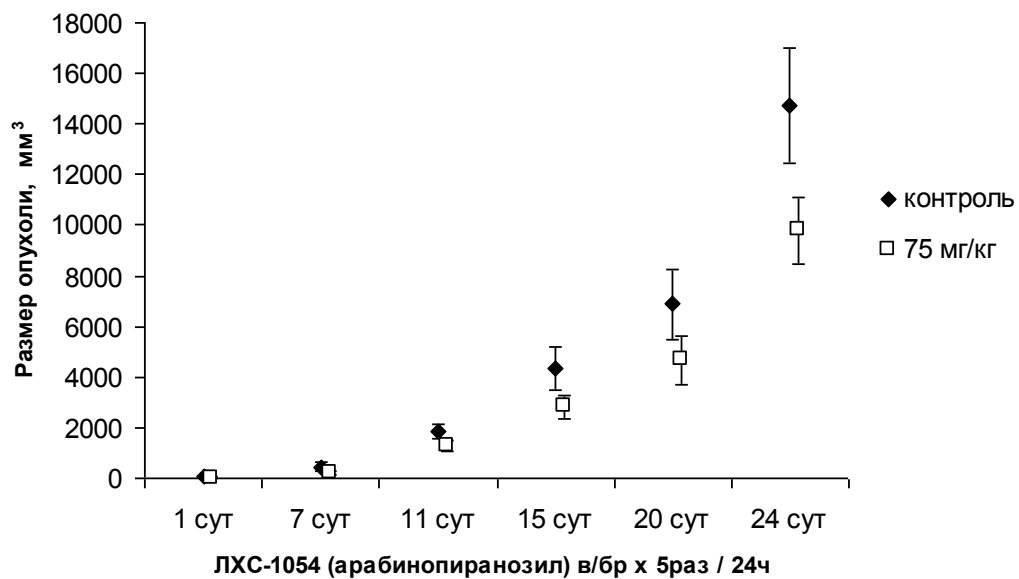


Рисунок 13 — Изменение размера опухоли LLC при внутрибрюшинном введении ЛХС-1054, средние и стандартные ошибки

ЛХС-1007 (*13-метил-12-(α -L-арабинопиранозил)9-броминдоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион*) при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовой дозе 40 мг/кг (суммарная доза 200 мг/кг) показал достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=48% ($p=0,05$) непосредственно в 1-й день после окончания лечения. Далее эффект снижался и к 15-му дню составил 28% ($p=0,027$), таблица 15, рисунок 14. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

Таблица 15 — Противоопухолевый эффект ЛХС-1007 при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %			
		Дни после окончания лечения			
		1	7	11	15
40	200	48*	35	25	28*

* $p \leq 0,05$ по отношению к контролю

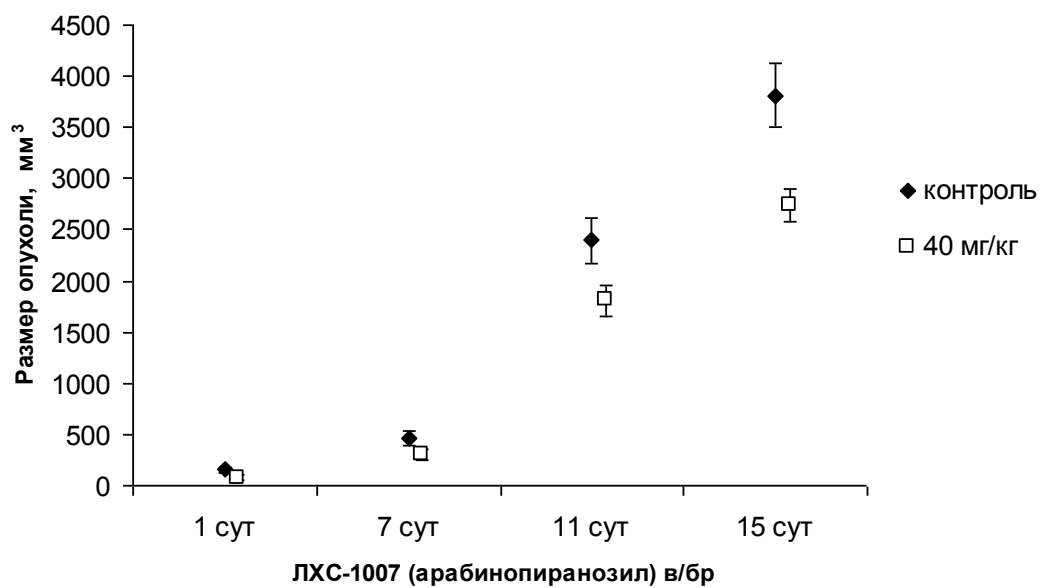


Рисунок 14 — Изменения размера опухоли LLC при внутрибрюшинном введении ЛХС-1007, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 40 мг/кг против контроля $p=0,050$; на 15-е сутки наблюдения доза 40 мг/кг против контроля $p=0,027$

ЛХС-1006. Противоопухолевую активность ЛХС-1006 (*12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 40, 50 и 60 мг/кг (суммарные дозы 200, 250 и 300 мг/кг), таблица 16, рисунок 15.

Таблица 16 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1006 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
40	200	79*	78*	57*	28	21	31	<0,001*
50	250	90*	70*	54*	37*	33	44	<0,001*
60	300	54*	25	+5**	+3	4	5	0,001*

** - знак “+” означает стимуляцию роста опухоли

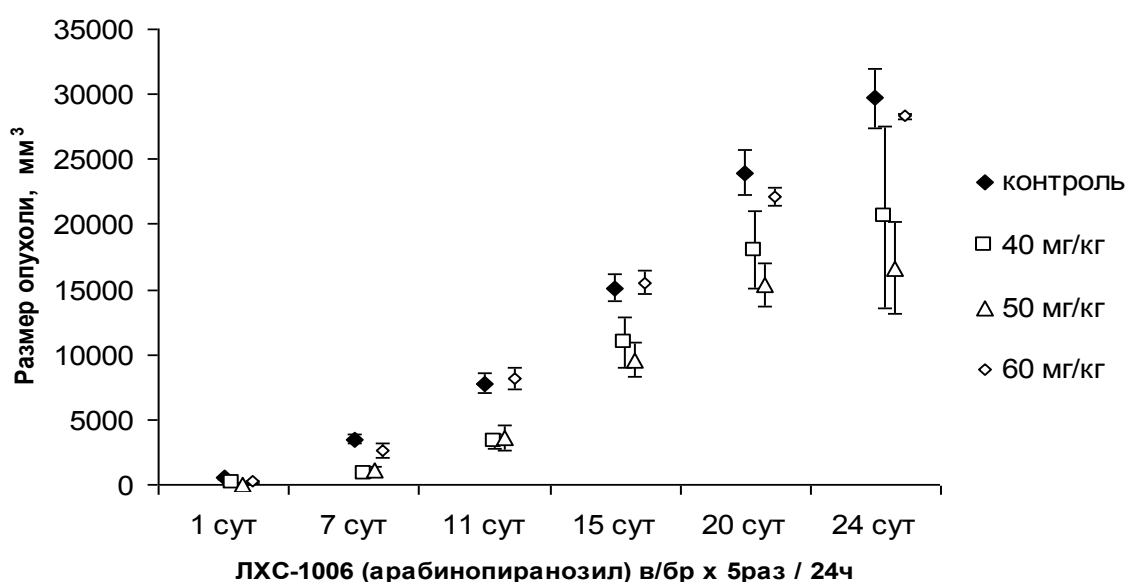


Рисунок 15 — Динамика изменения размера опухоли LLC при различных дозах ЛХС-1006, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки дозы 40-60 мг/кг против контроля $p < 0,001$; на 7-е сутки дозы 40-50 мг/кг против контроля $p < 0,001$; на 11-е сутки дозы 40 и 50 мг/кг против контроля $p = 0,002$ и $p = 0,003$; на 15-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p = 0,025$; на 7-е сутки достоверность отличий между суммарными дозами 200 и 300 мг/кг ($p = 0,012$) и 250 и 300 мг/кг ($p = 0,040$); на 11-е сутки достоверность отличий между суммарными дозами 200 и 300 мг/кг ($p = 0,002$) и 250 и 300 мг/кг ($p = 0,003$); на 15-е сутки достоверность отличий между суммарными дозами 250 и 300 мг/кг ($p = 0,028$)

При применении разовой дозы 40 мг/кг (суммарная доза 200 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе противоопухолевое действие ЛХС-1006 непосредственно после окончания лечения: на 1-е сутки ТРО=79% ($p<0,001$), на 7-е — 78% ($p<0,001$), на 11-е — 57% ($p<0,002$).

При повышении разовой дозы до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) было достигнуто максимальное ТРО=90% ($p<0,001$) непосредственно в 1-й день после окончания лечения. Противоопухолевая эффективность отмечалась в последующие дни наблюдения: на 7-е сутки после окончания лечения торможение роста опухоли составило 70% ($p<0,001$), на 11-е сутки — 54% ($p<0,003$) и на 15-е сутки — 37% ($p<0,025$).

Доза 60 мг/кг (суммарная доза 300 мг/кг) вызывала достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=54% ($p=0,001$) непосредственно в 1-й день после окончания лечения. В последующие дни наблюдалось снижение противоопухолевой активности ЛХС-1006.

В опытных группах между суммарными дозами 200 мг/кг и 300 мг/кг ($p=0,012$), 250 мг/кг и 300 мг/кг ($p=0,040$) отличия были достоверными на 7-е сутки после окончания лечения; между суммарными дозами 200 мг/кг и 300 мг/кг ($p=0,002$), 250 мг/кг и 300 мг/кг ($p=0,003$) — на 11-е сутки и между суммарными дозами 250 мг/кг и 300 мг/кг ($p=0,028$) — на 15-е сутки после окончания лечения.

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

ЛХС-1040. Противоопухолевую активность ЛХС-1040 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 75 мг/кг (суммарные дозы 50–375 мг/кг), таблица 17, рисунок 16.

Таблица 17 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1040 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %					Гибель от токсичности	p к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20		
10	50	26	19	32	34	19	0/6	>0,05
25	125	55*	28	34	13	+3**	0/6	0,021*
50	250	59*	34	34	30	21	0/6	0,011*
75	375	84*	51	45	41	18	3/6***	<0,001*

** знак „+“ означает стимуляцию роста опухоли;
 *** n/n - число павших к общему числу животных в группе

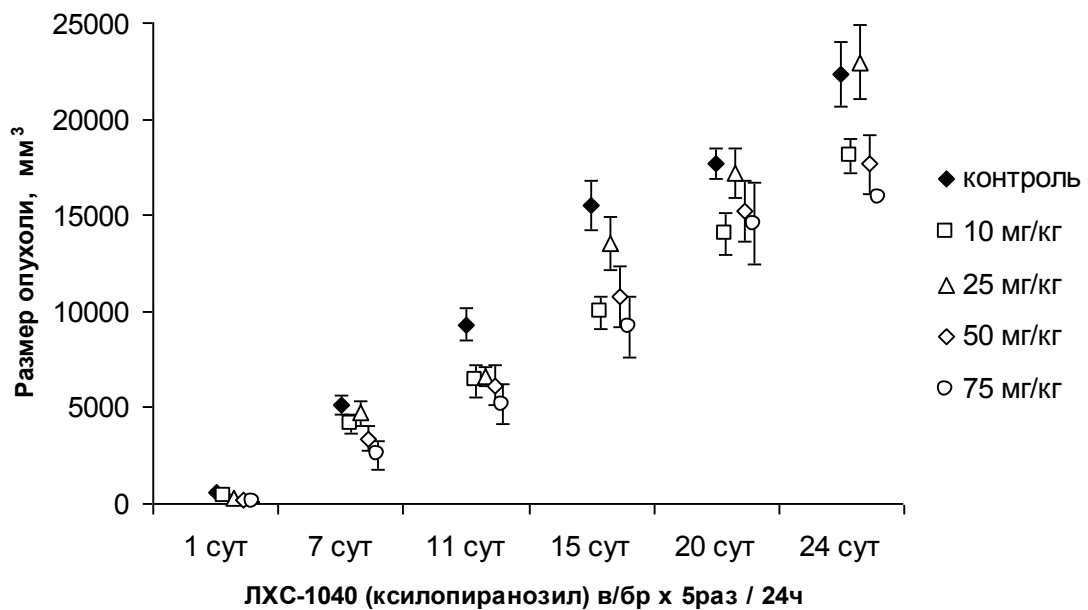


Рисунок 16 — Динамика изменения размера опухоли LLC при различных дозах ЛХС-1040, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,021$; на 1-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,011$; на 1-е сутки доза 75 мг/кг против контроля $p<0,001$; достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 375 мг/кг ($p=0,036$) на 1-е сутки

Доза 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) оказалась неэффективной и в указанные сроки наблюдения статистически значимых различий по отношению к контрольной группе не проявила ($p > 0,05$).

Повышение дозы продемонстрировало явный дозозависимый эффект. Так, в дозе 25 мг/кг ТРО составило 55% ($p = 0,021$), в дозе 50 мг/кг — 59% ($p = 0,011$), в дозе 75 мг/кг — 84% ($p < 0,001$) непосредственно после окончания лечения.

В опытных группах отличия были достоверными на 1-е сутки после окончания лечения только между суммарными дозами 50 мг/кг и 375 мг/кг ($p = 0,036$).

На 11-е и 15-е сутки наблюдения в группе, получавшей ЛХС-1040 в дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг), отмечалась тенденция к замедлению роста опухоли по сравнению с контролем ($p = 0,082$ и $p = 0,078$ соответственно). При этом доза 75 мг/кг оказалась летальной (LD_{50}) и приводила к гибели мышей на 3-5-е сутки после окончания лечения (на 9-11-е сутки после трансплантации LLC).

Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных на 15% от исходного веса, снижении двигательной активности. При аутопсии масса селезенки была в 1,5 раза меньше, чем у контрольной группы животных.

Ранее, в опытах на мышах-самках BDF_1 с лимфолейкозом P388, суммарная доза 375 мг/кг не вызывала гибели животных от токсичности, что, вероятно, связано с чувствительностью к ЛХС-1040 мышей-самцов BDF_1 с LLC.

ЛХС-976. Противоопухолевую активность ЛХС-976 (*13-метил-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион*) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах от 10 до 75 мг/кг (суммарные дозы 50–375 мг/кг), таблица 18, рисунок 17.

При применении ЛХС-976 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=68% только на 1-е сутки после окончания лечения ($p = 0,041$).

Суммарные дозы 125, 250 и 375 мг/кг в указанные сроки наблюдения не проявили статистически значимых различий по отношению к контрольной группе

($p > 0,05$). Противоопухолевое действие ЛХС-976 в исследуемых дозах оказалось также недостоверным при сравнении между опытными группами ($p > 0,05$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

Таблица 18 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-976 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
10	50	68*	33	32	19	+1**	9	0,041*
25	125	58	15	24	17	+7	8	>0,05
50	250	24	22	39	26	20	23	>0,05
75	375	47	20	30	22	12	6	>0,05

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

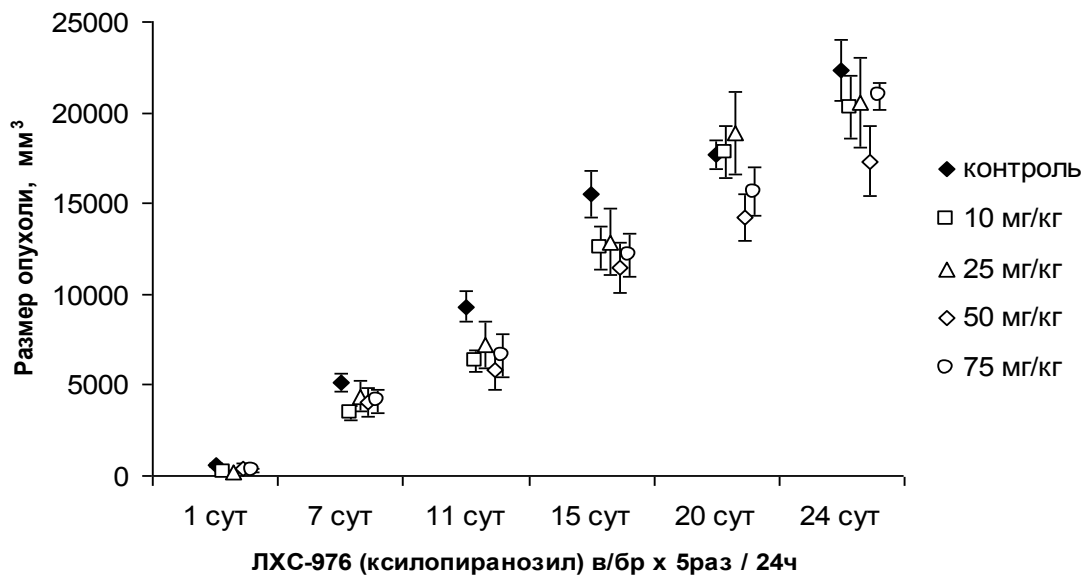


Рисунок 17 — Динамика изменения размера опухоли LLC при различных дозах ЛХС-976, средние и стандартные: ошибки на 1-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p = 0,041$

ЛХС-983. Противоопухолевую активность ЛХС-983 (12- (β -D - ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах от 10 до 100 мг/кг (суммарные дозы 50–500 мг/кг), таблица 19, рисунок 18.

Таблица 19 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-983 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						Гибель от токсичности
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
10	50	+24*	+3	12	3	17	15	0/6
25	125	0	33	19	16	+3	24	0/6
50	250	+10	+9	35	44	40	40	0/6
100	500	+53	31	46	46	35	49	2/6**

* знак «+» означает стимуляцию роста опухоли;

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

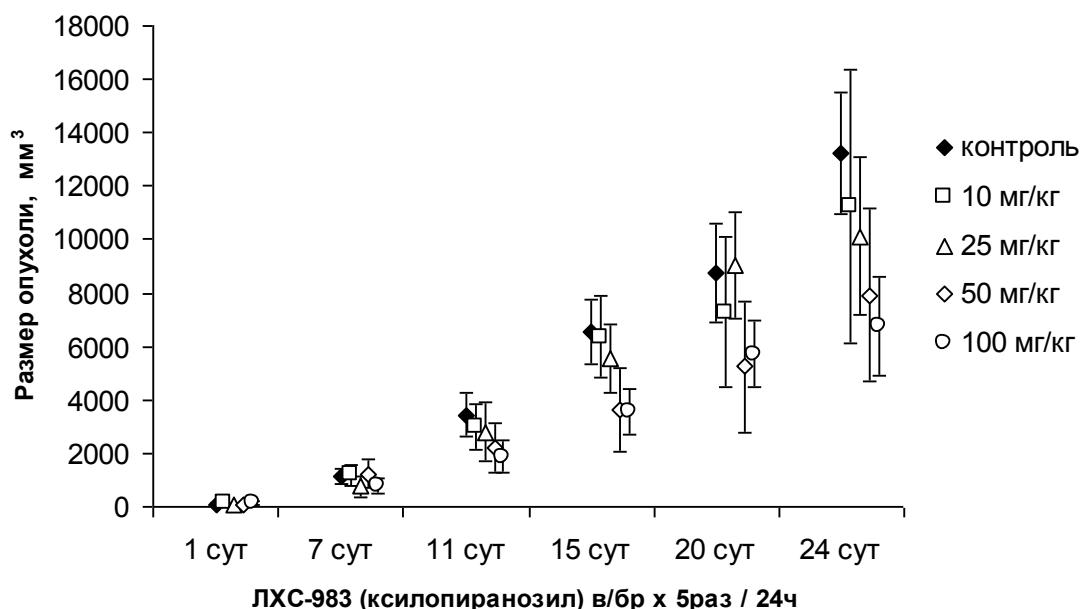


Рисунок 18 — Изменение размера опухоли LLC в зависимости от дозы ЛХС-983, средние и стандартные ошибки. Статистически значимых отличий не выявлено

Исследуемые дозы оказались неактивными в отношении эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) мышей и в указанные сроки наблюдения статистически значимого противоопухолевого эффекта не проявили ($p > 0,05$).

Разовая доза 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) вызывала гибель мышей в 33% случаев на 5-е и 8-е сутки после окончания лечения (на 11-е и 14-е сутки после трансплантации LLC).

Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных на 20% от исходного веса, снижении двигательной активности.

ЛХС-1098. Противоопухолевую активность ЛХС-1098 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10, 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50, 125 и 250 мг/кг), таблица 20, рисунок 19.

Таблица 20 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1098 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				p к контр. группе
		Дни после окончания лечения				
		1	7	11	15	
10	50	+35**	+2	+7	+15	>0,05
25	125	67*	40*	24	21	0,003*
50	250	39	9	14	0	>0,05
** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли						

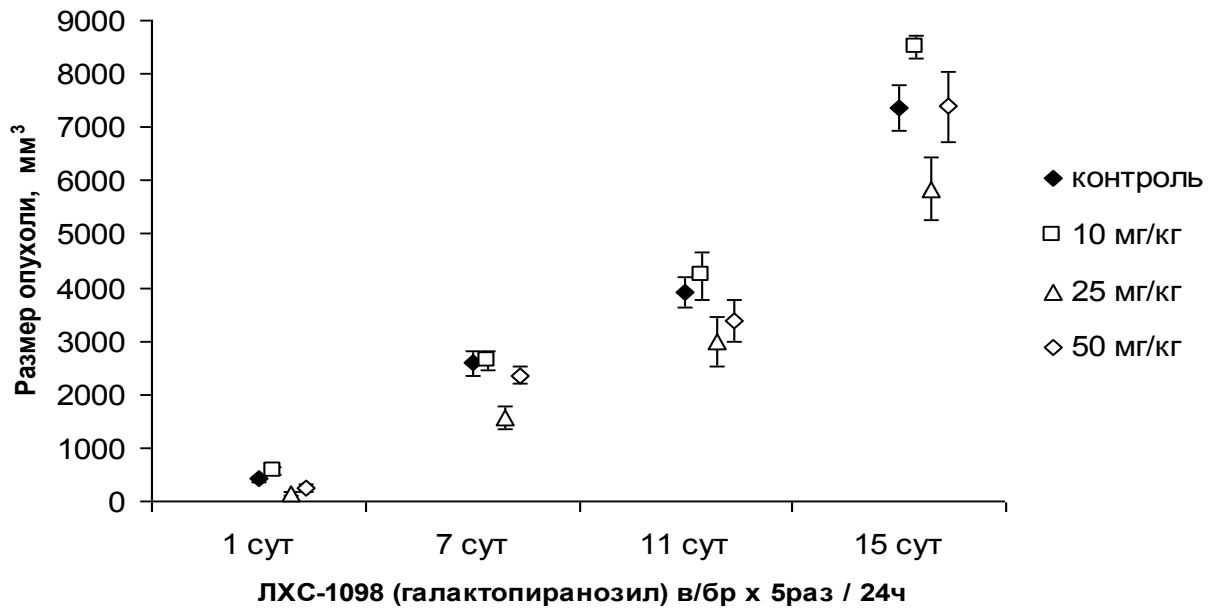


Рисунок 19 — Динамика изменения размера опухоли LLC в зависимости от дозы ЛХС-1098, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,026$; на 7-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,003$; достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 125 мг/кг на 1-е ($p=0,007$), 7-е ($p=0,003$) и 15-е ($p=0,005$) сутки

Доза 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) оказалась неэффективной и в указанные сроки наблюдения статистически значимых различий по отношению к контрольной группе не проявила ($p>0,05$). Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) вызывало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли непосредственно в 1-й день и на 7-е сутки после окончания лечения: ТРО=67% ($p=0,026$) и ТРО=40% ($p=0,003$). Кроме того, в опытных группах между суммарными дозами 125 мг/кг и 50 мг/кг отличия были достоверными на 1-е ($p=0,007$), 7-е ($p=0,003$) и 15-е ($p=0,005$) сутки после окончания лечения.

При применении ЛХС-1098 в суммарной дозе 250 мг/кг статистически значимых различий по отношению к контрольной группе и при сравнении между опытными группами не обнаружено ($p>0,05$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не отмечалась.

ЛХС-999. Противоопухолевую активность ЛХС-999 (12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 125 и 150 мг/кг (суммарные дозы 625 и 750 мг/кг), таблица 21, рисунок 20. При применении разовой дозы 125 мг/кг (суммарная доза 625 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе противоопухолевое действие ЛХС-999 на 1-е (ТРО=90%, $p=0,016$) и на 11-е (ТРО=62%, $p=0,017$) сутки после окончания лечения. Повышение разовой дозы до 150 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг) продемонстрировало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли на 1-е, 11-е и 15-е сутки после окончания лечения: ТРО=65% ($p=0,006$), ТРО=46% ($p=0,003$) и ТРО=43% ($p=0,045$) соответственно. Однако разовая доза 150 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг) вызывала гибель мышей в 12% случаев непосредственно после окончания лечения (на 7-е сутки после трансплантации LLC). Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела на 20% от исходного веса, снижении двигательной активности. При аутопсии масса селезенки была в 2 раза меньше, чем у контрольной группы животных, что указывало на гематологическую токсичность ЛХС-999 в суммарной дозе 750 мг/кг.

Таблица 21 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-999 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %						Гибель от токсич- ности
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20	24	
125	625	90*	77	62*	48	45	58	0/8
150	750	65*	60	46*	43*	53	55	1/8**
* $p < 0,05$ по отношению к контролю;								
** n/n - число павших к общему числу животных в группе								

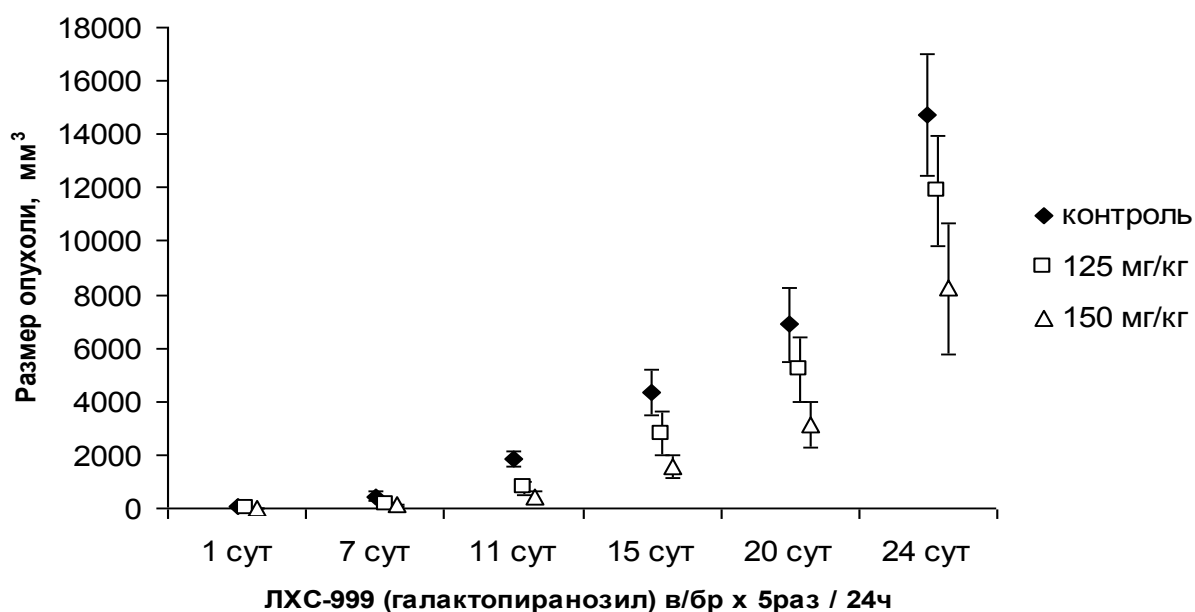


Рисунок 20 — Динамика изменения размера опухоли LLC в зависимости от дозы ЛХС-999, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 125 мг/кг против контроля $p=0,016$; на 1-е сутки доза 150 мг/кг против контроля $p=0,006$; на 11-е сутки доза 125 мг/кг против контроля $p=0,017$; на 11-е сутки доза 150 мг/кг против контроля $p=0,003$; на 15-е сутки доза 150 мг/кг против контроля $p=0,045$

ЛХС-985. Противоопухолевую активность ЛХС-985 (*12-(β-D-рибопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 100 мг/кг (суммарные дозы 50–500 мг/кг), таблица 22, рисунок 21.

При применении ЛХС-985 в дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) статистически значимых различий по отношению к контрольной группе в указанные сроки наблюдения не обнаружено ($p>0,05$). Повышение дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) показало достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=38% только на 11-е сутки после окончания лечения ($p=0,018$). В дозе 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) отмечалось достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=56% ($p=0,001$) на 7-е сутки после окончания лечения. Отличия между суммарными дозами 500 мг/кг и 50 мг/кг были также достоверными на 7-е сутки после окончания лечения ($p=0,002$).

Суммарные дозы 250 и 375 мг/кг в указанные сроки наблюдения на LLC были неэффективными и статистически значимых различий не проявили ($p > 0,05$).

Таблица 22 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-985 от дозы при внутрибрюшинном введении на LLC

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				р к контр. группе
		Дни после окончания лечения				
		1	7	11	15	
10	50	45	30	26	+3	>0,05
25	125	56	36	38*	4	0,018*
50	250	25	26	3	+17**	>0,05
75	375	16	17	9	6	>0,05
100	500	51	56*	25	12	0,001*

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

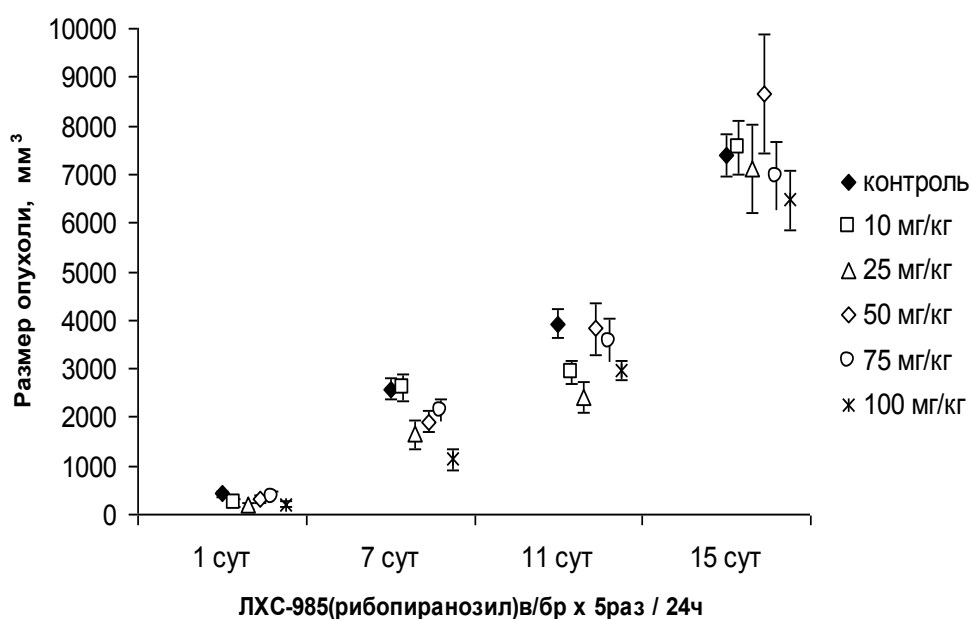


Рисунок 21 — Динамика изменения размера опухоли LLC в зависимости от дозы ЛХС-985, средние и стандартные ошибки: на 7-е сутки доза 100 мг/кг против контроля $p=0,001$; на 11-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,018$; на 7-е сутки достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 500 мг/кг $p=0,002$

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

Таким образом показано, что на эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC) мышей при пятикратном внутрибрюшинном введении ЛХС-1208, ЛХС-1006 и ЛХС-999 в разовых дозах 75, 50 и 125 мг/кг соответственно, проявили высокий статистически значимый противоопухолевый эффект непосредственно после окончания лечения: ТРО=91% ($p=0,012$), ТРО=90% ($p<0,001$) и ТРО=90% ($p=0,016$), соответственно. При этом противоопухолевая активность ЛХС-1006 наблюдалась в течение 11 дней после окончания лечения: на 7-е сутки ТРО составило 70% ($p<0,001$), на 11-е сутки — 54% ($p<0,003$). Длительность противоопухолевого эффекта ЛХС-999 сохранялась до 11-го дня наблюдения: ТРО=62% ($p=0,017$).

ЛХС-1098, ЛХС-1040 и ЛХС-976 в разовых дозах 25, 50 и 10 мг/кг, соответственно, обнаружили противоопухолевую активность в отношении LLC только на 1-е сутки после окончания лечения: ТРО составляло 67% ($p=0,026$), 59% ($p=0,011$) и 68% ($p=0,041$).

ЛХС-985 в разовой дозе 100 мг/кг вызывал ТРО=56% ($p=0,001$) на 7-е сутки после окончания лечения.

ЛХС-1007 в разовой дозе 40 мг/кг проявил противоопухолевую активность, но ниже минимального критерия эффективности: ТРО=48% ($p=0,05$).

При применении ЛХС-1054 и ЛХС-983 на модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) мышей в исследуемых дозах статистически значимых различий по отношению к контролю не выявлено.

3.3 Скрининг производных индолокарбазолов на модели меланомы В16 мышей

ЛХС-1208. Противоопухолевую активность ЛХС-1208 (*6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3- a]пирроло[3,4- c]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10, 50 и 100 мг/кг (суммарные дозы 50, 250 и 500 мг/кг), таблица 23, рисунок 22.

Таблица 23 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1208 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %			р к контр. группе
		Дни после окончания лечения			
		1	7	11	
10	50	61	+28**	3	>0,05
50	250	69*	13	7	0,016*
100	500	91*	58	11	0,001*

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

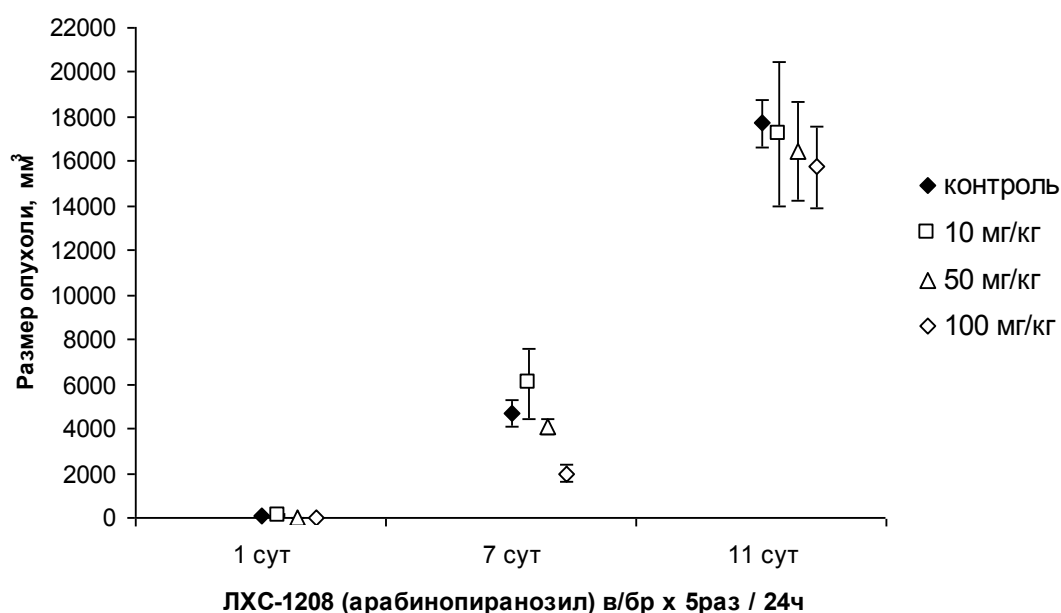


Рисунок 22 — Изменения размера опухоли В16 при различных дозах ЛХС-1208, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,016$; на 1-е сутки доза 100 мг/кг против контроля $p=0,001$; достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 250 мг/кг на 1-е сутки ($p=0,016$); достоверность отличий между суммарными дозами 50 и 500 мг/кг на 1-е ($p=0,002$) и 7-е ($p=0,013$) сутки

При применении ЛХС-1208 в дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) статистически значимых различий по отношению к контрольной группе в

указанные сроки наблюдения не обнаружено ($p > 0,05$). Повышение дозы продемонстрировало явный дозозависимый эффект. Так, в дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) ТРО составило 69% ($p = 0,016$), в дозе 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) — 91% ($p = 0,001$) непосредственно в 1-й день после окончания лечения.

В опытных группах отличия были достоверными между суммарными дозами 250 мг/кг и 50 мг/кг ($p = 0,016$) на 1-е сутки после окончания лечения и между суммарными дозами 500 мг/кг и 50 мг/кг — на 1-е ($p = 0,002$) и 7-е ($p = 0,013$) сутки после окончания лечения.

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

ЛХС-1054. Противоопухолевую активность ЛХС-1054 (6-[2-морфолиноэтил]-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутривентральном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 150 мг/кг (суммарные дозы 50-750 мг/кг), таблица 24, рисунок 23. Дозы 10 и 25 мг/кг (суммарные дозы 50 и 125 мг/кг) оказались неактивными в отношении меланомы В-16 мышей и в указанные сроки наблюдения статистически значимого противоопухолевого эффекта не проявили ($p > 0,05$). При применении ЛХС-1054 в разовых дозах 75 и 150 мг/кг (суммарные дозы 375 и 750 мг/кг) наблюдалось достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли непосредственно в 1-й день после окончания лечения: ТРО=56% ($p = 0,019$) и ТРО=77% ($p = 0,001$), соответственно. Однако разовая доза 150 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг) оказалась токсичной и вызывала гибель мышей в 16% случаев на 5-е сутки после окончания лечения (на 11-е сутки после трансплантации В-16). Признаки токсичности выражались в снижении двигательной активности и уменьшении массы тела на 10% от исходного веса. При аутопсии отмечены спайки в брюшной полости.

Таблица 24 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1054 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %					Гибель от токсич- ности	р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	15	20		
10	50	41	+24**	+26	+22	1	0/6	>0,05
25	125	18	+74	+35	+5	12	0/6	>0,05
75	375	56*	+6	+25	+12	+11	0/6	0,019*
150	750	77*	4	+21	5	3	1/6***	0,001*

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли;

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

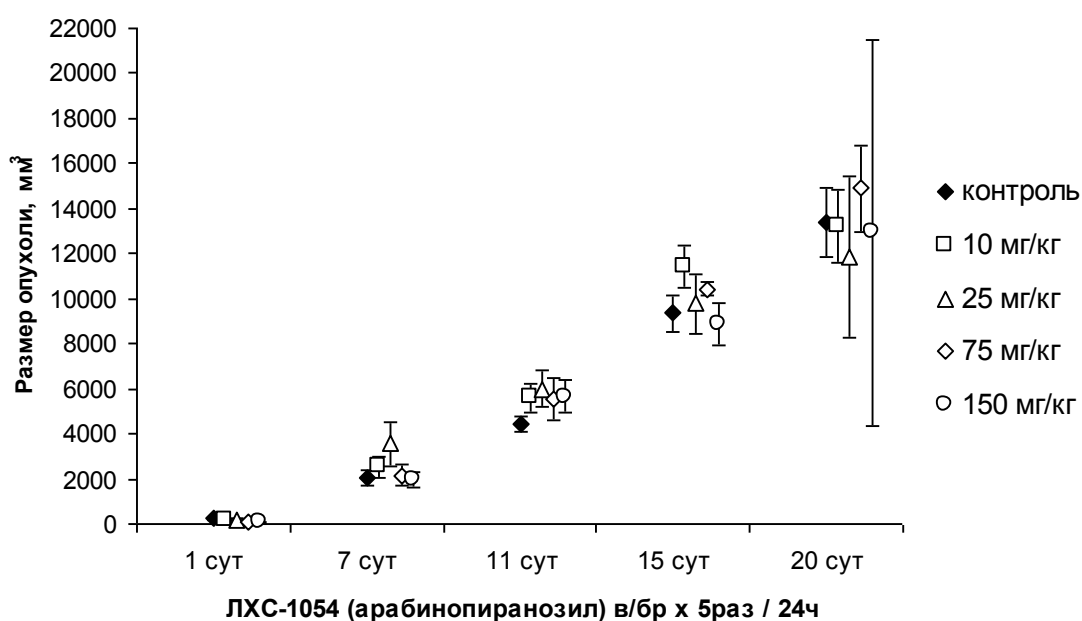


Рисунок 23 — Изменения размера опухоли В16 при различных дозах ЛХС-1054. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 75 мг/кг против контроля $p=0,019$; на 1-е сутки доза 150 мг/кг против контроля $p=0,001$

ЛХС-1007 (*13-метил-12-(α -L-арабинопиранозил)9-броминдоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 30 и 40 мг/кг (суммарные дозы 150 и 200 мг/кг), таблица 25, рисунок 24. ЛХС-1007 в исследуемых дозах оказался неактивным в отношении меланомы В-16 мышей. В указанные сроки наблюдения статистически значимого противоопухолевого эффекта не обнаружено ($p > 0,05$). Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не наблюдалась.

Таблица 25 — Противоопухолевый эффект ЛХС-1007 при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %			
		Дни после окончания лечения			
		1	7	11	15
30	150	51	4	17	10
40	200	53	18	17	36

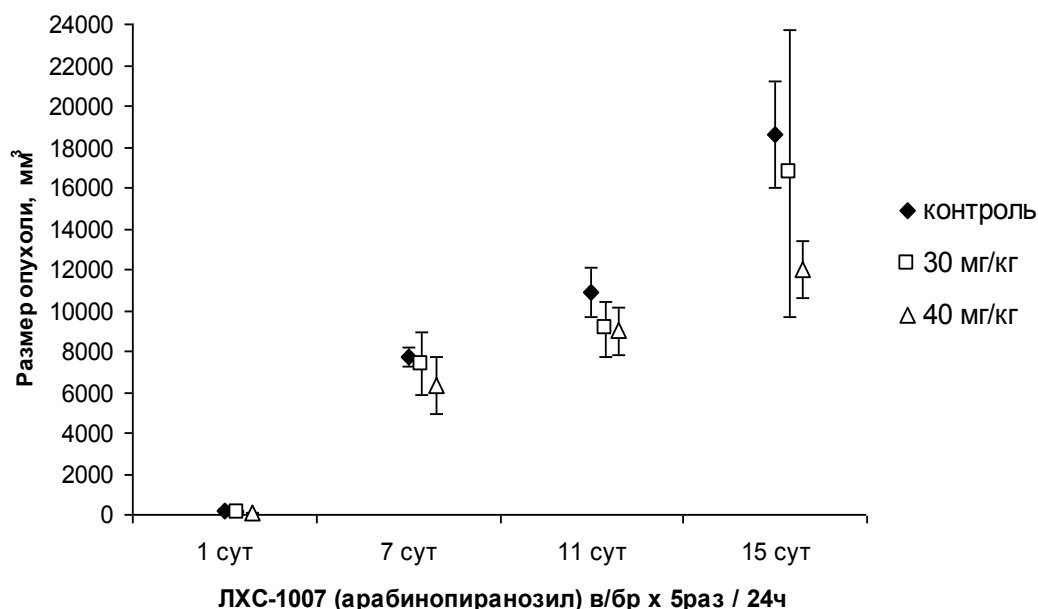


Рисунок 24 — Изменения размера опухоли В16 в зависимости от дозы ЛХС-1007: средние и стандартные ошибки. Статистически значимых различий не выявлено

ЛХС-1006 (12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион) при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовой дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) показал невысокое, но достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли на 7-е и 11-е сутки после окончания лечения: ТРО=35% ($p=0,013$) и ТРО=20% ($p=0,026$), таблица 26, рисунок 25. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

Таблица 26 — Противоопухолевый эффект ЛХС-1006 при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %			р к контр. группе
		Дни после окончания лечения			
		1	7	11	
50	250	46	35*	20**	0,013*
** $p=0,026$ по отношению к контролю					

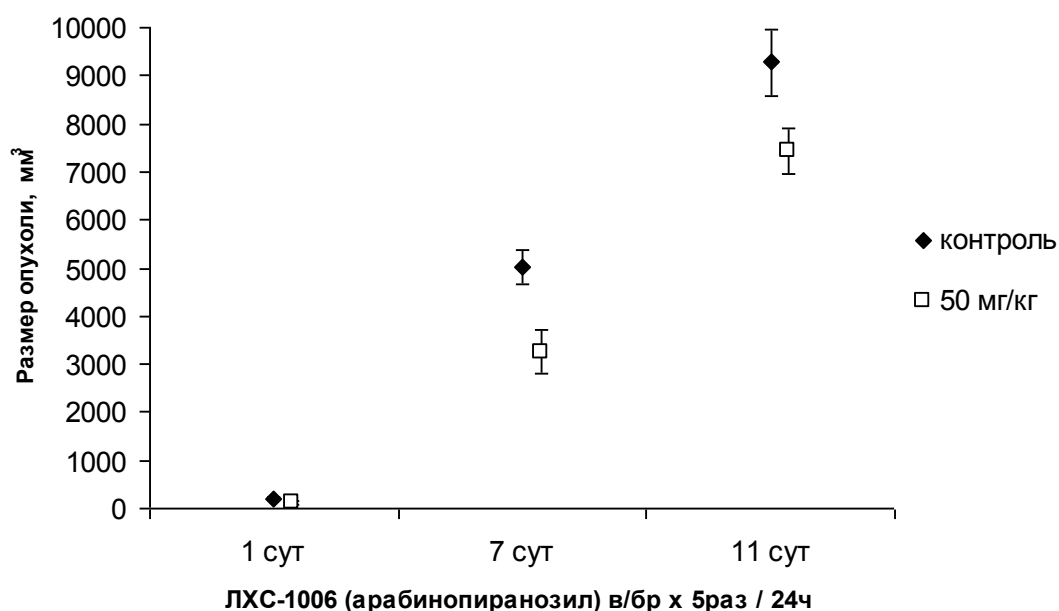


Рисунок 25 — Динамика изменения размера опухоли В16 при внутрибрюшинном введении ЛХС-1006. Средние и стандартные ошибки: на 7-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,013$; на 11-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,026$

ЛХС-1040. Противоопухолевую активность ЛХС-1040 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 125 и 250 мг/кг), таблица 27, рисунок 26.

Таблица 27 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1040 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				Гибель от токсич- ности	р к контр. группе
		Дни после окончания лечения					
		1	7	11	15		
25	125	48	+5**	14	29	0/6	>0,05
50	250	80*	37	8	21	1/6	0,011*

** - знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

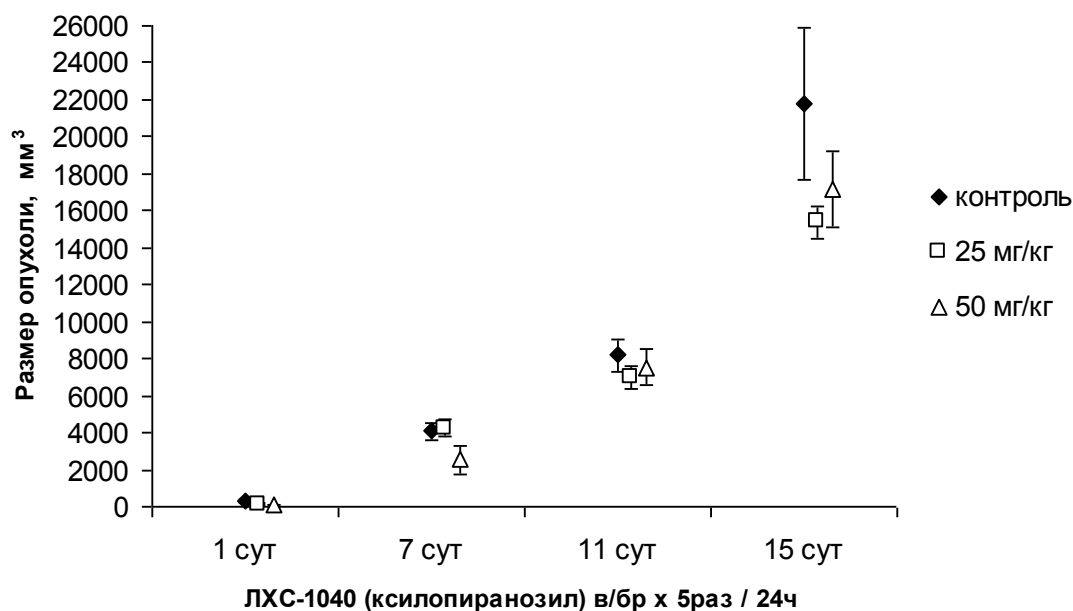


Рисунок 26 — Динамика изменения размера опухоли В16 при различных дозах ЛХС-1040. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,011$

Доза 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) оказалась неэффективной и в указанные сроки наблюдения статистически значимых различий по отношению к контрольной группе не проявила ($p > 0,05$). Повышение разовой дозы до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) вызывало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли непосредственно после окончания лечения: ТРО=80% ($p=0,011$). Далее эффект резко снижался. Однако доза 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) приводила к гибели мышей на 6-е сутки после окончания лечения (на 12-е сутки после трансплантации В-16). Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела на 26% от исходного веса, снижении двигательной активности. При аутопсии отмечены спайки в брюшной полости, масса селезенки была в 3,5 раза меньше, чем у контрольной группы животных, что указывало на гематологическую токсичность ЛХС-1040 в суммарной дозе 250 мг/кг.

ЛХС-976. Противоопухолевую активность ЛХС-976 (*13-метил-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10 и 25 мг/кг (суммарные дозы 50 и 125 мг/кг), таблица 28, рисунок 27.

Таблица 28 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-976 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %			р к контр. группе
		Дни после окончания лечения			
		1	7	11	
10	50	70*	36**	11	0,002*
25	125	52*	17	7	0,019*
** $p=0,022$ по отношению к контролю					

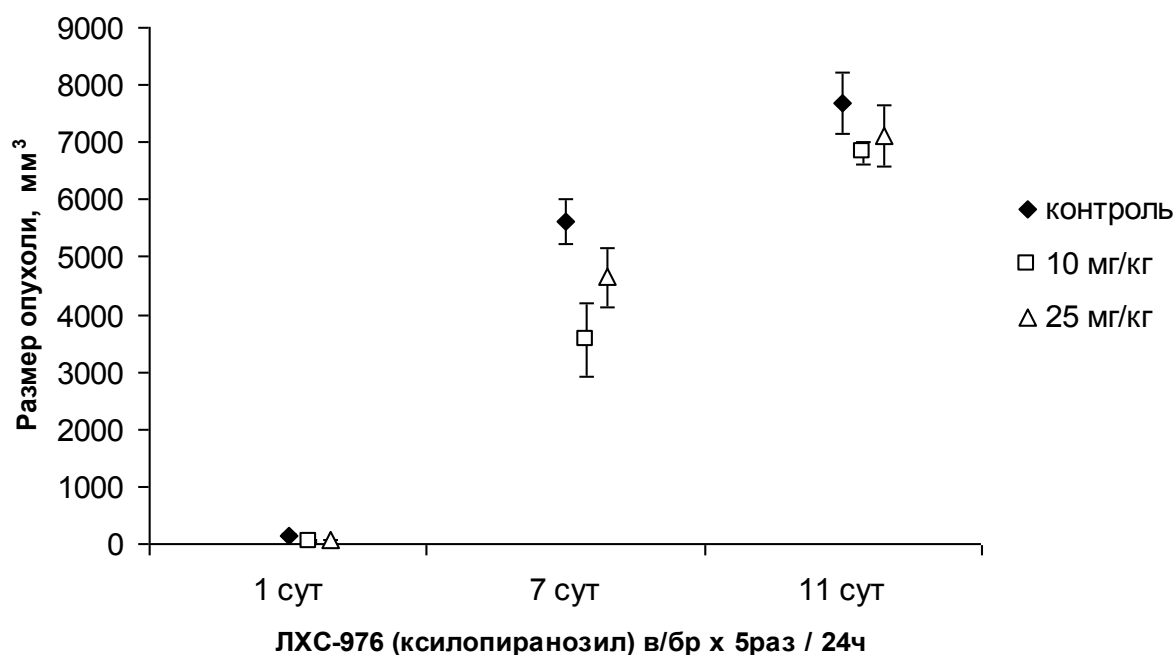


Рисунок 27 — Динамика изменения размера опухоли В16 в зависимости от дозы ЛХС-976. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p=0,002$; на 1-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,019$; на 7-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p=0,022$

При применении разовой дозы 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе противоопухолевое действие ЛХС-976 в 1-е и 7-е сутки после окончания лечения: ТРО=70% ($p=0,002$) и 36% ($p=0,022$) соответственно.

Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) продемонстрировало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли только в 1-е сутки после окончания лечения: ТРО=52% ($p=0,019$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

ЛХС-983. Противоопухолевую активность ЛХС-983 (12- (β -D - ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50 и 250 мг/кг), таблица 29, рисунок 28.

Таблица 29 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-983 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				Гибель от токсичности	р к контр. группе
		Дни после окончания лечения					
		1	7	11	15		
10	50	84*	45*	42*	26	0/6	$\leq 0,016^*$
50	250	96*	44*	25	+8**	1/7***	0,005*

** знак «+» означает стимуляцию роста опухоли;

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

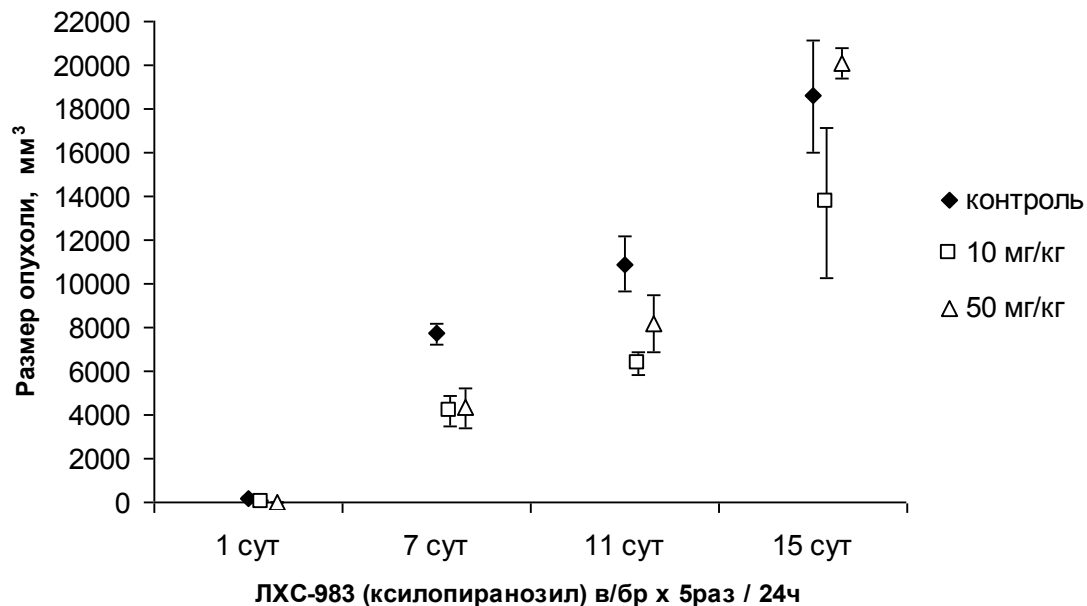


Рисунок 28 — Изменение размера опухоли В16 в зависимости от дозы ЛХС-983. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p=0,014$; на 1-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,005$; на 7-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p=0,002$; на 7-е сутки доза 50 мг/кг против контроля $p=0,005$; на 11-е сутки доза 10 мг/кг против контроля $p=0,016$

Доза 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) вызывала достоверное по отношению к контрольной группе ТРО=84% ($p=0,014$) в 1-й день после окончания лечения, на 7-е сутки — 45% ($p=0,002$), на 11-е — 42% ($p=0,016$).

При повышении разовой дозы до 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) было достигнуто максимальное ТРО=96% ($p=0,005$) непосредственно в 1-й день после окончания лечения. В последующие дни наблюдения суммарная доза 250 мг/кг вызывала гибель мышей на 6-е сутки после окончания лечения (на 12-е сутки после трансплантации В-16), что оказало влияние на снижение противоопухолевой эффективности ЛХС-983: на 7-е сутки — ТРО=44% ($p=0,005$), далее $p>0,05$. Признаки токсичности проявлялись в снижении двигательной активности и уменьшении массы тела на 20% от исходного веса.

ЛХС-1098. Противоопухолевую активность ЛХС-1098 (6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) изучали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10 и 25 мг/кг (суммарные дозы 50 и 125 мг/кг), таблица 30, рисунок 29.

Таблица 30 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-1098 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				p к контр. группе
		Дни после окончания лечения				
		1	7	11	15	
10	50	32	17	19	29	> 0,05
25	125	78*	36**	27	36	0,006*
** $p=0,039$ по отношению к контролю						

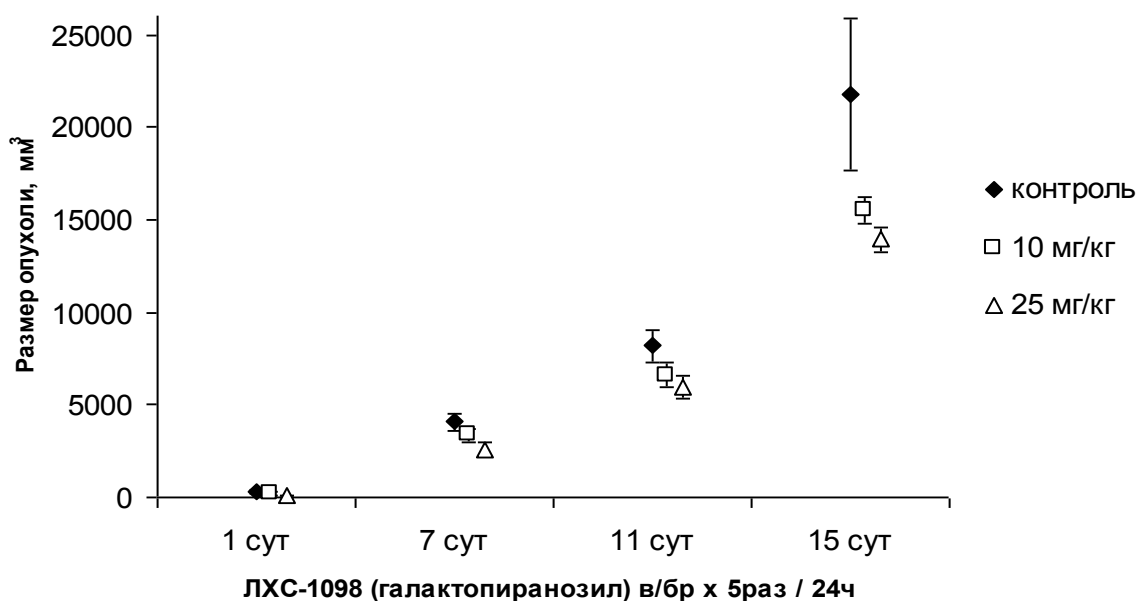


Рисунок 29 — Изменение размера опухоли В16 в зависимости от дозы ЛХС-1098. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,006$; на 7-е сутки доза 25 мг/кг против контроля $p=0,039$

Доза 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) оказалась неэффективной и в указанные сроки наблюдения статистически значимых различий по отношению к контрольной группе не проявила ($p>0,05$).

Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) вызывало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли в 1-е и 7-е сутки после окончания лечения: ТРО=78% ($p=0,006$) и ТРО=36% ($p=0,039$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не отмечалась.

ЛХС-999. Противоопухолевую активность ЛХС-999 (*12-(β-D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион*) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в диапазоне разовых доз от 5 до 125 мг/кг (суммарные дозы 25-625 мг/кг), таблица 31, рисунок 30.

Таблица 31 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-999 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				
		Дни после окончания лечения				
		1	7	11	15	20
5	25	33	11	+46*	+17	+2
10	50	15	+6	+32	+6	0
25	125	7	29	+21	2	17
125	625	34	7	+22	+14	+1

* знак «+» означает стимуляцию роста опухоли

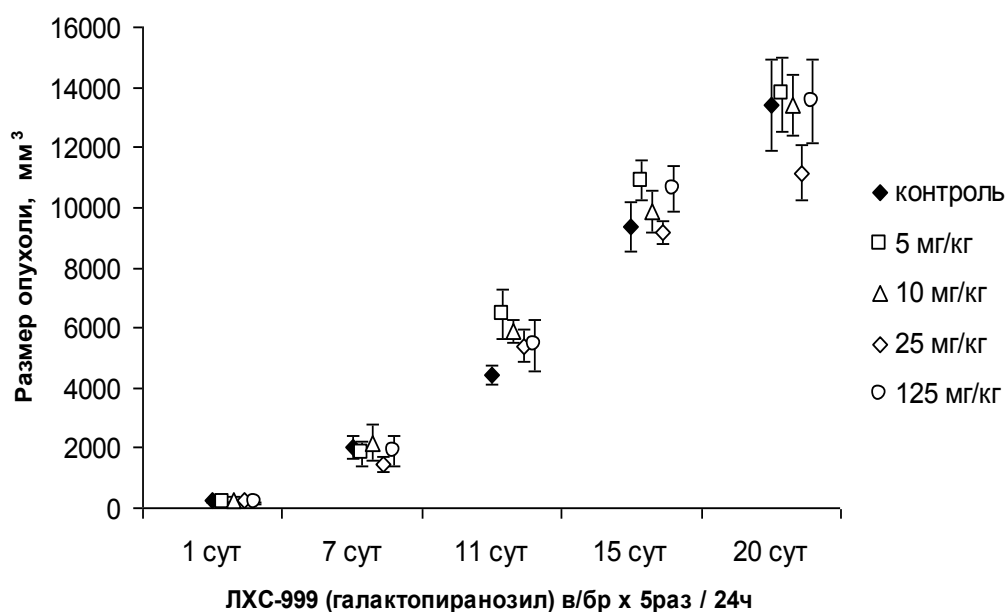


Рисунок 30 — Динамика изменения размера опухоли В16 при различных дозах ЛХС-999, средние и стандартные ошибки. Статистически значимых различий не выявлено

Исследуемые дозы оказались неактивными в отношении меланомы В-16 мышей и в указанные сроки наблюдения статистически значимого противоопухолевого эффекта не проявили ($p > 0,05$).

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не наблюдалась.

ЛХС-985. Противоопухолевую активность ЛХС-985 (12-(β -D-рибопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион) исследовали при пятикратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 10, 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50–250 мг/кг), таблица 32, рисунок 31.

Таблица 32 — Зависимость противоопухолевой активности ЛХС-985 от дозы при внутрибрюшинном введении на меланоме В16

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				р к контр. группе
		Дни после окончания лечения				
		1	7	11	15	
10	50	32	8	5	16	>0,05
25	125	70	35*	19	2	0,020*
50	250	74**	38*	30	31	0,012*

** р=0,045 по отношению к контролю

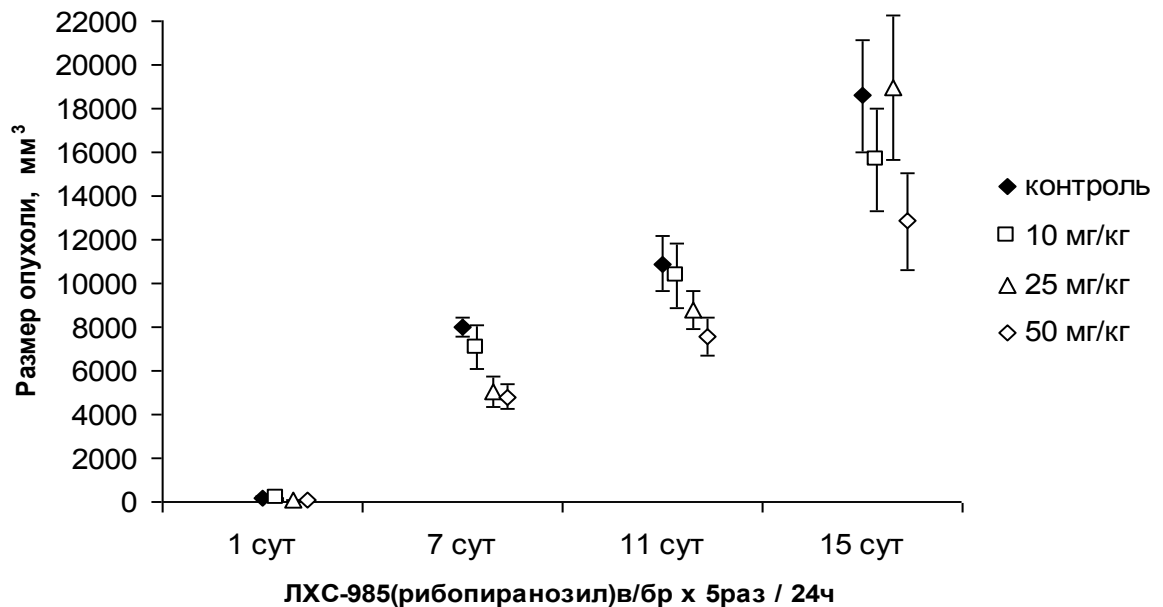


Рисунок 31 — Динамика изменения размера опухоли В16 при различных дозах ЛХС-985, средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 50 мг/кг против контроля р=0,045; на 7-е сутки доза 25 мг/кг против контроля р=0,020; на 7-е сутки доза 50 мг/кг против контроля р=0,012

Доза 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) оказалась неэффективной и в указанные сроки наблюдения статистически значимых различий по отношению к контрольной группе не проявила ($p > 0,05$).

Повышение дозы показало дозозависимый эффект: в дозе 25 мг/кг на 7-е сутки после окончания лечения ТРО составило 35% ($p = 0,020$), в дозе 50 мг/кг в 1-е и 7-е сутки после окончания лечения — 74% ($p = 0,045$) и 38% ($p = 0,012$) соответственно.

Переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей в указанные сроки наблюдения не отмечалась.

Таким образом, на меланоме В16 мышей при пятикратном внутрибрюшинном введении ЛХС-1208, ЛХС-1040 и ЛХС-983 в разовых дозах 100, 50 и 10 мг/кг, соответственно, обнаружен высокий статистически значимый противоопухолевый эффект непосредственно после окончания лечения: ТРО=91% ($p = 0,001$), ТРО=80% ($p = 0,011$) и ТРО=84% ($p = 0,014$). При применении ЛХС-1040 и ЛХС-983 в суммарной дозе 250 мг/кг наблюдалась гибель мышей в 16 и 14% случаев соответственно. ЛХС-1098, ЛХС-985 и ЛХС-976 в разовых дозах 25, 50 и 10 мг/кг, соответственно, проявили противоопухолевую активность в 1-е сутки после окончания лечения: ТРО составило 78% ($p = 0,006$), 74% ($p = 0,045$) и 70% ($p = 0,002$). ЛХС-1054 в разовой дозе 75 мг/кг вызывал ТРО=56% ($p = 0,019$). Увеличение разовой дозы до 150 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг) инициировало гибель мышей в 16% случаев. ЛХС-1006 в разовой дозе 50 мг/кг продемонстрировал противоопухолевую активность, но ниже минимального критерия эффективности: ТРО=35% ($p = 0,013$). При применении ЛХС-1007 и ЛХС-999 на меланоме В16 мышей в исследуемых дозах статистически значимых различий по отношению к контролю не выявлено.

В результате скрининга 10 соединений N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов установлено, что все соединения в оптимальных терапевтических дозах обнаружили активность по УПЖ мышей с лимфолейкозом Р388, соединения ЛХС-1054 и ЛХС-983 оказались неэффективными в отношении эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC), соединения ЛХС-1007, ЛХС-

1040 и ЛХС-999 не проявили противоопухолевой активности на меланоме В16 (таблицы 33 и 34).

Как наиболее активные отмечены соединения ЛХС-1208, ЛХС-976, ЛХС-985 и ЛХС-1098, отличающиеся друг от друга структурой и агликона, и гликозидного остатка. При этом только арабинопиранозил ЛХС-1208 показал высокую эффективность на опухолевых моделях мышей Р388 (УПЖ=119%, $p<0,001$), LLC (ТРО=91%, $p=0,012$) и В16 (ТРО=91%, $p=0,001$), что позволило отобрать его для дальнейшего изучения (таблица 33).

Таблица 33 — 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%, $p\leq 0,05$	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%, $p\leq 0,001$	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			

Таблица 34 — 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.

ГЛАВА 4

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛХС-1208
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ**

4.1 Цитотоксичность субстанции ЛХС-1208¹

Тестирование чувствительности противоопухолевых препаратов на панели клеточных линий входит в стандартную схему первичной оценки антипролиферативного эффекта субстанции и позволяет установить зависимость эффекта от метаболических особенностей клеток или биологическую мишень.

Цитотоксичность субстанции ЛХС-1208 была оценена на ряде культур опухолевых клеток человека. Экспериментальные результаты приведены в таблица 35.

Таблица 35 — Спектр цитотоксического действия ЛХС-1208

Линии клеток	IC ₅₀ , мкМ
НСТ-116 – рак толстой кишки	5
LS174Т – рак толстой кишки	8
SKOV3 – рак яичников	8
DU145 – рак предстательной железы	18
MeWo - меланома	26
MCF-7 – рак молочной железы	100

К действию ЛХС-1208 наиболее чувствительной оказались клетки рака толстой кишки линий НСТ-116 (IC₅₀=5 мкМ) и LS174Т (IC₅₀=8 мкМ). Такое же высокое цитотоксическое действие наблюдалась на клетках рака яичников SKOV3 (IC₅₀=8 мкМ). На порядок ниже была цитотоксическая активность в

¹ Исследования проведены к.б.н. О.С. Жуковой, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

отношении клеток рака предстательной железы DU145 ($IC_{50}=18$ мкМ) и меланомы MeWo ($IC_{50}=26$ мкМ) и на два порядка ниже — рака молочной железы MCF-7 ($IC_{50}=100$ мкМ).

Результаты первичной оценки цитотоксичности на культурах клеток НСТ-116 и LS174T явились основанием для дальнейшего экспериментального изучения субстанции ЛХС-1208 на перевиваемой модели аденокарциномы толстой кишки мышей АКАТОЛ. Для оценки чувствительности к ЛХС-1208 использовали также другие перевиваемые опухоли мышей: рак шейки матки РШМ5 и лимфолейкоз L1210. Исследования проводили при пятикратном в/бр введении ЛХС-1208 в эффективных дозах 50, 75 и 100 мг/кг, установленных ранее в сравнительных экспериментах на опухолевых моделях мышей P388, LLC и B16.

4.2 Определение чувствительности к ЛХС-1208 аденокарциномы толстой кишки мышей АКАТОЛ

Исследование проводилось при пятикратном в/бр введении ЛХС-1208 в разовых дозах 75 и 100 мг/кг (суммарные дозы 375 и 500 мг/кг), таблица 36, рисунок 32.

Таблица 36 — Противоопухолевое действие ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении мышам с АКАТОЛ

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсич ности	р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	16			
75	375	97**	97*	86*	62*	36	0/8	$\leq 0,001^*$
100	500	99**	99*	94*	78*	13	4/8***	$\leq 0,001^*$

** $p \leq 0,005$ по отношению к контролю;
*** n/n - число павших к общему числу животных в группе

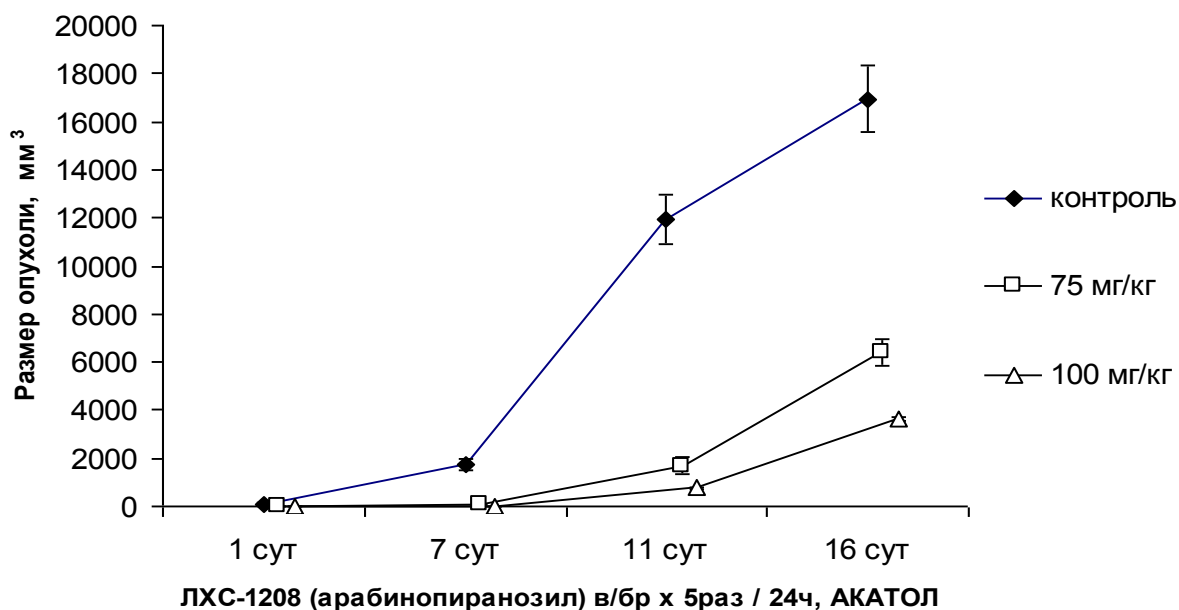


Рисунок 32 — Зависимость размера опухоли АКАТОЛ мышей от дозы ЛХС-1208 при пятикратном внутрив брюшинном введении. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки доза 75 мг/кг против контроля $p=0,005$; на 1-е сутки доза 100 мг/кг против контроля $p=0,004$; на 16-е сутки доза 75 мг/кг против дозы 100 мг/кг $p=0,005$

При применении ЛХС-1208 в разовой дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе продолжительное ингибирование роста первичных подкожных опухолевых узлов в течение 16 дней после окончания лечения (ТРО=97-62%, $p\leq 0,001$) и увеличение продолжительности жизни мышей с АКАТОЛ на 36%.

Повышение разовой дозы ЛХС-1208 до 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) по сравнению с контролем достоверно усиливало торможение роста АКАТОЛ на 99-78% ($p\leq 0,001$) в течение 16 дней наблюдения, однако приводило к гибели 50% мышей на 3-5-е сутки после окончания лечения (на 9-11-е сутки после трансплантации АКАТОЛ). Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных на 46% от исходного веса, в снижении двигательной активности. При аутопсии масса селезенки была значительно в 2,3 раза меньше, чем у контрольной группы животных.

Следует отметить, что в опытных группах между суммарными дозами 375 мг/кг и 500 мг/кг на 1-е, 7-е и 11-е сутки после окончания лечения отличия были недостоверными ($p > 0,05$), тогда как на 16-е сутки после окончания лечения разница оказалась статистически достоверной ($p = 0,005$).

4.3 Определение чувствительности к ЛХС-1208 рака шейки матки мышей РШМ5

Исследования выполняли при пятикратном в/бр введении ЛХС-1208 в разовых дозах 75 и 100 мг/кг (суммарные дозы 375 и 500 мг/кг), таблица 37, рисунок 33.

При применении разовой дозы 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) обнаружено достоверное по отношению к контрольной группе противоопухолевое действие ЛХС-1208 на 1-е и 7-е сутки после окончания лечения: ТРО=97% ($p = 0,015$) и ТРО=52% ($p = 0,011$) соответственно. Однако разовая доза 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) вызывала гибель мышей в 29% случаев на 20-е сутки после окончания лечения (на 27-е сутки после трансплантации РШМ5). При наблюдении за остальными животными из этой группы на 24-е сутки отмечалось достоверное по отношению к контролю ТРО=42% ($p < 0,001$).

Таблица 37 — Противоопухолевое действие ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении мышам с РШМ5

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %					Гибель от токсич- ности	р к контр. группе
		Дни после окончания лечения						
		1	7	11	18	24		
75	375	97*	52*	20	17	42**	2/7***	$\leq 0,015^*$
100	500	98*	59*	39*	17	10	3/7***	$\leq 0,024^*$

** $p < 0,001$ по отношению к контролю;
*** n/n - число павших к общему числу животных в группе

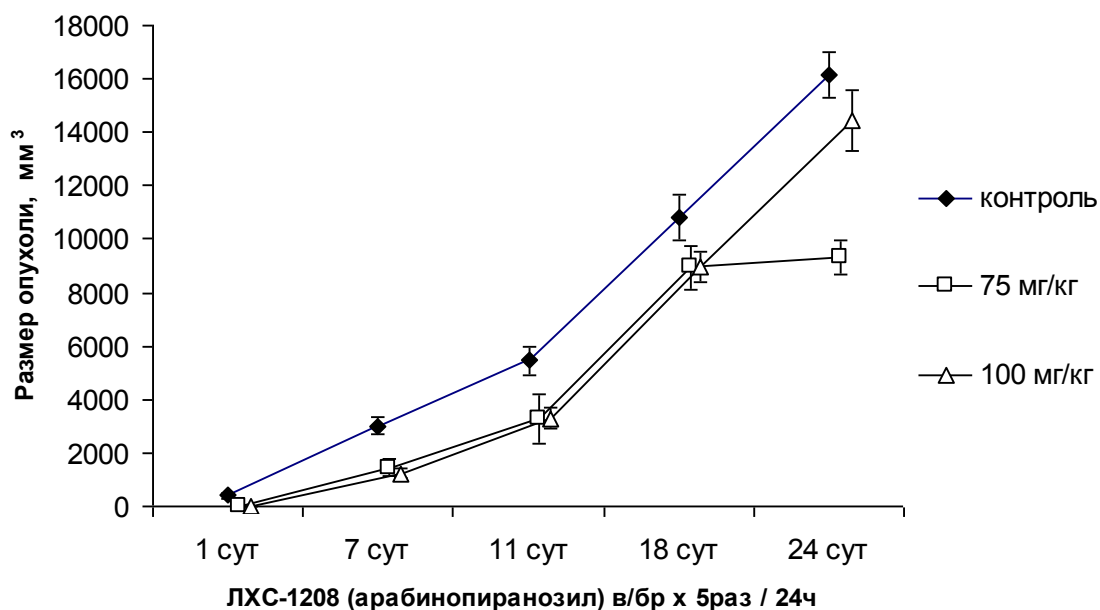


Рисунок 33 — Зависимость размера опухоли РШМ5 мышей от дозы ЛХС-1208 при пятикратном внутрибрюшинном введении. Средние и стандартные ошибки: на 1-е сутки дозы 75 и 100 мг/кг против контроля $p=0,015$ и $p=0,013$; на 7-е сутки дозы 75 и 100 мг/кг против контроля $p=0,011$ и $p=0,001$; на 11-е сутки дозы 100 мг/кг против контроля $p=0,024$; на 24-е сутки доза 75 мг/кг против контроля $p<0,001$; на 24-е сутки доза 75 мг/кг против дозы 100 мг/кг $p=0,030$

Повышение разовой дозы до 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) продемонстрировало достоверное по отношению к контрольной группе торможение роста опухоли на 1-е, 7-е и 11-е сутки после окончания лечения: ТРО=98% ($p=0,013$), ТРО=59% ($p=0,001$) и ТРО=39% ($p=0,024$) соответственно. При этом разовая доза 100 мг/кг (суммарная доза 500 мг/кг) приводила к гибели мышей в 43% случаев на более ранних сроках наблюдения (на 15-е сутки после окончания лечения, на 22-е сутки после трансплантации РШМ5), чем в суммарной дозе 375 мг/кг. Признаки токсичности выражались в незначительном уменьшении массы тела животных на 10% от исходного веса. При аутопсии различий по массе селезенки в сравнении с контрольной группой животных не отмечено.

В опытных группах между суммарными дозами 375 и 500 мг/кг отличия были достоверными только на 24-е сутки наблюдения ($p=0,030$).

4.4 Определение чувствительности к ЛХС-1208 лимфолейкоза мышей L1210

Проведение исследования выполнялось при пятикратном в/бр введении ЛХС-1208 в разовых дозах 50 и 75 мг/кг (суммарные дозы 250 и 375 мг/кг), таблица 38, рисунок 34.

Таблица 38 — Противоопухолевое действие ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении мышам с L1210

Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, %	p к контр. группе
контроль	-	-	-
50	250	43	0,001
75	375	47	<0,001

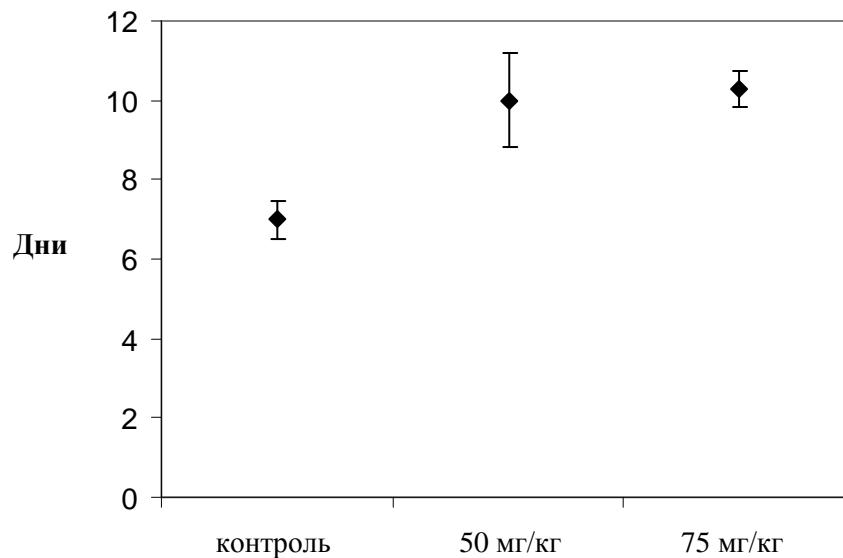


Рисунок 34 — Зависимость продолжительности жизни мышей с L1210 от дозы ЛХС-1208 при пятикратном внутрибрюшинном введении

При применении ЛХС-1208 в разовой дозе 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) было достигнуто достоверное по отношению к контрольной группе УПЖ=43% ($p=0,001$). При увеличении разовой дозы до 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) УПЖ мышей составило 47% ($p<0,001$). В опытных группах между суммарными дозами 250 мг/кг и 350 мг/кг отличия были недостоверными ($p=0,925$).

Таким образом, при определении чувствительности опухолевых моделей мышей к ЛХС-1208 показана его высокая эффективность на АКАТОЛе, РШМ5 и лимфолейкозе L1210 при 5-кратном в/бр введении в разовой дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг).

ГЛАВА 5

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ
ЛХС-1208¹

Для прогнозирования эффективности нового производного индолокарбазола ЛХС-1208 проводили исследование механизма его действия на внутриклеточные мишени. Сведения о возможных механизмах противоопухолевого действия производных N-гликозидов индолокарбазолов, представленные в обзорном материале, показали, что одним из основных биологических свойств таких соединений является индукция гибели клеток эукариот за счет повреждения структуры ДНК. Следуя этим данным, в настоящей главе изучалось ингибирующее влияние индолокарбазола ЛХС-1208 на топоизомеразу I. Воздействуя на ДНК и ДНК-зависимые топоизомеразы, противоопухолевые агенты способны вызывать накопление поврежденных молекул ДНК и приводить опухолевые клетки к гибели.

На рисунке 35 приведена электрофореграмма продуктов релаксации ДНКсс под действием топоизомеразы I. В отсутствие ЛХС-1208 плазида рBR322 мигрирует в геле относительно быстро (трек ДНКсс). В присутствии ЛХС-1208 плазмидная ДНК изменяет конформацию: релаксирует с образованием набора топоизомеров, мигрирующих в геле медленнее ДНКсс (трек Топо I). С увеличением концентрации ЛХС-1208 количество медленно мигрирующих (релаксированных) молекул ДНК уменьшается, что свидетельствует о частичном торможении релаксации ДНК. При концентрациях ЛХС-1208 ≥ 5 мкМ активность топоизомеразы I ингибирована: присутствует только конформация ДНКсс.

¹ Исследования проведены под руководством д.м.н. А.А. Штиля совместно с к.м.н. В.В. Татарским, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; к.физ-мат.н. Д.Н. Калюжным, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта; к.х.н. Л.Г. Деженковой, НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе

ЛХС-1208

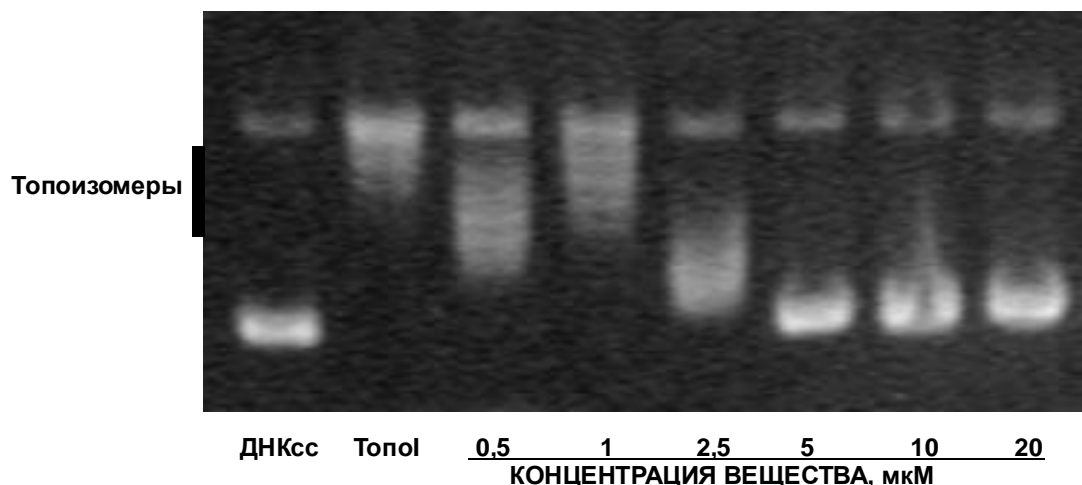


Рисунок 35 — Влияние ЛХС-1208 на релаксацию плазмидной ДНК, опосредованную топоизомеразой I

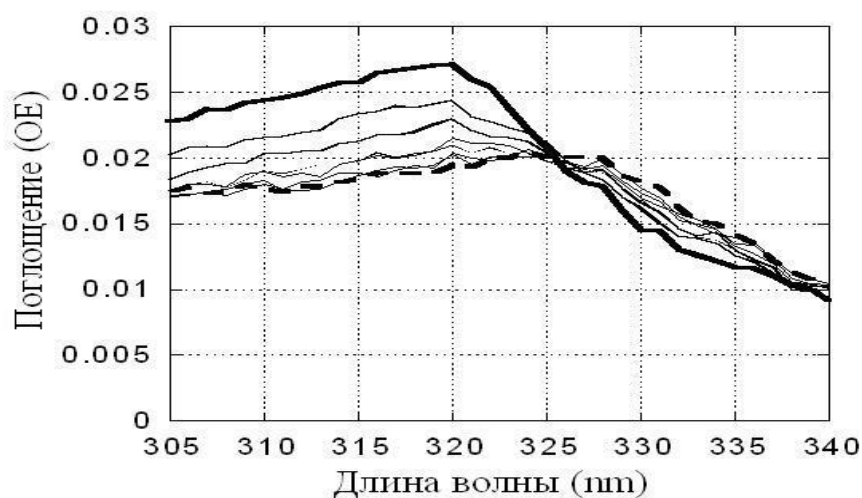


Рисунок 36 — Взаимодействие ЛХС-1208 с дуплексной ДНК

Как видно из рисунка 36, при взаимодействии с двухцепочечной ДНК изменяются спектры поглощения ЛХС-1208 (сплошная линия — 1 мкМ свободного ЛХС-1208, пунктирная — в присутствии 13,7 мкМ пар оснований ДНК). Такой характер спектров характерен для интеркаляционного типа комплексов низкомолекулярных соединений с ДНК.

По концентрациям связанного и свободного ЛХС-1208 построена изотерма связывания ЛХС-1208 с ДНК в координатах Скэтчарда (рисунок 37), аппроксимированная уравнением МакГи-фон Хиппеля.

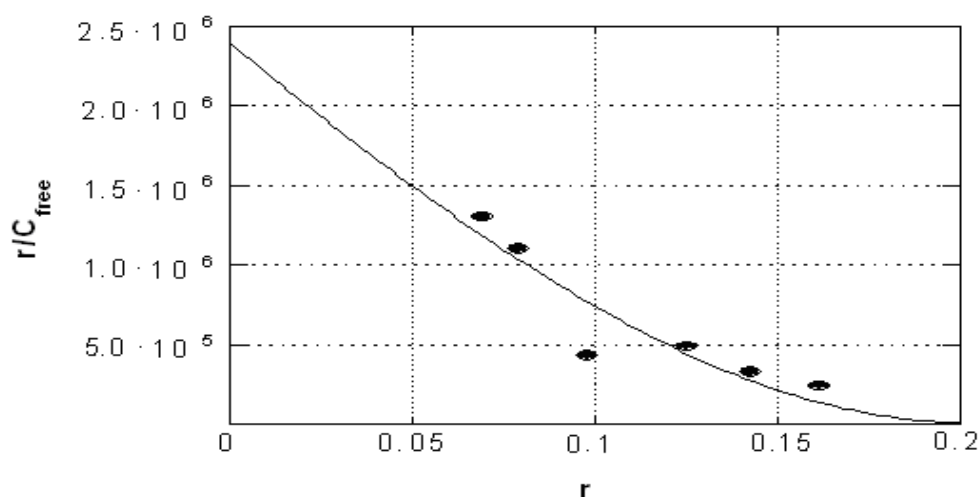


Рисунок 37 — Изотерма связывания ЛХС-1208 с дуплексной ДНК. По оси абсцисс — среднее количество молекул ЛХС-1208 (r) на один нуклеотид; по оси ординат — соотношение среднего количества молекул ЛХС-1208 к концентрации несвязанного ЛХС-1208 (r/C_{free})

Установлены параметры связывания: $K=(2,4\pm 0,5)\times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n=4,5\pm 0,5$. Последний показатель означает, что одна молекула ЛХС-1208 занимает участок в дуплексе ДНК, соответствующий 4-5 нуклеотидным остаткам.

Таким образом, механизм противоопухолевого действия обусловлен ингибированием активности топоизомеразы I и интеркаляцией ЛХС-1208 в двухцепочечную ДНК.

ГЛАВА 6**УГЛУБЛЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208
НА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ**

Для углубленного изучения эффективности индолокарбазола ЛХС-1208 применяли специально разработанные на основе субстанции лекарственные формы (ЛФ) ЛХС-1208 – прототипы ЛФ для перорального и парентерального введения.

Исследования противоопухолевой активности прототипов ЛФ ЛХС-1208 проводили с целью определения оптимального пути введения в организм, при котором достигается наибольшая эффективность ЛФ.

**6.1 Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208
для перорального применения**

Прототипы пероральной ЛФ изучали на опухолевых моделях мышей P388, LLC и S M-1 крыс при пятикратном введении в желудок в диапазоне разовых доз от 25 до 100 мг/кг (суммарные дозы 125-500 мг/кг) (таблица 39).

Из таблицы 39 следует, что у мышей с P388 прототипы 1 и 2 в дозах 25, 50 и 75 мг/кг (суммарные дозы 125, 250 и 375 мг/кг) вызывали слабое, дозозависимое УПЖ, которое составляло от 7% до 17%, и было ниже минимального критерия эффективности.

При исследовании на LLC прототип 3 в дозе 75 мг/кг (суммарная доза 375 мг/кг) инициировал близкое к минимальному критерию эффективности ТРО=47% на 1-е сутки после окончания лечения. В последующие дни наблюдения на 24-30-е сутки после окончания лечения разовые дозы 50, 75 и 100 мг/кг (суммарные дозы 250, 375 и 100 мг/кг) вызывали гибель мышей в 14-28% случаев. При аутопсии масса селезенки была в 1,6-2,3 раза больше, чем у контрольной группы животных.

Таблица 39 — Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 для перорального применения

№ №	Состав прототипа	Модели опухо- лей	Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	УПЖ, (ТРО), %	Гибель живот- ных
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						

На беспородных крысах с перевиваемой саркомой М-1 в дозах 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 125 и 250 мг/кг) прототип 4 не проявлял противоопухолевого эффекта. При этом в дозе 50 мг/кг наблюдалась гибель животных в 10 % случаев непосредственно после окончания лечения (на 9-е сутки после трансплантации S М-1). Признаки токсичности проявлялись в снижении двигательной активности и уменьшении массы тела на 10% от исходного веса.

Таким образом, при пероральном пути введения не обнаружено противоопухолевой активности ЛФ ЛХС-1208 в отношении перевиваемых лимфолейкоза Р388 и эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) мышей, а также саркомы М-1 крыс.

6.2 Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 при внутривенном введении

Прототипы ЛФ для парентерального применения изучали на опухолевых моделях мышей Р388 и LLC при пятикратном внутривенном введении в диапазоне разовых доз от 10 до 45 мг/кг (суммарные дозы 50–225 мг/кг).

Представленные в таблице 40 данные показывают, что на модели Р388 внутривенное введение прототипа 1 в дозах 10, 25 и 50 мг/кг (суммарные дозы 50, 125 и 250 мг/кг) дозозависимо увеличивает продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом (УПЖ соответствовало 14, 72 и 122%). При этом доза 50 мг/кг (суммарная доза 250 мг/кг) оказалась токсичной и вызывала гибель мышей на 3-и сутки от начала лечения (на 4-е сутки после трансплантации Р388) в 12% случаев, что вероятно связано с высоким содержанием ДМСО (2,7 мл) в составе ЛФ прототипа 1.

Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела на 13% от исходного веса. При аутопсии масса селезенки была в 3 раза меньше, чем у контрольной группы животных.

Таблица 40 — Противоопухолевая эффективность прототипов ЛФ ЛХС-1208 при внутривенном введении

№ №	Состав прототипа	Модели опухолей	Доза (мг/кг)	Суммар- ная доза (мг/кг)	УПЖ, (ТРО), %	Гибель живот- ных
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						

Далее была продолжена разработка и исследование новых прототипов ЛФ с более низким содержанием ДМСО для внутривенного введения. Так, прототип 2 в разовых дозах 25 и 35 мг/кг (суммарные дозы 125 и 175 мг/кг) вызывал УПЖ мышей с Р388 на 75 и 80%. Прототип 3 изучали в диапазоне разовых доз от 10 до 45 мг/кг (суммарные дозы 50-225 мг/кг). Повышение дозы имело дозозависимый эффект. Максимальное УПЖ=96% ($p<0,05$) отмечали в разовой дозе 45 мг/кг (суммарная доза 225 мг/кг).

При применении прототипа 4 в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) УПЖ составило 26%, что соответствовало минимальному критерию эффективности. Повышение разовой дозы до 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) приводило к достоверному увеличению продолжительности жизни леченых мышей на 73% ($p<0,05$), а в дозе 35 мг/кг (суммарная доза 175 мг/кг) отмечалось максимальное УПЖ=92% ($p<0,05$). Во всех изученных дозах при внутривенном введении ЛФ прототипов 2, 3 и 4 переносимость лечения была удовлетворительной, гибель мышей не наблюдалась.

Прототип 5 оказался эффективным на модели LLC мышей в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг): ТРО составило 99,9 % ($p<0,05$).

Следует отметить, что наличие Cremophor ELP в прототипах 2, 3 и 5 предполагает жидкую ЛФ, что создает проблемы с ее длительным хранением. Поэтому только из прототипа 4, содержащего низкое количество ДМСО (0,5 мл), показавшего высокий противоопухолевый эффект и не проявляющего токсичности в изученных дозах было решено разработать сублимационно высушенную лекарственную форму ЛХС-1208, которую можно хранить в течение длительного времени. На основании полученных результатов для дальнейших исследований была приготовлена лиофилизированная лекарственная форма ЛХС-1208 (далее препарат ЛХС-1208) следующего состава: субстанция ~ 9,0 мг; ДМСО - 110 мг; Kollidon 17PF - 600 мг. Перед введением экспериментальным животным лиофилизат регидратировали 2,8 мл воды для инъекций с целью получения раствора для внутривенного (в/в) введения с концентрацией действующего вещества 3 мг/мл.

6.3 Изучение спектра противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 в разных режимах применения при внутривенном введении

Изучение спектра противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 проводили на моделях гемобластозов Р388, L1210, L 5178Y и солидных опухолей мышей LLC, B16, РШМ5.

На лимфолейкозе Р388 при в/в введении в интервале разовых доз от 10 до 35 мг/кг (суммарные дозы 50-175 мг/кг) обнаружена зависимость противоопухолевого эффекта препарата ЛХС-1208 от дозы (таблица 41). Максимальный достоверный терапевтический эффект отмечался в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг): УПЖ=76%, $p < 0,05$. С увеличением разовой дозы до 35 мг/кг (суммарная доза 175 мг/кг) УПЖ составляло 80%. При этом суммарная доза 175 мг/кг оказалась летальной (LD_{25}) и приводила к гибели мышей на 2-4-е сутки после окончания лечения (на 7-9-е сутки после трансплантации Р388). Повышение разовой дозы до 45 мг/кг (суммарная доза 225 мг/кг) инициировало гибель мышей уже в 87% случаев. Признаки токсичности выражались в значительной, на 24% от исходного веса, потере массы тела и снижении двигательной активности животных. При аутопсии масса селезенки была в 1,6 раза меньше, чем у контрольной группы животных.

Сравнительные результаты эффективности препарата ЛХС-1208 при разных режимах в/в введения показали, что применение суточной дозы 150 мг/кг двукратно через 2 ч и дозы 50 мг/кг двукратно через 96 ч (суммарная доза 100 мг/кг) увеличивало продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р388 на 34 и 48% соответственно. Тогда как в режиме ежедневного 5-кратного введения в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) УПЖ составило 76%, $p < 0,05$.

При однократном (суточном) применении препарата ЛХС-1208 зависимости терапевтического эффекта от дозы не выявлено.

В исследуемых дозах при двукратном через 96 ч и однократном (суточном) режиме в/в введения отмечалось практически равное УПЖ, которое колебалось от 48% до 28%. При введении препарата ЛХС-1208 в дозе 60 мг/кг двукратно через 96 ч (суммарная доза 120 мг/кг) и в суточной дозе 160 мг/кг наблюдалась гибель

мышей от токсичности в 12% случаев на 5-е и 9-е сутки после окончания лечения (на 10-е сутки после трансплантации Р388) соответственно. Признаки токсичности проявлялись в уменьшении массы тела животных на 10% от исходного веса. При аутопсии масса селезенки была в 1,8 раза больше, чем у контрольной группы животных.

Таблица 41 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении мышам с Р388

Группа	№№	Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	СПЖ, дни	УПЖ, %	Гибель от токсичности
Контроль	1	-	10,2 ± 0,8	-	-
Растворитель	2	0,4 / 24 x 5**	10,0 ± 0	0	0/8
ЛХС-1208	3	10 / 24 x 5	12,6 ± 0,5	26	0/7
	4	15 / 24 x 5	15,3 ± 0,7	53	0/7
	5	25 / 24 x 5	17,6 ± 0,5	76*	0/8
	6	35 / 24 x 5	18,0 ± 0,63	80	2/8***
	7	45 / 24 x 5	-	-	7/8
	8	50 / 96 x 2	14,8 ± 2,4	48*	0/8
	9	60 / 96 x 2	14,2 ± 0,7	36	1/8
	10	75 x 1	13,3 ± 1,7	33	0/8
	11	100 x 1	13,1 ± 1,1	31	0/8
	12	125 x 1	12,9 ± 1,5	29	0/8
	13	150 x 1	13,4 ± 1,2	34*	0/8
	14	160 x 1	13,3 ± 2,5	28	1/8

* $p < 0,05$ между 5 и 8, 5 и 13 группами; ** объем в мл введенного растворителя;

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

Согласно полученным результатам на лимфолейкозе Р388 мышей наиболее эффективным оказался режим ежедневного 5-кратного внутривенного введения препарата ЛХС-1208 в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг).

При дальнейшем исследовании на перевиваемых лейкозах мышей терапевтическая эффективность препарата ЛХС-1208 на L1210 была значительно ниже (таблица 42), чем на Р388.

Таблица 42 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении мышам с L1210

Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	СПЖ, дни	УПЖ, %	Гибель от токсичности
контроль	8,0 ± 0	-	-
20 / 24 x 5	11,0 ± 0,58	38*	0/7
25 / 24 x 5	11,29 ± 0,49	41*	0/7
35 / 24 x 5	9,75 ± 1,50	22	4/8**
40 / 24 x 5	11,5 ± 3,39	44	4/9
45 / 24 x 5	3,25 ± 0,89	-	8/8
140 x 1	9,75 ± 0,89	22	0/8
150 x 1	9,63 ± 0,74	20	0/8
* p<0,05 по отношению к контролю;			
** n/n - число павших к общему числу животных в группе			

Ежедневное внутривенное введение препарата ЛХС-1208 в разовых дозах 20 и 25 мг/кг (суммарные дозы 100 и 125 мг/кг) увеличивало продолжительность жизни мышей с L1210 на 38 и 41% соответственно, в суточных дозах 140 и 150 мг/кг при двукратном через 2 ч введении — на 22 и 20% соответственно. Увеличение разовых доз препарата ЛХС-1208 до 35 и 40 мг/кг приводило к гибели животных от токсичности на 3-4-е сутки после трансплантации L1210.

Разовая доза 45 мг/кг вызывала гибель мышей на 2-3-и сутки после трансплантации L1210 и оказалась ЛД₁₀₀. Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела животных на 20% от исходного веса, снижении двигательной активности. При аутопсии масса селезенки была в 2,5 раза меньше, чем у контрольной группы животных, что указывало на гематологическую токсичность препарата ЛХС-1208 в разовых дозах 35, 40 и 45 мг/кг.

Данные представленные в таблице 43 показывают, что на модели лимфоденоза L5178Y мышей эффективным оказался режим ежедневного 5-кратного в/в введения препарата ЛХС-1208 в терапевтической дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг). При этом наблюдали полное излечение животных в 33% случаев, УПЖ остальных мышей в этой группе составляло 83%. В режиме двукратного через 2 ч введения препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 150 мг/кг также наблюдали полное излечение мышей в 33% случаев, однако УПЖ при этом составляло 43%.

Таблица 43 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении мышам с L5178Y

№№ группы	Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	СПЖ, дни	УПЖ, %	Излечение, % случаев	Гибель от токсич- ности
1	Контроль	19,6 ± 9,07	-	-	-
2	22 / 24 x 5	24,5 ± 7,72	25	33	0/6
3	25 / 24 x 5	35,8 ± 13,0	83*	33	0/6
4	150 x 1	28,0 ± 8,12	43*	33	0/6
5	155 x 1	29,0 ± 10,83	48	0	0/6
6	160 x 1	30,0 ± 12,69	53	17	1/6**

* p<0,05 между 3 и 4 группами;
** n/n - число павших к общему числу животных в группе

Необходимо отметить, что на L5178Y суточная доза 160 мг/кг при двукратном через 2 ч введении вызывала гибель 16 % мышей на 7-е сутки после окончания лечения (на 8-е сутки после трансплантации L5178Y). Признаки токсичности проявлялись в уменьшении массы тела на 15% от исходного веса и снижении двигательной активности животных.

Таким образом, на гемобластозах мышей (лимфолейкозе P388 и лимфаденозе Фишера L5178Y) показана высокая эффективность препарата ЛХС-1208 в разовой дозе 25 мг/кг в режиме ежедневного 5-кратного в/в введения. УПЖ соответствовало 76 и 83%. Кроме того, на модели L5178Y в 33% случаев наблюдалось полное излечение животных, проживших 90 дней без признаков опухолевого процесса.

Из данных таблицы 44 следует, что на модели LLC мышей при ежедневном 5-кратном в/в введении препарата ЛХС-1208 в разовых дозах 20 и 25 мг/кг (суммарные дозы 100 и 125 мг/кг) наблюдалась умеренная противоопухолевая активность в течение 5 дней после окончания лечения: ТРО=88-57% и ТРО=85-60% соответственно. Практически равный терапевтический эффект действия препарата ЛХС-1208 отмечался в дозах 50 и 60 мг/кг при двукратном через 96 ч введении (суммарные дозы 100 и 120 мг/кг): ТРО=80-69% и 81-66% соответственно. Суммарная доза 120 мг/кг вызывала гибель 22% мышей на 10-13-е сутки после окончания лечения (на 17-20-е сутки после трансплантации LLC). Признаки токсичности проявлялись в снижении двигательной активности животных и уменьшении массы тела на 23% от исходного веса. При двукратном через 2 ч в/в введении в суточной дозе 150 мг/кг обнаружен высокий противоопухолевый эффект препарата ЛХС-1208 в течение 9 дней после окончания лечения (ТРО=95-81%) с сохранением статистически значимого терапевтического эффекта до 17 дня наблюдения (ТРО=55-49%). Применение препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 160 мг/кг при двукратном через 2 ч введении приводило к гибели мышей в 22% случаев на 12-18-е сутки наблюдения (на 14-20-е сутки после трансплантации LLC). Суточная доза 175 мг/кг вызывала гибель мышей на 4-6-е сутки после трансплантации LLC и соответствовала ЛД₅₀.

Признаки токсичности выражались в уменьшении массы тела на 17% от исходного веса, снижении двигательной активности животных. При аутопсии масса селезенки была в 5 раз меньше, чем у контрольной группы животных, что указывало на гематологическую токсичность препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 175 мг/кг.

При исследовании зависимости противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения на модели LLC наиболее эффективной оказалась суточная доза 150 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении.

Таблица 44 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении мышам с LLC

Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	ТРО,%						УПЖ, %	Гибель от токсич- ности
	Дни после окончания лечения							
	1	4-5	8-9	12	17	23		
10 /24 x 5	37	14	15	16	12	-	2	0/10
15 /24 x 5	70*	43	34	14	13	-	3	0/10
20 /24 x 5	88*	57*	36	29	8	-	2	0/10
25 /24 x 5	85*	60*	23	9	3	-	0	0/10
50 / 96 x 2	-	80	69	37	29	3	9	0/9
60 / 96 x 2	-	81	66	27	28	14	-5	2/9***
150 x 1	-	95*	81*	50*	49*	38	13	0/9
160 x 1	-	93*	79*	44	49	33	5	2/9
175 x 1	-	97*	86*	35	26	5	13	4/8
Растворитель 0,4 / 24 x 5**	24	7	17	30	19	24	0	0/8

* p<0,05 по отношению к контролю; ** объем в мл введенного растворителя;
*** n/n - число павших к общему числу животных в группе

Как показывают данные таблицы 45, на меланоме В16 при двукратном через 2 ч в/в введении препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 150 мг/кг получен статистически значимый, но кратковременный противоопухолевый эффект (ТРО=59%, $p<0,05$). Разовая доза 25 мг/кг при ежедневном 5-кратном в/в введении вызывала противоопухолевый эффект близкий к минимальному критерию активности (ТРО=45%). Применение препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 155 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении приводило к гибели мышей от токсичности в 22% случаев на 14-е сутки после окончания лечения (на 16-е сутки после трансплантации В16). Увеличение суточной дозы до 160 мг/кг инициировало гибель мышей в 25 % случаев на 10-11 сутки после окончания лечения (на 12-13-е сутки после трансплантации В16). Признаки токсичности проявлялись в уменьшении массы тела на 27% от исходного веса, снижении двигательной активности животных. При аутопсии различий по массе селезенки в сравнении с контрольной группой животных не отмечено.

Таблица 45 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении мышам с В16

Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	Суммар- ная доза	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсич- ности
		Дни после окончания лечения					
		1	4-5	8-9	15		
22 / 24 x 5	110 мг/кг	53	42	32	25	11	0/9
25 / 24 x 5	125 мг/кг	45	25	28	19	6	0/9
150 x 1	150 мг/кг	-	59*	32	30	10	0/9
155 x 1	155 мг/кг	-	3	25	+11**	-10***	2/9
160 x 1	160 мг/кг	-	38	14	25	-22	2/8

* $p<0,05$ по отношению к контролю; ** знак „+“ означает стимуляцию роста опухоли; *** знак „-“ означает уменьшение продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными

Как видно из рисунка 38, на меланоме В16 получен слабый кратковременный эффект действия препарата ЛХС-1208 в терапевтической суточной дозе 150 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении на 4-й день после окончания лечения: ТРО=59%, $p<0,05$.

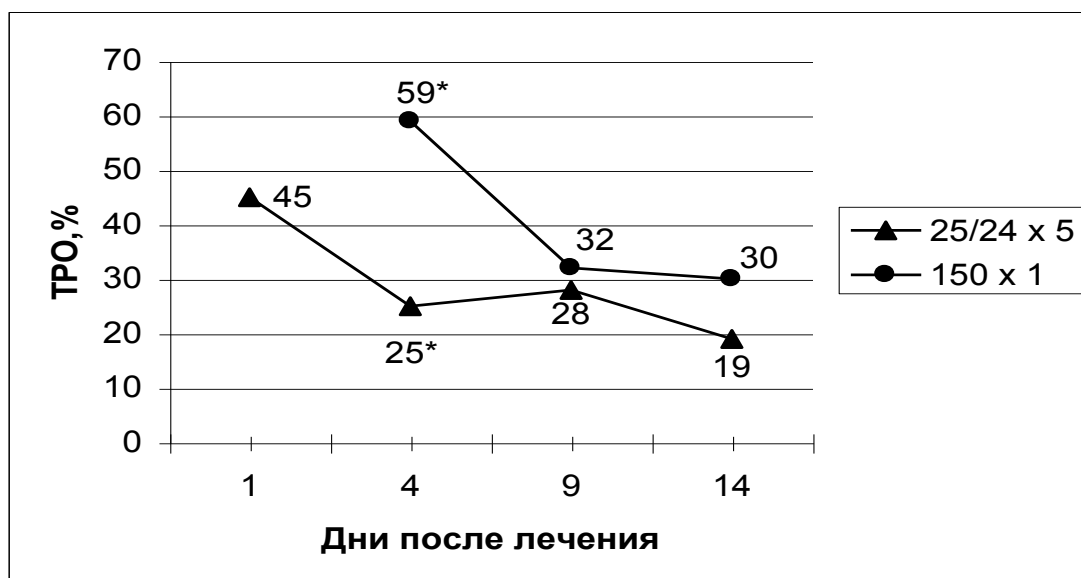


Рисунок 38 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от режима введения на меланоме В16: * $p<0,05$ между разными режимами введения в терапевтических дозах на 4-й день опыта

Из таблицы 46 видно, что противоопухолевое действие препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 150 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении мышам с РШМ5 превосходит терапевтический эффект, полученный в дозе 25 мг/кг при ежедневном 5-кратном введении (суммарная доза 125 мг/кг). Применение препарата ЛХС-1208 в суточной дозе 150 мг/кг вызывало достоверное ТРО=74-56% в течение 9 дней после окончания лечения. При 5-кратном введении ЛХС-1208 в разовых дозах 20, 22 и 25 мг/кг, только суммарная доза 125 мг/кг оказывала минимальный статистически значимый противоопухолевый эффект на 5-е сутки после окончания лечения (ТРО=51%, $p<0,05$).

Во всех исследуемых дозах при разных режимах в/в введения гибели мышей от токсичности не наблюдалось.

Таблица 46 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от дозы и режима применения при внутривенном введении на модели РШМ5

Доза (мг/кг)/ интервал (час) x число введений	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, %				УПЖ, %
		Дни после окончания лечения				
		1	4-5	8-9	15	
20 / 24 x 5	100	+30**	+51	+48	+4	- 4***
22 / 24 x 5	110	0	8	3	+5	-3
25 / 24 x 5	125	43	51*	36	7	7
150 x 1	150	-	74*	56*	47	10
155 x 1	155	-	59*	23	20	13

* $p < 0,05$ по отношению к контролю; **знак «+» означает стимуляцию роста опухоли; *** знак «-» означает уменьшение продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными

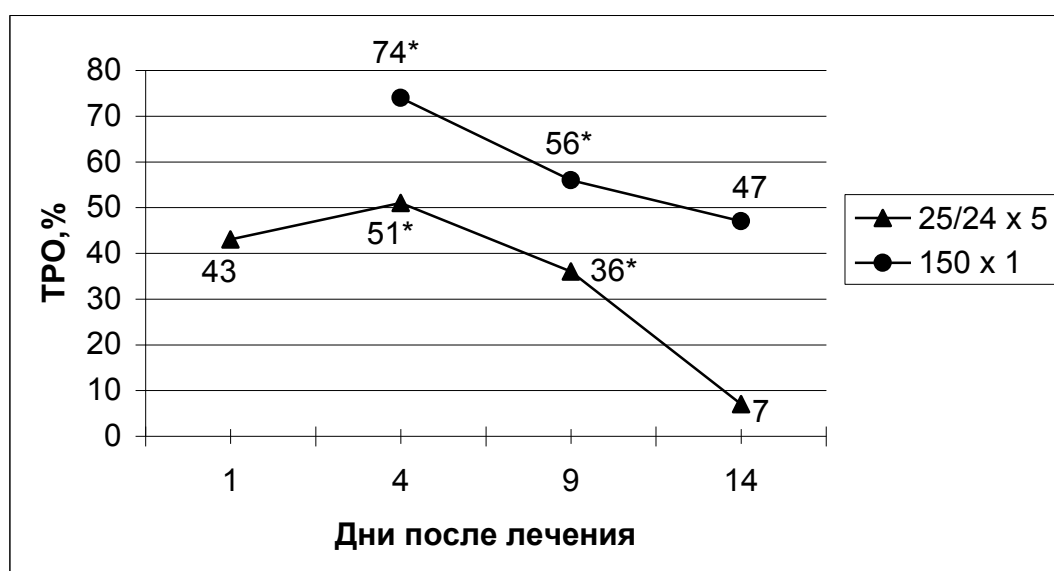


Рисунок 39 — Зависимость противоопухолевой активности препарата ЛХС-1208 от режима введения на РШМ5: * $p < 0,05$ между разными режимами введения в терапевтических дозах на 4-й и 9-й дни опыта

Представленные на рисунке 39 данные демонстрируют, что на модели РШМ5 суточная доза 150 мг/кг в режиме двукратного через 2 ч в/в введения препарата ЛХС-1208 вызывала высокую терапевтическую эффективность на 4-е и 9-е сутки наблюдения: ТРО=74-56%, $p<0,05$.

В режиме ежедневного 5-кратного в/в введения в дозе 25 мг/кг (суммарная доза 125 мг/кг) препарат ЛХС-1208 на модели РШМ5 показал слабый кратковременный противоопухолевый эффект только на 4-е сутки после окончания лечения: ТРО=51%, $p<0,05$ (рисунок 39).

ГЛАВА 7

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛХС-1208
НА ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТАХ РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ
ЧЕЛОВЕКА SW620 *IN VIVO*¹**

В предыдущих опытах на перевиваемых опухолях мышей был показан значимый противоопухолевый эффект препарата ЛХС-1208 в разных режимах и отдельных разовых дозах 25 мг/кг (ежедневно 5-кратно), 50 мг/кг (двукратно через 96 ч) или однократно в суточной дозе 150 мг/кг при двукратном через 2 ч в/в введении.

Данное исследование посвящено поиску противоопухолевого эффекта препарата ЛХС-1280 на опухолях человека у мышей *Balb/c nude* в сравнении с иринотеканом в условиях отработки оптимальной схемы применения под контролем переносимости (таблица 47).

Таблица 47 — 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
T/C%	21	23	15	2*	14	2*
Ttest	p>0,05		p<0,05		p<0,05	
* различия между группами достоверны						

¹ 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, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Изучение механизма действия ЛХС-1208 показало, что агенты подобной структуры с противоопухолевой активностью проявляют свойства ингибиторов топоизомераз, поэтому в качестве клинического прототипа выбран иринотекан, тормозящий репликацию ДНК путем ингибирования топоизомеразы I. Иринотекан вводили в/в в однократной дозе 66 мг/кг, ЛХС-1208 – в разовой дозе 75 мг/кг двукратным курсом с интервалом 96 часов (суммарно 150 мг/кг).

Представленные в таблице 47 результаты указывают, 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.

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 суммарно полученной дозе препарата (рисунок 40). 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%).

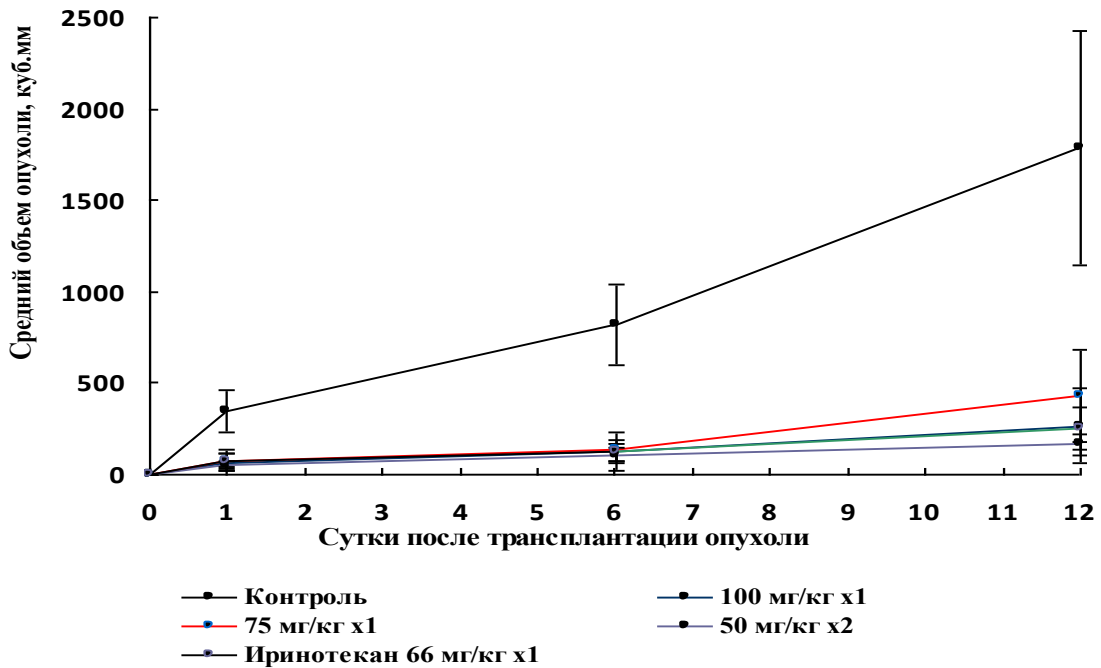


Рисунок 40 — Динамика роста SW620 под действием препарата ЛХС-1208 в диапазоне доз 50x2, 75 и 100 мг/кг в сравнении с иринотеканом

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, т.к. их размеры оказались меньше опухолей мышей в контрольной группе, измеренных на 12-е сутки после окончания лечения.

ГЛАВА 8
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ
С ПЕРСПЕКТИВОЙ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ

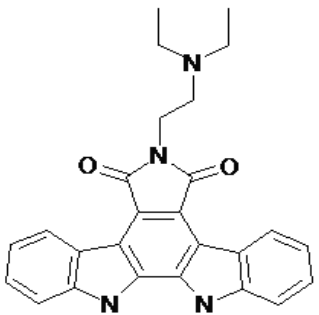
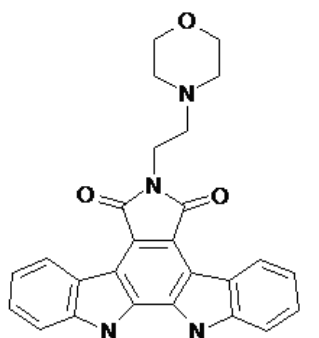
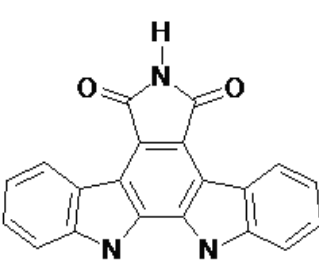
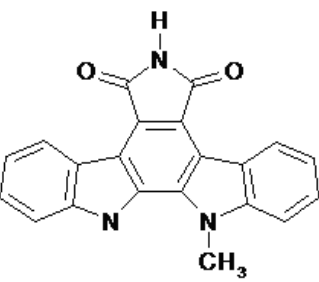
**8.1 Анализ результатов скрининга соединений класса индолокарбазолов
на различных моделях опухолей *in vivo***

Противоопухолевая активность 10 новых соединений из класса N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов изучалась в сравнительных экспериментах на опухолевых моделях мышей: лимфолейкозе P388, эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC) и меланоме B16. Полученные результаты, направленные на исследование связи «структура–активность», позволили оценить противоопухолевое действие соединений и отобрать из них наиболее эффективное. В таблице 48 представлен анализ соединений ЛХС, одинаковых по структуре агликона и отличающихся углеводными (гликозидными) остатками, и соединений ЛХС, модифицированных по агликону, но с одинаковыми углеводными остатками.

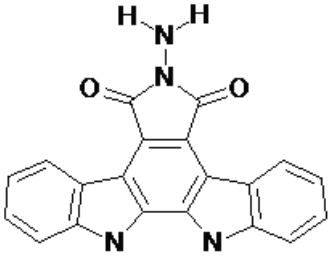
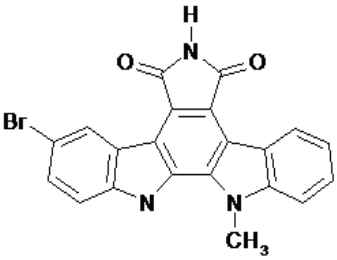
На модели P388 в диапазоне доз 10-75 мг/кг при пятикратном внутрибрюшинном введении соединения галактопиранозил ЛХС-1098 и ксилопиранозил ЛХС-1040 с одинаковой 2-диэтиламиноэтильной группой по имидному азоту в агликоне показали меньшую эффективность (УПЖ=28-39%, $p < 0,001$), чем арабинопиранозил ЛХС-1054, отличающийся от них наличием 2-морфолиноэтильной группы (УПЖ=129%, $p < 0,001$).

При изучении этих соединений на солидных моделях LLC и B16 мышей в оптимальных терапевтических дозах галактопиранозил ЛХС-1098 проявил достоверный противоопухолевый эффект (ТРО=67%, $p = 0,003$ и ТРО=78%, $p = 0,006$ соответственно), ксилопиранозил ЛХС-1040 был активным только на LLC (ТРО=59%, $p = 0,011$), арабинопиранозил ЛХС-1054 — на B16 (ТРО=56%, $p = 0,019$).

Таблица 48 — Изучение связи «структура–активность» производных индолокарбазолов на различных моделях опухолей мышей

Структура агликона	Углеводный остаток	Шифр соединения	Опухолевые модели мышей		
			P388	LLC	B16
	галактоза	ЛХС-1098	УПЖ=28% p<0,001	ТРО=67% p=0,003	ТРО=78% p=0,006
	ксилоза	ЛХС-1040	УПЖ=39% p<0,001	ТРО=59% p=0,011	нет эффекта
	арабиноза	ЛХС-1054	УПЖ=129% p<0,001	нет эффекта	ТРО=56% p=0,019
	галактоза	ЛХС-999	УПЖ=115% p<0,001	ТРО=90% p=0,016	нет эффекта
	ксилоза	ЛХС-983	УПЖ=101% p=0,006	нет эффекта	ТРО=84% p=0,014
	арабиноза	ЛХС-1006	УПЖ=41% p>0,05	ТРО=90% p<0,001	нет эффекта
	рибоза	ЛХС-985	УПЖ=89% p<0,005	ТРО=56% p=0,001	ТРО=74% p=0,045
	ксилоза	ЛХС-976	УПЖ=47% p≤0,001	ТРО=68% p=0,04	ТРО=70% p=0,002

Окончание таблицы 48

Структура агликона	Углеродный остаток	Шифр соединения	Опухолевые модели мышей		
			P388	LLC	B16
	арабиноза	ЛХС-1208	УПЖ=119% p<0,001	ТРО=91% p<0,012	ТРО=91% p=0,001
		ЛХС-1007	УПЖ=34% p=0,002	ТРО=48% p≤0,05	нет эффекта

Таким образом, наличие 2-диэтиламиноэтильной группы по имидному азоту в агликоне соединений ЛХС-1098 и ЛХС-1040 с разными гликозидными остатками (галактозой и ксилозой, соответственно), понижает их эффект на модели P388. При этом на моделях солидных опухолей LLC и B16 высокую противоопухолевую эффективность продемонстрировало только соединение ЛХС-1098, модифицированное галактозой.

Полученные результаты подтверждают, что замена атомов в верхнем гетероцикле по имидному азоту влияет на изменение противоопухолевой активности производных индолокарбазолов с разными гликозидными остатками [27; 40].

Далее, при изучении связи «структура–активность» было продолжено сравнение противоопухолевых свойств галактопиранозидов ЛХС-1098 и ЛХС-999, отличающихся только структурой агликона.

ЛХС-999 с NH-группой по имидному азоту проявил высокую противоопухолевую активность в оптимальных терапевтических дозах на P388

(УПЖ=115%, $p < 0,001$), LLC (ТРО=90%, $p = 0,016$) и оказался неэффективным в отношении В16. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что модификации в структуре агликона ведут к изменениям противоопухолевых свойств рассмотренных соединений.

Анализируя данные о противоопухолевом действии ксилопиранозидов ЛХС-1040, ЛХС-976 и ЛХС-983, которые имеют одинаковый гликозидный остаток — ксилозу и тоже отличаются структурой агликона, отмечено, что на эффективность лечения LLC влияет наличие 2-диэтиламиноэтильной группы у имидного азота в агликоне ЛХС-1040 (ТРО=59%, $p = 0,011$) и CH_3 -группы в индоле ЛХС-976 (ТРО=68%, $p = 0,04$). Отсутствие таких групп в агликоне ЛХС-983 не приводило к противоопухолевому эффекту на LLC. Однако ЛХС-983 с NH-группой по имидному атому азота проявлял высокую активность на моделях Р388 (УПЖ=101%, $p = 0,006$) и В16 (ТРО=84%, $p = 0,014$). При этом ЛХС-1040 и ЛХС-976 в отношении лимфолейкоза Р388 оказались менее активными (УПЖ=31-47%, $p \leq 0,001$), а на меланоме В16 эффективность показало только соединение ЛХС-976 (ТРО=70%, $p = 0,002$).

Таким образом, на противоопухолевые свойства соединений, имеющих одинаковые гликозидные остатки, влияют заместители в агликоне.

Это подтверждает дальнейшее исследование противоопухолевой активности соединений ЛХС-1208, ЛХС-1054, ЛХС-1007 и ЛХС-1006, содержащих в качестве гликозидного остатка арабинозу и имеющих различные модификации по агликону у имидного азота. Так, на модели Р388 высокую противоопухолевую активность показали арабинопиранозиды ЛХС-1208 с NH_2 -группой (УПЖ=119%, $p < 0,001$) и ЛХС-1054 с 2-морфолиноэтильной группой (УПЖ=129%, $p < 0,001$). Действие ЛХС-1006 с NH-группой оказалось на Р388 недостоверным (УПЖ=41%, $p > 0,05$). Наличие в структуре ЛХС-1007 метильной CH_3 -группы в индоле и галогена Вг несколько уменьшало активность соединения на Р388 (УПЖ=34%, $p = 0,002$). Согласно исследованиям других авторов, производные индолокарбазолов с CH_3 -группой в индоле при *in vitro* тестировании

демонстрировали низкую цитотоксическую активность на клетках лимфолейкоза Р388 мышей [40].

При действии арабинопиранозидов в оптимальных терапевтических дозах на солидные опухоли мышей LLC и В16, высокая противоопухолевая активность установлена у соединения ЛХС-1208 (ТРО=91%, $p < 0,012$ и ТРО=91%, $p = 0,001$ соответственно). ЛХС-1006 оказался активным только на LLC (ТРО=90%, $p < 0,001$), а ЛХС-1054 — на меланоме В16 (ТРО=56%, $p = 0,019$). Возможно, присутствие CH_3 -группы и галогена Br в структуре агликона у арабинопиранозида ЛХС-1007 приводило к незначительному терапевтическому эффекту на модели LLC и неэффективности на В16. Исследования, проведенные Prudhomme M. свидетельствуют, что наличие заместителей метильной CH_3 -группы в индоле оказывает негативное влияние на механизм действия индолокарбазолов, то есть ингибирования топоизомеразы I и интеркаляции ДНК не происходит [40]. Другие авторы подтверждают, что только определенные модификационные изменения в структуре, например, 6-N-аминоаналогов индолокарбазола NB-506, позволяют обеспечить лучшую противоопухолевую активность ингибиторов топоизомеразы I [139; 140]. При этом наличие гликозидного остатка у атома азота в индоле является ключевым элементом как для взаимодействия с ДНК, так и для ингибирования топоизомеразы I [35; 40]. Следовательно, противоопухолевые свойства индолокарбазолов, имеющих одинаковый гликозидный остаток, зависят от различных заместителей в структуре их агликона.

Следующую группу, представленную к рассмотрению связи «структура–активность», составили производные индолокарбазолов с одинаковым агликоном, но модифицированные по гликозидному остатку: арабинопиранозид ЛХС-1006, галактопиранозид ЛХС-999, рибопиранозид ЛХС-985 и ксилопиранозид ЛХС-983. Установлено, что противоопухолевый эффект соединений аналогичной структуры зависит от природы гликозидного остатка [5; 40].

Так, на модели Р388 все, кроме ЛХС-1006, соединения ЛХС-999, ЛХС-985 и ЛХС-983 в оптимальных терапевтических дозах проявили высокую противоопухолевую активность, увеличивая продолжительность жизни мышей с

лимфолейкозом на 115% ($p < 0,001$), 89% ($p < 0,005$) и 101% ($p = 0,006$) соответственно.

При исследовании противоопухолевого действия соединений на LLC высокую активность показали ЛХС-1006 (ТРО=90%, $p < 0,001$) и ЛХС-999 (ТРО=90%, $p = 0,016$), умеренную эффективность наблюдали у ЛХС-985 (ТРО=56%, $p = 0,001$) и отсутствие терапевтического эффекта у ЛХС-983. На меланоме В16 высокую противоопухолевую активность проявили соединения ЛХС-985 (ТРО=74%, $p = 0,045$) и ЛХС-983 (ТРО=84%, $p = 0,014$). Соединения ЛХС-1006 и ЛХС-999 в лечении меланомы В16 были неэффективными.

Таким образом, разнообразие модификаций индолокарбазолов позволило выявить зависимость их противоопухолевых свойств от структуры как агликона, так и гликозидного остатка. При этом четкой связи «структура–активность» не обнаружено. Вероятно, для установления соотношения «структура–активность» необходимо проведение скрининга с большим количеством производных индолокарбазолов, объединенных в определенные модификационные группы.

Полученные результаты, направленные на исследование связи «структура–активность», позволили оценить противоопухолевое действие 10 производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов и отобрать из них для дальнейшего изучения наиболее эффективное ЛХС-1208. 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%, $p = 0,012$).

8.2 Анализ результатов чувствительности к ЛХС-1208 клеточных линий опухолей человека и экспериментальных опухолей мышей

Наиболее чувствительными к действию ЛХС-1208 оказались культуры клеток рака толстой кишки человека НСТ-116 ($IC_{50} = 5$ мкМ) и LS174Т ($IC_{50} = 8$ мкМ), что позволило продолжить исследование эффективности этого соединения на модели мышинной аденокарциномы толстой кишки (АКАТОЛ). Лечение проводилось с применением субстанции ЛХС-1208 в растворе ДМСО 10%

концентрации при 5-кратном внутривенном введении. По результатам исследования на АКАТОЛ показана высокая противоопухолевая активность соединения в суммарной дозе 375 мг/кг: ТРО=97-62%, $p \leq 0,001$ в течение 16 дней после окончания лечения и УПЖ=36%. Согласно данным других авторов, на модели гетеротрансплантата рака толстой кишки человека НСТ-116 обнаружена эффективность аналогов ребеккамицина – эдотекарина и NB-506 [130; 138].

Высокий противоопухолевый эффект ЛХС-1208 в суммарной дозе 375 мг/кг наблюдался на лимфолейкозе L1210 с достоверным увеличением продолжительности жизни мышей с L1210 на 47% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Полученные данные соотносятся с результатами экспериментальных исследований известного противоопухолевого антибиотика ребеккамицина и его аналогов на лимфолейкозах P388 и L1210, имплантированных мышам [123; 136].

На модели РШМ5 мышей в суммарной дозе 375 мг/кг также отмечено достоверное по отношению к контрольной группе животных противоопухолевое действие арабинопиранозила ЛХС-1208 в течение 7 дней после окончания лечения: ТРО=97-52% ($p = 0,011$). Эти данные подтверждаются при исследовании противоопухолевой активности производных индолокарбазола, модифицированных арабинозой [27; 28].

8.3 Анализ результатов выбора лекарственной формы ЛХС-1208 в ходе определения ее эффективности на чувствительных моделях опухолей мышей

Исследование противоопухолевой активности прототипов лекарственных форм (ЛФ) ЛХС-1208 проводилось с целью 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 и Kollidon 17PF, BASF The Chemical Company, Германия) [23; 24]. Получить

истинные растворы ЛХС-1208 удалось с применением Kollisol^v PEG-400/Lutrol E-400, которые используются только в ЛФ для перорального применения. 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 значимого терапевтического эффекта не выявлено. В других прототипах ЛФ для полного растворения субстанции ЛХС-1208 применяли ДМСО. При этом исследования на мышах и крысах с экспериментальными опухолями P388 и S M-1 показали отсутствие терапевтического эффекта прототипов пероральной ЛФ в дозах 25, 50 и 75 мг/кг (суммарные дозы 125, 250 и 375 мг/кг). Показатели УПЖ и ТРО оказались ниже минимального критерия активности.

Очевидно, модификации в структуре молекулы индолокарбазола приводят к изменению спектра противоопухолевого действия, разной силе противоопухолевого эффекта и разной биодоступности производных соединений. Кроме того, в соответствии с классификацией структуры N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов можно заметить, что производные стауроспорина (мидостаурин, энзастаурин и лестауртиниб) эффективны при пероральном применении [144; 149; 153], в отличие от производных ребеккамицина (бекатекарин и эдотекарин), которые проявляют активность при внутривенном введении [160; 165]. По химическому строению молекула арабинопиранозила ЛХС-1208 относится к производным ребеккамицина. При этом исследование прототипов ЛФ ЛХС-1208 для приема внутрь и для внутривенного введения показало, что ЛХС-1208 обладает противоопухолевой активностью только при в/в введении. Прототипы ЛФ ЛХС-1208 для в/в применения с использованием солюбилизаторов Cremophor ELP и Kollidon 17PF изучали на опухолевых моделях мышей P388 и LLC при пятикратном в/в введении в диапазоне разовых доз от 10 до 45 мг/кг (суммарные дозы 50–225 мг/кг). На основании экспериментальных исследований пяти разработанных прототипов ЛФ ЛХС-1208, был отобран один с наименьшим содержанием ДМСО в составе ЛФ и высокими показателями противоопухолевой активности на модели P388 мышей: УПЖ=26-92% (p<0,05).

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 сут. От дальнейшего исследования противоопухолевой активности ЛФ с кремофором ELP пришлось отказаться, поскольку наличие в составе кремофора ELP не позволяет лиофилизировать ЛФ [24]. В связи с этим для доклинических исследований была разработана лекарственная форма ЛХС-1208 с коллидоном 17PF в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций следующего состава: субстанция ~ 9,0 мг; ДМСО - 110 мг; коллидон 17PF - 600 мг. Перед введением экспериментальным животным лиофилизат регидратировали 2,8 мл воды для инъекций с целью получения раствора для в/в введения с концентрацией действующего вещества 3 мг/мл [24].

При выборе оптимальной схемы применения установлена зависимость противоопухолевой активности инъекционной ЛФ ЛХС-1208 (препарата ЛХС-1208) от дозы и режима введения на моделях опухолей разного гистогенеза. На моделях гемобластозов 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 меланоме 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 авторами установлена высокая 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 [127; 128].

Полученные результаты могут быть рекомендованы для дальнейших доклинических исследований препарата ЛХС-1208 при сравнительном изучении эффективности субстанции и ЛФ; при изучении действия препарата ЛХС-1208 на развившуюся карциному легких Lewis и влияния на процесс метастазирования;

при оценке эффективности препарата ЛХС-1208 в комбинации с функциональным аналогом иринотеканом, принимая во внимание механизм действия ЛХС-1208. Рекомендуемая оптимальная схема применения препарата ЛХС-1208 необходима для дальнейших экспериментов, направленных на исследование противоопухолевого эффекта на опухолях человека у мышей *nude*, в том числе, в сравнении с клиническим прототипом иринотеканом, ингибитором топоизомеразы I.

8.4 Анализ механизма противоопухолевого действия соединений класса N-гликозидов индолокарбазолов

При исследовании производного индолокарбазола ЛХС-1208 определены мишени и молекулярные механизмы его противоопухолевого действия. 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.

Установлено, 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 индолокарбазольной частью, а углеводная группа образует в малой бороздке дополнительные водородные связи [183]. 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 комплексобразованием 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.

Необходимо 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 же известных ингибиторов данного фермента, называют привилегированной [200]. Исследование механизма действия способствует тому, что такие привилегированные элементы химической структуры, как у N-гликозидов индолокарбазолов, могут быть использованы в качестве основы для разработки новых биологически активных соединений или новых лекарств со сходными или, возможно, улучшенными по сравнению с исходными соединениями свойствами, а также для разработки библиотек таких соединений.

Таким образом, в настоящей работе показана перспективность создания и эффективность исследования нового потенциального противоопухолевого агента на основе углеводсодержащего производного индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазола ЛХС-1208, свойства которого сформулированы в выводах.

ВЫВОДЫ

1. На основании изученных противоопухолевых свойств 10 производных N-гликозидов индолокарбазолов отобрано соединение ЛХС-1208, показавшее высокую эффективность на перевиваемых опухолях мышей: Р388 (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 дуплексе ДНК, соответствующий 4-5 нуклеотидным остаткам).

4. Выявлена эффективность ЛХС-1208 на расширенной панели перевиваемых опухолей мышей: АКАТОЛе (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 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 (T/Cmin=2% против T/Cmin=14%, $p < 0,05$ соответственно), что подтверждено на подкожно перевитых ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ТРО (Т/С)	— торможение роста опухоли
УПЖ	— увеличение продолжительности жизни
P388	— лимфоцитарная лейкемия
L1210	— лимфоидная лейкемия
L5178Y	— лимфаденоз Фишера
LLC	— эпидермоидная карцинома легкого Lewis
B16	— меланомы B16
РШМ5	— рак шейки матки РШМ5
АКАТОЛ	— аденокарцинома толстой кишки
S M-1	— полиморфноклеточная саркома
SW620	— штамм перевиваемого рака ободочной кишки человека
IC	— ингибирующая концентрация
ЛД	— летальная доза
ДНКсс	— суперскрученная форма ДНК
ЛФ	— лекарственная форма
ДИ	— доверительный интервал
в/б	— внутрибрюшинный путь введения
в/в	— внутривенный путь введения
п/к	— подкожный путь введения
кг	— килограмм
мг	— миллиграмм
мкг	— микрограмм
мл	— миллилитр
мкл	— микролитр
кПа	— килопаскаль
М	— моль
мм	— милли Моль
мкМ	— микро Моль

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общая органическая химия / Под ред. Н.К. Кочеткова и Э.Е. Нифантьева, пер. с англ. – М.: Химия, 1985. – Т. 8. – С. 488-588.
2. Физические методы в химии гетероциклических соединений / под ред. А. Р. Катрицкого. – М., 1966.
3. Грандберг, И.И. Триптамины и родственные структуры из γ - и δ -галогенкарбонильных соединений и арилгидразинов / И.И. Грандберг // Журнал органической химии. – 1983. – Т. 19, вып. 11. – С. 2439-2450.
4. Афиятулло, Ш.Ш. Пренилированные индольные алкалоиды факультативных морских грибов рода *Aspergillus* / Ш.Ш. Афиятулло, О.И. Журавлева // Вестник ДВО РАН. – 2014. – № 1. – С. 69-79.
5. Мельник, С.Я. Синтез и изучение гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло[2,3-а]карбазолов / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова // Экспериментальная онкология на рубеже веков. – М., 2003. – С. 281-293.
6. Новые бисиндольные алкалоиды из миксомицетов *Arcyria cinerea* и *Lycogala epidendrum* // РЖ Природные органические соединения и их синтетические аналоги. – 2005, № 21.
7. Попов, А.М. Противоопухолевая активность вторичных метаболитов морских беспозвоночных / А.М. Попов // Вестник ДВО РАН. – 2006, № 5. – С. 81-90.
8. Попов, А.М. Физиологическая активность фаскаплизина – необычного пигмента из морских тропических губок / А.М. Попов, В.А. Стоник // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 1. – С. 12–15.
9. Макарьева, Т.Н. Поиск и выделение новых природных соединений из морских беспозвоночных, исследования их структур и биологических активностей / Т.Н. Макарьева, А.С. Сильченко, А.А. Кича и др. // Вестник ДВО РАН. – 2014. – № 1. – С. 135-141.

10. Ковалев, И.Е. Иммунотропные агенты как модуляторы цитохром Р-450-зависимого метаболизма лекарств / И.Е. Ковалев, Н.В. Шипулина // ХФЖ. – 1988, №. 1. – С. 5-20.
11. Патент № 2337692 от 29 октября 2002 г. Производные стауроспорина в качестве ингибиторов активности рецепторной тирозинкиназы flt3 / Д.Д. Гриффин (US), П.У. Манли (CH); опубл. 10.11.2008, Заявл. 10.05.2005.
12. Патент №: 2443421. Производные стауроспорина для применения при лечении альвеолярной рабдомиосаркомы / М. Вахтель (CH), Б.В. Шафер (CH), Р. Амштутц (CH); опубликовано 27.02.2009.
13. Патент № 4785085 (US) от 15.11.88 г. Фармацевтическая композиция, ингибирующая рост опухоли / Убрани В. Венткатарам [JN], Мириам К. Франчини [US], Джозеф Б. Богардус [US]. Владельцы патента: Бристоль-Мейерз Сквибб Компании (RU 2053766).
14. Патент № 5093330 США от 03.03.1992. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей / Ян Колс; заявл. 10.05.2005; опубл. 10.11.2008, Бюл.№ 31.
15. Татарский, В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолокарбазолов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Татарский Виктор Вячеславович. – М., 2010. – 108 с.
16. Калюжный, Д.Н. Взаимодействие с ДНК как фактор цитотоксичности нового гликозидного производного индолокарбазола / Д.Н. Калюжный, В.В. Татарский, Ф.С. Бондарев и др. // Доклады РАН. – 2006. – Т. 411, № 6. – С. 833-836.
17. Татарский, В.В. Механизмы противоопухолевого действия нового производного индолокарбазолов: Материалы конференции «Фундаментальная онкология. 2-е Чтения им. проф. Н.Н. Петрова». Санкт-Петербург, 2006 / В.В. Татарский, И.Л. Плихтяк, С.Я. Мельник и др. // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52. – С. 38-39.
18. Поддубная, И.В. Онкология: Справочник практического врача / под. ред. И.В. Поддубной. – М.: МЕД пресс-информ., 2009. – 768с.

19. Семенов, А.А. Природные противоопухолевые соединения (структура и механизм действия) / А.А. Семенов. – Новосибирск: Наука, 1979. – 222 с.
20. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З.П. Софьина, А.Б. Сыркин, А. Голдин и др. – М.: Медицина. – 1980. – 296 с.
21. Трещалина, Е.М. Доклиническое изучение противоопухолевых препаратов / Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, А.М. Гарин // Рациональная фармакотерапия. – М.: Литтерра. – 2015. – С. 75-82.
22. Трещалина, Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е.М.Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – Ч. 1. – М.: Гриф и К. – 2012. – Гл. 39. – С. 642-657.
23. Гулякин, И.Д. Применение фармакологической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ / И.Д. Гулякин, Л.Л. Николаева, Е.В. Санарова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101-108.
24. 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 и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 25-32.
25. Софьина, З.П. Методика первичного отбора соединений с противоопухолевой активностью / З.П. Софьина // Вопр. онкологии. – 1976. – № 4. – С. 82-96.
26. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.- корр. РАМН Хабриева Р.У. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 649-651.

27. Голубева, И.С. Сравнение противоопухолевой активности производных индолокарбазола с углеводными остатками галактозой, арабинозой и заместителями по имидному атому азота / И.С. Голубева, Н.П. Яворская, Л.В. Эктова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. Спецвыпуск. – Т. 16. – С. 23.
28. Голубева, И.С. Изучение *in vivo* потенциальных противоопухолевых свойств аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола / И.С. Голубева, Н.П. Яворская, О.В. Горюнова // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 4. – С.84-87.
29. Трещалина, Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования / Е.М Трещалина. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2010. – 16 с.: ил.
30. Патент заявка США № 60/612458 от 22.09.2004 г. и США 60/683006 от 19.05.2005 г. Терапевтические комбинации, содержащие ингибитор поли(АДФ-рибоза)полимеразы / Д.Р. Ньюэлл, Э.Р. Пламмер, А.Х. Калверт и др.
31. Патент РФ на изобретение № 2665168 от 28.08.2018г. Способ лечения рака толстой кишки человека SW620 в эксперименте / Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова, З.С. Шпрах, Е.М. Трещалина.
32. O'Connor, S.E. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis / S.E. O'Connor, J.J. Maresh // Nat. Prod. Rep. – 2006. – Vol. 23. – P. 532-547.
33. Bailly, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs / C. Bailly // Curr. Med. Chem. – 2000. – Vol. 7. – P. 39-58.
34. Pereira, E.R. Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties / E.R. Pereira, L.Belin, M. Sancelme et al. // J. Med. Chem. – 1996. – N 39. – P. 4471-4477.

35. Pindur, U. Advances in indolo [2,3-a]carbazole chemistry: design synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors / U. Pindur, Y.S. Kim, F. Mehrabani // *Curr. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 6(1). – P. 29-69.
36. Deslandes, S. Marine Pyrrolocarbazoles and Analogues: Synthesis and Kinase Inhibition / S. Deslandes, S. Chassaing, E. Delfourne // *Mar. Drugs.* – 2009. – Vol. 7. – P. 754-786.
37. Omura, S. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization / S.Omura, Y. Ywai, A. Hirano et al. // *J. Antibiot.* – 1977. – Vol. 30. – P. 275-282.
38. Nettleton, D.E. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes* / D.E. Nettleton, T.W. Doyle, B. Krishnan et al. // *Tetrahedron. Letters.* – 1985. – Vol. 26. – P. 4011-4014.
39. Wada, Y. "Synthesis of N-protected staurosporinones" / Y. Wada, H. Nagasaki, M. Tokuda et al. // *J. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 72. – P. 2008-2014.
40. Prudhomme, M. Biological Targets of Antitumor Indolocarbazoles Bearing a Sugar Moiety / M. Prudhomme // *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* – 2004. – Vol. 4 (6). – P. 509-521.
41. Gescher, A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs / A. Gescher // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 31. – P. 721-728.
42. Zembower, D.E. Indolocarbazole poisons of human topoisomerase I: regioisomeric analogues of ED-110 / D.E. Zembower, H. Zhang, J.P. Lineswala et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 9. – P. 145-150.
43. Preobrazhenskaya, M.N. Chemistry of Nucleosides and Nucleotides / M.N. Preobrazhenskaya, I.A. Korbukh / Ed. Townsend L.B. – N.Y.: Plenum Press, 1993. – Vol. 3. – P. 1-105.
44. Olano, C. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis / C. Olano, C. Méndez, J.A. Salas et al. // *Nat. Prod. Rep.* – 2009. – Vol. 26. – P. 628-660.

45. Itoh, T. Komodoquinone A, a novel neuritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3 / T. Itoh, M. Kinoshita, S. Aoki et al. // *J. Nat. Prod.* – 2003. – Vol. 66. – P. 1373-1377.
46. Onaka, H. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans* / H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi et al. // *J. Antibiot.* – 2002. – Vol. 55. – P. 1063-1071.
47. Salas, A.P. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase / A.P. Salas, L. Zhu, C. Sánchez et al. // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 58. – P. 17-27.
48. Hernández, L.M. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain / L.M. Hernández, J.A. Blanco, J.P. Baz et al. // *J. Antibiot.* – 2000. – Vol. 53. – P. 895-902.
49. Wu, S.J. 39-N-carboxamido-staurosporine and selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp / S.J. Wu, S. Fotso, F. Li et al. // *J. Antibiot.* – 2006. – Vol. 59. – P. 331-337.
50. Han, X. ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomadura* sp. 007 / X. Han, C. Cui, Q. Gu et al. // *Tetrahedron Lett.* – 2005. – Vol. 46. – P. 6137-6140.
51. Matson, J.A. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1 and AT2433-B2, novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura malliaura* / J.A. Matson, C. Claridge, J.A. Bush et al. // *J. Antibiotics.* – 1989. – Vol. 42. – P. 1547-1555.
52. Golik, J. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1 and AT2433-B2 novel antitumor compounds produced by *Actinomadura melliaura*. Structure determination / J.Golik, T.W. Doyle, B. Krishnan et al. // *J. Antibiotics.* – 1989. – Vol. 42, N 12. – P. 1784-1789.

53. Pearce, C.J. The biosynthetic origins of rebeccamycin / C.J. Pearce, T.W. Doyle, S. Forenza et al. // *J. Natural Products*. – 1988. – Vol. 51. – P. 937-940.
54. Onaka, H. Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster of Rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 / H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003. – Vol. 67 (1). – P. 127-138.
55. Steglich, W. Indolfarbstoffe aus Fruchtkoerpern des Schleimpilzes *Arcyria denudata* / W. Steglich, B. Steffan, L. Kopanski et al. // *Angew. Chem.* – 1980. – Vol. 92, Issue 6 – S. 463-464.
56. Biondi, N. Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities / N. Biondi, M.R. Tredici, A. Taton et al. // *J. Applied Microbiology*. – 2008. – Vol. 105. – P. 105-115.
57. Sergeeva, E. Evidence for production of phytohormone indol-3-acetic acid by cyanobacteria / E. Sergeeva, A. Liaimer, B. Bergman // *Planta*. – 2002. – Vol. 215. – P. 229.
58. Venkatesh, Babu S. Indole-3-acetic acid from filamentous cyanobacteria: screening, strain identification and production / S.Venkatesh Babu, B. Ashokkumar, N. Sivakumar et al. // *J. Scient.* – 2013. – Vol. 72. – P. 581-584.
59. França, P.H.B. Indole Alkaloids from Marine Sources as Potential Leads against Infectious Diseases / P.H.B. França, D.P. Barbosa, D.L. Silva et al. // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – P.12 p. doi: 10.1155/2014/375423
60. Gul, W. Indole alkaloid marine natural products: an established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases / W. Gul, M.T. Hamann // *Life Sci.* – 2005. – Vol. 78. – P.442-453.
61. Soni, R. Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by fascaplysin, a marine natural product / R. Soni, L. Muller, P. Furet et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 275. – P. 877-884.
62. Fusetani, Nobuhiro. *Marine Natural Products. Natural products in chemical biology* / ed. by Natanya Civjan.: John Wiley & Sons, Inc., 2012. – P. 31.

63. Kase, H. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin / H. Kase, A. Iwahashi, M. Yuzuru // *J. Antibiot.* – 1986. – Vol. 39(8). – P. 1059-1066.
64. Yamada, K. K252a, a new inhibitor of protein kinase C, concomitantly inhibits 40K protein phosphorylation and serotonin secretion in a phorbol ester-stimulated platelets / K. Yamada, K. Iwahashi, H. Kase // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1987. – Vol. 144(1). – P. 35-40.
65. Ohmichi, M. Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the trk tyrosine kinase / M. Ohmichi, S.J. Decker, L. Pang et al. // *Biochemistry.* – 1992. – Vol. 31. – P. 4034-4039.
66. Koizumi, S. K-252a: A specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells / S. Koizumi // *J. Neuroscience.* – 1988. – Vol. 8(2). – P.751-721.
67. Morita, Y. Role of protein kinase C in histamine release from human basophils / Y. Morita, T.Takaishi, Z. Honda et al. // *Allergy.* – 1988. – Vol. 43. – P.100-104.
68. Nakanishi, S. K-252a, a novel microbial product, inhibits smooth muscle myosin light chain kinase / S. Nakanishi, K. Yamada, H. Kase // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 6215-6219.
69. Papp, M. Antiinflammatory effect of a protein kinase C inhibitor (K-252a) on the development of the dextran-induced paw edema in the rat (Preliminary Results) / M. Papp, H. Kase, G. Gigler // *Acta Physiological Hungarica.* – 1992. – Vol. 80. – P. 423-425.
70. Grove, D.S. Differential activation and inhibition of lymphocyte proliferation by modulators of protein kinase c: diacylglycerols, "rationally designed" activators and inhibitors of protein kinase C / D.S. Grove, A.M. Mastro // *Exp. Cell Res.* – 1991. – Vol. 193(1). – P. 175-182.
71. Gmelin, R. Glucobrassicin, the precursor of thiocyanate ion, 3-indoleacetonitrile and ascorbigen in *Brassica oleracea* species / R. Gmelin, A. Virtanen // *Ann. Scand. Sei. Fennicae.* – 1961. – Vol. 107. – P. 1-25.

72. Gmelin, R. Neoglucobrassicin, ein Zweiter SCN-Precursor vom Indol typ in Brassica-Arten / R. Gmelin, A.I. Virtanen // *Acta Chem. Scand.* – 1962. – Vol. 16. – P. 1378-1381.
73. Bradfield, C.A. Modification of carcinogen metabolism by indolytic producers of Brassica oleraceae / C.A. Bradfield, L.F. Bjeldanes // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1991. – Vol. 289. – P. 153-163.
74. Liu, H. Indole[3,2-b]carbazole: a dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity / H. Liu, M. Wormke, S.H Safe et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1994. – Vol. 86. – P. 1758-1765.
75. Matthew, S. Prevention and Treatment of Cancer with Indole-3-Carbinol / S. Matthew, N.D. Brignall // *Altern. Med. Rev.* – 2001. – Vol. 6(6). – P. 580-589.
76. Preobrazhenskaya, M. Ascorbigen as a precursor of 5,1 1-dihydroindolo 3,2-b carbazole / M. Preobrazhenskaya, A. Korolev, E. Lazhko et al. // *Food Chem.* – 1993. – Vol. 48. – P. 57-62.
77. Okey, A. Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor / A. Okey, D. Riddick, P. Harper // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1994. – Vol. 15. – P. 226-232.
78. Rannug, U. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands / U. Rannug, A. Rannug, U. Sjoeborg et al. // *Chem. Biol.* – 1995. – Vol. 2, N. 12. – P. 841-845.
79. Sánchez, C. Engineering biosynthetic pathways to generate antitumor indolocarbazole derivatives / C. Sánchez, C. Méndez, J.A. Salas // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 33. – P. 560-568.
80. Sánchez, C. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds / C. Sánchez, L. Zhu, A.F. Braña et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 461-466.
81. Salas, J.A. Indolocarbazole anti-tumour compounds by combinatorial biosynthesis / J.A. Salas, C. Méndez // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 13. – P. 152-160.

82. Liu, R. Two indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marine-derived actinomycete Z2039-2 / R. Liu, T. Zhu, D. Li et al. // *Arch. Pharm. Res.* – 2007. – Vol. 30. – P. 270-274.
83. Robey, R.W. Inhibition of ABCG2-mediated transport by protein kinase inhibitors with a bisindolylmaleimide or indolocarbazole structure / R.W. Robey, S. Shukla, K. Steadman et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1877-1885.
84. Chin, L.S. K252a inhibits proliferation of glioma cells by blocking platelet-derived growth factor signal transduction / L.S. Chin, S.F. Murray, K.M. Zitny et al. // *Clin. Cancer Res.* – 1997. – Vol. 3. – P. 771-776.
85. Evans, A.E. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB / A.E. Evans, K.D. Kisselbach, X. Liu et al. // *Med. Pediatr. Oncol.* – 2001. – Vol. 36. – P. 181-184.
86. Iyer, R. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma / R. Iyer, A.E. Evans, X. Qi et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1478-1485.
87. Engen, C.B. Targeted Therapy of FLT3 in Treatment of AML – Current Status and Future Directions / C.B. Engen, L. Wergeland, J. Skavland et al. // *J. Clin. Med.* – 2014. – Vol. 3. – P. 1466-1489.
88. Fabbro, D. Inhibitors of protein kinases: CGP 41251, a protein kinase inhibitor with potential as an anticancer agent / D. Fabbro, E. Buchdunger, J. Wood et al. // *Pharmacol. Ther.* – 1999. – Vol. 82. – P. 293-301.
89. Fabbro, D. PKC412 – a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential / D. Fabbro, S. Ruetz, S. Bodis et al. // *Anticancer Drug Des.* – 2000. – Vol. 15. – P. 17-28.
90. Levis, M. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo / M. Levis, J. Allebach, K.F. Tse et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 3885-3891.
91. Патент USA 5015578 A от 14 мая 1991 г. BMY-41950 antitumor antibiotic / D. Schroeder, S. Lam Kin, J. Mattei, G.A. Hesler Filed on Feb. 20, 1990

92. Ikegami, Y. Antitumor activity of the new selective protein kinase C inhibitor 4'-N-benzoyl staurosporine on murine and human tumor models / Y. Ikegami, S. Yano, K. Nakao et al. // *Arzneimittelforschung*. – 1995. – Vol. 45, N 11. – P. 1225-1230.
93. Davis, P.D. Potent selective inhibitors of protein kinase C / P.D. Davis, C.H. Hill, E. Keech et al. // *FEBS Lett.* – 1989. – Vol. 259. – P. 61-63.
94. Shen, L. Induction of apoptosis in glioblastoma cells by inhibition of protein kinase C and its association with the rapid accumulation of p53 and induction of the insulin-like growth factor-1- binding protein-3 / L. Shen, R.I. Glazer // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 55(10). – P. 1711-1719.
95. Toullec, D. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C / D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266(24). – P. 15771-15781.
96. Behrens, M.M. Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line / M.M. Behrens, J.L. Martinez, C. Moratilla // *Cell. Growth Differ.* – 1995. – Vol. 6. – P. 1375-1380.
97. Vartanian, A. VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner / A. Vartanian, E. Stepanova, I. Grigorieva et al. // *Melanoma Res.* – 2011. – Vol. 21(2). – P. 91-98.
98. Lin, W. Induction of cell cycle arrest by the carbazole alkaloid Clauszoline-I from *Clausena vestita* D. D. Tao via inhibition of the PKC δ phosphorylation / W. Lin, Y. Wang, S. Lin et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 47. – P. 214-220.
99. Faul, M.M. Acyclic N-(azacycloalkyl)bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKC β / M.M. Faul, J.R. Gillig, M.R. Jirousek et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – Vol. 13(11). – P. 1857-1859.
100. Graff, J.R. The Protein Kinase C β -Selective Inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), Suppresses Signaling through the AKT Pathway, Induces Apoptosis, and Suppresses Growth of Human Colon Cancer and Glioblastoma Xenografts / J.R. Graff, A.M. McNulty, K.R. Hanna et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 7462-7469.

101. Herbst, R.S. Enzastaurin, a protein kinase C β -selective inhibitor, and its potential application as an anticancer agent in lung cancer / R.S. Herbst, Y. Oh, A.Wagle et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13 (15.2). – P. 4641-4646.
102. Ruggeri, B. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models / B. Ruggeri, J. Singh, D.Gingrich et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63(18). – P. 5978-5991.
103. Jones-Bolin, S. The effects of the oral, pan-VEGF-R kinase inhibitor CEP-7055 and chemotherapy in orthotopic models of glioblastoma and colon carcinoma in mice / S. Jones-Bolin, H. Zhao, K. Hunter et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 1744-1753.
104. Williams, R. Discontinued drugs in 2007: oncology drugs / R. Williams // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2008. – Vol. 17(12). – P. 1791-1816.
105. Hudkins, R.L. Synthesis and biological profile of the pan-vascular endothelial growth factor receptor/tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-like homology domains 2 (VEGF-R/TIE-2) inhibitor 11-(2-methylpropyl)-12,13-dihydro-2-methyl-8-(pyrimidin-2-ylamino)-4H-indazolo [5,4-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-4-one (CEP-11981): a novel oncology therapeutic agent / R.L. Hudkins, N.C. Becknell, A.L. Zulli et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – 55(2). – P. 903-913.
106. Pili, R. Open-Label Study to Determine the Maximum Tolerated Oral Dose of the Kinase Inhibitor CEP-11981 in Patients With Advanced Cancer / R. Pili, M. Carducci, P. Brown et al. // *Invest. New Drugs.* – 2014. – Vol. 32(6). – P.1258-1268. doi: 10.1007/s10637-014-0147-9
107. Overmeyer, J.H. A Chalcone-Related Small Molecule That Induces Methuosis, a Novel Form of Non-Apoptotic Cell Death, in Glioblastoma Cells / J.H.Overmeyer, A.M.Young, H.Bhanot et al. // *Mol. Cancer.* – 2011. – Vol. 10. – P. 69-85.

108. Maltese, W.A. Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments / W.A. Maltese, Overmeyer J.H. / *Am. J. Pathol.* – 2014. – Vol. 184(6). – P. 1630-1642.
109. Robinson, M.W. Synthesis and evaluation of indole-based chalcones as inducers of methuosis, a novel type of nonapoptotic cell death <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335538/> M.W. Robinson, J.H. Overmeyer, A.M. Young et al. // *J. Med Chem.* – 2012. – Vol. 55(5). – P. 1940-1956.
110. Mahboobi, S. Synthetic 2-aryloindole derivatives as a new class of potent tubulin-inhibitory, antimetabolic agents / S. Mahboobi, H. Pongratz, H. Hufsky et al. // *J. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 44, N 26. – P. 4535-4553.
111. Kristjansdottir, K. 7 Methyl indole ethyl isothiocyanate causes ROS mediated apoptosis and cell cycle arrest in endometrial cancer cells / K. Kristjansdottir, K. Kim, J.S. Choi et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2012. – Vol. 126. – P. 252-258.
112. Singh, R.K. Effect of Indole Ethyl Isothiocyanates on Proliferation, Apoptosis and MAPK Signaling in Neuroblastoma Cell Lines / R.K. Singh, T.S. Lange, K. Kim et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17(21). – P. 5846-5852.
113. Rahman, K.M. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells / K.M. Rahman, O. Aranha, F.H. Sarkar // *Nutr. Cancer.* – 2003. – Vol. 45, N 1. – P. 101-112.
114. Howells, L.M. Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line / L.M. Howells, B. Gallacher-Horley, C.E. Houghton et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1(13). – P. 1161-1172.
115. Hudson, E.A. Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line / E.A. Hudson, L.M. Howells, B. Gallacher-Horley et al. // *BMC Cancer.* – 2003. – Vol. 3. – P. 2.

116. Frydoonfar, H.R. Inhibition of proliferation of a colon cancer cell line by indole-3-carbinol. / H.R. Frydoonfar, D.R. McGrath, A.D. Spigelman // *Colorectal Dis.* – 2002. – Vol. 4. – P. 205-207.
117. Frydoonfar, H.R. The effect of indole-3-carbinol and sulforaphane on a prostate cancer cell line / H.R. Frydoonfar, D. R. McGrath, A.D. Spigelman // *ANZ J. Surg.* – 2003. – Vol. 73. – P. 154-156.
118. Chinni, S.R. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells / S.R. Chinni, Y. Li, S. Upadhyay et al. // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 2927-2936.
119. Zhang, J. Indole-3-carbinol induces a G1 cell cycle arrest and inhibits prostate-specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells / J. Zhang, B.A.J. Hsu, B.A.M. Kinseth // *Cancer.* – 2003. – Vol. 98. – P. 2511-2520.
120. Hsu, J.C. Indole-3-carbinol inhibition of androgen receptor expression and downregulation of androgen responsiveness in human prostate cancer cells / J.C. Hsu, J. Zhang, A. Dev et al. // *Carcinogenesis.* – 2005. – Vol. 26. – P. 1896-1904.
121. Meng, Q. Supression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes / Q. Meng, M. Qi, D.Z. Chen et al. // *J. Mol. Med.* – 2000. – Vol. 78(3). – P. 155-165.
122. Garikapaty, V.P.S. Anti-carcinogenic and anti-metastatic properties of indole-3-carbinol in prostate cancer / V.P.S. Garikapaty, B.T. Ashok, Y.G. Chen et al. // *Oncol. Reports.* – 2005. – Vol. 13. – P. 89-93.
123. Bush, J.A. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent / J.A. Bush, B.H. Long, J.J. Catino et al. // *J. Antibiotics.* – 1987. – Vol. 40. – P. 668-678.
124. Патент USA 5158938 А от 27 октября 1992 г. Rebeccamycin / K.S. Lam, D.R. Schroeder, J. Mattei, J.A. Matson, S. Forenza; Priority 1990-03-06, Expired 1991-09-23.

125. Kaneko, T. Water soluble derivatives of rebeccamycin / T. Kaneko, H. Wong, J. Utzig et al. // *J. Antibiot.* – 1990. – Vol. 43. – P. 125-127.
126. Weitman, S. In vitro antitumor activity of rebeccamycin analog (NSC 655649) against pediatric solid tumors / S. Weitman, R. Moore, H. Barrera et al. // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* – 1998. – Vol. 20. – P. 136-139.
127. Saulnier, M.G. Discovery of a fluoroindolo[2,3-a]carbazole clinical candidate with broad spectrum antitumor activity in preclinical tumor models superior to the marketed oncology drug, CPT-11 / M.G. Saulnier, B.N. Balasubramanian, B.H. Long et al. // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48. – P. 2258-2261.
128. Schurig, J.E. Experimental antitumor activity of BMY-28175 a new fermentation derived antitumor agent / J.E. Schurig, W.C. Rose, H. Kamei et al. // *Investigational New Drugs February.* – 1990. – Vol. 8. – P. 7-15.
129. Bigner, D.D. Therapeutic activity of the topoisomerase I inhibitor J-107088 [6-N-(1-hydroxymethyl-2-hydroxyl)ethylamino-12,13-dihydro-13-(beta-D-glucopyranosyl)-5H-indolo[2,3-a]-pyrrolo[3,4-c]-carbazole-5,7(6H)-dione] against pediatric and adult central nervous system tumor xenografts / D.D. Bigner, H.S. Friedman, S.T. Keir // *Cancer Chem. Pharm.* – 2001. – Vol. 48/3. – P. 250-254.
130. Ciomei, M. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model / M. Ciomei, V. Croci, A. Ciavolella et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 2856-2861.
131. Yoshinari, T. Induction of Topoisomerase I-mediated DNA Cleavage by a New Indolocarbazole, ED-110 / T. Yoshinari, A. Yamada, D. Uemura et al. // *Cancer Research.* – 1993. – Vol. 53. – P. 490-494.
132. Kojiri, K. A new antitumor substance BE-13793C, produced by a streptomycete. Taxonomy, fermentation, isolation, structure determination and biological activity / K. Kojiri, H. Kondo, T. Yoshinari et al. // *J. Antibiot.* – 1991. – Vol. 44. – Vol. 7. – P. 723-728.

133. Патент USA 5290698 от 03.01.1994 г. Streptoverticillium ferm P-10489 which produces antitumor agent BE-13793C / H. Suda, K. Kojiri, A. Okura, K. Kawamura, M. Okanishi.
134. Патент USA 5217885 A от 8.06.1993 г. Antitumor substance BE-13793C. / H. Suda, K. Kojiri, A. Okura, K. Kawamura, M. Okanishi.
135. Tanaka, S. A new indolocarbazole antitumor substance ED-110, a derivative of BE-13793C / S. Tanaka, M. Ohkubo, K. Kojiri et al. // J. Antibiot. Tokyo. – 1992. – Vol. 45. – P. 1797-1798.
136. Arakawa, H. ED-110, a novel indolocarbazole, prevents the growth of experimental tumors in mice / H. Arakawa, T. Iguchi, T. Yoshinari et al. // Jpn. J. Cancer Res. – 1993. – Vol. 84. – P. 574-581.
137. Yoshinari, T. Novel Antitumor Indolocarbazole Compound 6-*N*-Formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β -d-glucopyranosyl)-5*H*-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole-5,7(6*H*)-dione (NB-506): Induction of Topoisomerase I-mediated DNA Cleavage and Mechanisms of Cell Line-selective Cytotoxicity / T. Yoshinari, M. Matsumoto, H. Arakawa et al. // Cancer Res. – 1995. – Vol. 55. – P. 1310-1315.
138. Arakawa, H. Novel Indolocarbazole Compound 6-*N*-Formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β -d-glucopyranosyl)-5*H*-indolo[2,3-*a*]pyrro[3,4-*c*]carbazole-5,7(6*H*)-dione: Its Potent Antitumor Activities in Mice / H. Arakawa, T. Iguchi, M. Morita et al. // Cancer Res. – 1995. – Vol. 55. – P. 1316-1320.
139. Urasaki, Y. Use of camptothecin-resistant mammalian cell lines to evaluate the role of topoisomerase I in the antiproliferative activity of the indolocarbazole, NB-506 and its topoisomerase I binding site / Y. Urasaki, G. Laco, Y. Takebayashi et al. // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 504-508.
140. Ohkubo, M. Synthesis and Biological Activities of Topoisomerase I Inhibitors, 6-*N*-amino analogues of NB-506 / M. Ohkubo, K. Kojiri, H. Kondo et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1999. – Vol. 9(9). – P.1219-1224.

141. Kim, H. Nitrile-containing fischerindoles from the cultured cyanobacterium *Fischerella* sp / H. Kim, A. Krunic, D. Lantvit et al. // *Tetrahedron* – 2012. – Vol. 68, N 15. – P. 3205-3209.
142. Kim, H. Indole alkaloids from two cultured cyanobacteria, *Westiellopsis* sp. and *Fischerella muscicola* / H. Kim, D. Lantvit, C.H. Hwang et al. // *Bioorg. And Med. Chem.* – 2012. – Vol. 20, N 17. – P. 5290-5295.
143. Lyakhova, E.G. Bromine-containing alkaloids from the marine sponge *Penares* sp / E.G. Lyakhova, S.A. Kolesnikova, A.I. Kalinovskiy et al. // *Tetrahedron Lett.* – 2012. – Vol. 53, N 45. – P. 6119-6122.
144. Stone, R.M. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC 412 / R.M. Stone, D.J. De Angelo, V. Klimek et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 105. – P. 54 - 60.
145. Weiseberg, E. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC / E. Weiseberg, C. Boulton, L.M. Kelly et al. // *Int. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 412, 1(5). – P. 433-443.
146. Cools, J. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia / J. Cools, N. Mentens, P. Furet et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64 (18). – P. 6385-6389.
147. Midostaurin Access Program for Newly Diagnosed FLT3 (ITD or TKD) Mutated AML Adult Patients Eligible for Standard Induction and Consolidation Chemotherapy.
148. Alliance for Clinical Trials in Oncology, Daunorubicin, Cytarabine, and Midostaurin in Treating Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia, ClinicalTrials.gov, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2014.
149. Oh, Y. Enzastaurin, an oral, serine/threonine kinase inhibitor, as second- or third-line therapy of non-small cell lung cancer / Y. Oh, R.S. Herbst, H. Burris et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26(7). – P. 1135-1141.

150. Rampling, R. A phase I study of LY317615 (enzastaurin) and temozolomide in patients with gliomas (EORTC trial 26054) / R. Rampling, M. Sanson, T. Gorlia et al. // *Neuro Oncol.* – 2012. – Vol. 14(3). – P. 344-350.
151. Oda, Y. A phase II trial of enzastaurin (LY317615) in combination with bevacizumab in adults with recurrent malignant gliomas / Y. Oda, F.M. Iwamoto, A. Moustakas et al. // *J. Neurooncol.* – 2016. – Vol. 127(1). – P. 127-135.
152. Kingston D.G.I., Newman D.J. Natural Products as Anticancer Agents. Natural products in chemical biology / Ed. Civjan, N. Wiley, Hoboken, NJ, 2012, pp. 325-349.
153. Smith, B.D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia / B.D. Smith, M. Levis, M. Beran et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103(10). – P. 3669-3676.
154. Santos, F.P. Phase II study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis / F.P. Santos, H.M. Kantarjian, N. Jain et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 115(6). – P. 1131-1136.
155. Minturn, J.E. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study / J.E. Minturn, A.E. Evans, J.G. Villablanca et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 68, N 4. – P. 1057-1065.
156. Schwandt, A. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and -II inhibitor, in relapsed "sensitive" small cell lung cancer / A. Schwandt, T. Mekhail, B. Halmos et al. // *J. Thorac Oncol.* – 2012. – Vol.7 (4). – P. 751-754.
157. Dowlati, A. Randomized phase II trial of different schedules of administration of rebeccamycin analogue as second line therapy in non-small cell lung cancer / A. Dowlati, R. Chapman, S. Subbiah et al. // *Invest New Drugs.* – 2005. – Vol. 23(6). – P. 563-567.

158. Dowlati, A. Phase II and pharmacokinetic trial of rebeccamycin analog in advanced biliary cancers / A. Dowlati, J. Posey, R.K. Ramanathan et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 65(1). – P.73-78.
159. Langevin, A. A phase II trial of rebeccamycin analogue (NSC 655649) in children with solid tumors. A Children's oncology group study / A. Langevin, M. Bernstein, J. Kuhn et al. // *Pediat. Blood Cancer.* – 2008. – Vol. 50 (3). – P. 577-580.
160. Burstein, H.J. Rebeccamycin analog for refractory breast cancer: a randomized phase II trial of dosing schedules / H.J. Burstein, B. Overmoyer, R. Gelman et al. // *Invest New Drugs.* – 2007. – Vol. 25 (2). – P. 161-164.
161. Hussain, M. A phase II study of rebeccamycin analog (NSC-655649) in metastatic renal cell cancer / M. Hussain, U. Vaishampayan, L.K. Heilbrun et al. // *Invest New Drugs.* – 2003. – Vol. 21(4). – P. 465-471
162. Goel, S. A phase II study of rebeccamycin analog NSC 655649 in patients with metastatic colorectal cancer / S. Goel, S. Wadler, A. Hoffman et al. // *Invest New Drugs.* – 2003. – Vol. 21(1). – P.103-107.
163. Nock, C.J. A phase I study of rebeccamycin analog in combination with oxaliplatin in patients with refractory solid tumors / C.J. Nock, J.M. Brell, J.A. Bokar et al. // *Invest New Drugs.* – 2011. – Vol. 29(1). – P. 126-130.
164. Ricart, A.D. Phase I and pharmacokinetic study of sequences of the rebeccamycin analogue NSC 655649 and cisplatin in patients with advanced solid tumors / A.D. Ricart, L.A. Hammond, J.G. Kuhn et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. – Vol. 11 (24 Pt 1). – P. 8728-8736.
165. Saif, M.W. A phase I dose-escalation study of edotecarin (J-107088) combined with infusional 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced/metastatic solid tumors / M.W. Saif, S. Sellers, R.B. Diasio et al. // *Anticancer Drugs.* – 2010. – Vol. 21(7). – P. 716-723.
166. Pfizer, Study of IV Edotecarin Vs Temozolomide or Carmustine (BCNU) or Lomustine (CCNU) in Patients With Glioblastoma Multiforme / *Clinical Trials.gov*, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2008.

167. ClinicalTrials.gov: A service of the U.S. National Institutes of Health. Available online: <http://www.clinicaltrials.gov> (accessed on 20 June 2015).
168. Sánchez, C. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity / C. Sánchez, C. Méndez, J.A. Salas // *Nat. Prod. Rep.* – 2006. – Vol. 23(6). – P. 1007-1045.
169. Fabbro, D. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs / D. Fabbro, S. Ruetz, E. Buchdunger et al. // *Pharmacol. Ther.* – 2002. – Vol. 93(2–3). – P. 79-98.
170. Zimmermann, A. "Indolocarbazoles exhibit strong antiviral activity against human cytomegalovirus and are potent inhibitors of the pUL97 protein kinase / A. Zimmermann, H. Wilts, M. Lenhardt et al. // *Antiviral Res.* – 2000. – Vol. 48(1). – P. 49-60.
171. List, A.F. Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance / A.F. List // *Semin. Hematol.* – 1997. – Vol. 34, N 4. – Suppl. 5. – P. 20-24.
172. Akinaga, S. Antitumor activity of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, in murine and human tumor models / S. Akinaga, K. Gomi, M. Morimoto et al. // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51(18). – P. 4888-4892.
173. Sikic, B.I. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance / B.I. Sikic // *Semin. Hematol.* – 1997. – Vol. 34, N 4. – Suppl. 5. – P. 40-47.
174. Xia, P. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth / P. Xia, L.P. Aiello, H. Ishii et al. // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98(9). – P. 2018-2026.
175. Bredel, M. Protein kinase C inhibition by UCN-01 induces apoptosis in human glioma cells in a time-dependent fashion / M. Bredel, I.F. Pollack, J.M. Freund et al. // *J. Neurooncol.* – 1999. – Vol. 41(1). – P. 9-20.
176. Rosnet, O. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells / O. Rosnet, H.J. Buhring, S. Marchetto et al. // *Leukemia.* – 1996. – Vol. 10(2). – P. 238-248.

177. Faul, M.M. Acyclic N-(azacycloalkyl)bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKC β / Faul M.M., Gillig J.R., Jirousek M.R. et al. // *Bioorg Med. Chem. Lett.* – 2003. – Vol. 13(11). – P. 1857-1859.
178. Querfeld, C. The selective protein kinase C β inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway / C. Querfeld, M.A. Rizvi, T.M. Kuzel et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126 (7). – P. 1641-1647.
179. Rizvi, M.A. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C β inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines / M.A. Rizvi, K. Ghias, K.M. Davies et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5(7). – P. 1783-1789.
180. Denny, W.A. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs / W. A. Denny // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* – 2004. – Vol. 9. – P. 105-133.
181. Long, B.H. Discoveri of antitumor indolocarbazoles: Rebeccamycin, NSC 655649, and fluoroloindolocarbazoles / B.H. Long, W.S. Rose, D.M. Vyas et al. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* – 2002. – Vol. 2. – P.255-266.
182. Yoshinari, T. Mode of action of a new indolocarbazole anticancer agent, J-107088, targeting topoisomerase / T. Yoshinari, M. Ohkubo, K. Fukasawa et al. // *I. Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 4271-4275.
183. Kaluzhny, D.N. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA / D.N. Kaluzhny, V.V. Tatarskiy, L.G. Dezhenkova et al. // *ChemMedChem.* – 2009. – Vol. 4, N 10. – P. 1641-1648.
184. Tatarskiy, V.V. High antitumor activity of novel glycosylated indolocarbazole is determined by strong intercalation into DNA / V.V. Tatarskiy, D.N. Kaluzhny, A.K. Shchyolkina et al. // *Proc. 14th Euroconference on Apoptosis 'Death or Survival: Fate in Sardinia', Chia, Italy, 2006, P.230.*
185. Denny, W.A. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs / W.A. Denny // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* – 2004. – Vol. 9. P. 105-133.

186. Jackson, J.R. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage / J.R. Jackson, A. Gilmartin, C. Imburgia et al. // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 566-572.
187. Kaluzhny, D.N. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to the duplex and telomeric G-quadruplex DNA / D.N. Kaluzhny, O.F. Borisova, A.K. Shchyolkina et al. // *Second International Meeting on Quadruplex DNA.* – 2009, Louisville, KY. – P. 60.
188. Shtil, A.A. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms as targets for prevention of emergence of multidrug resistance in human cancer cells (invited review) / A.A. Shtil // *Current Drug Targets.* – 2001. – Vol. 2. – P. 57-77.
189. Kleinschrot, J. Novel indolocarbazole protein kinase C inhibitors with improved biochemical and physicochemical properties / J. Kleinschrot, J. Hartenstein, C. Rudolf et al. // *Bio-org. Med. Chem. Lett.* – 1995. – Vol. 5. – P. 55-60.
190. Goekjian, P.G. Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development / P.G. Goekjian, M.R. Jirousek et al. // *Curr. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 6. – P. 877-903.
191. Bridges, A. J. Chemical Inhibitors of Protein Kinases / A. J. Bridges // *Chem. Rev.* – 2001. – Vol. 101. – P. 2541-2571.
192. Bush, J.A. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent / J.A. Bush, B.H. Long, J.J.Catino et al. // *J. Antibiotics.* – 1987. – Vol. 40(5). – P. 668-678.
193. Sordet, O. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors / O. Sordet, Q.A. Khan, K.W. Kohn et al. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* – 2003. – Vol. 3 (4). – P. 271-290.
194. Helleday, T. DNA repair pathways as targets for cancer therapy / T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 193-204.
195. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: The next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 646-674.

196. Xu, Y. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy / Y. Xu, C. Her // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5(3). – P. 1652-1670.
197. Geran, R.I. Protocol for screening agents and natural products against animal tumors and other biological systems / R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. Macdonald et al. // *Cancer Chemother. Rep.* – 1972. – Vol. 3, N. 2. – P. 9-11.
198. Waud, W.R. Murine L1210 and P388 leukemias / W.R. Waud // *Anticancer Drug Development Guide*. – 2nd ed. / Eds. B.A. Teicher, P.A. Andrews. – Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. – P. 79-97.
199. Chabner, B.A. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice* / B.A. Chabner, D.L. Longo. – 3rd ed. – Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. – P. 678-690.
200. Kombarov, R. BioCores: identification of a drug/natural product-based privileged structural motif for small-molecule lead discovery <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19468851> / R. Kombarov, A. Altieri, D. Genis et al. // *Molecular diversity*. – 2010. – Vol. 14, N 1. – P. 193-200.