

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ипатова Дарья Андреевна

**Избирательная цитотоксичность и особенности действия в опухолевых
клетках производных пиразолкарбоксамидов, хроман-4-она, 1,4-нафтохинона,
пирроло[1,2 α]хиноксалина и фотоактивируемых соединений Pt**

1.4.9. Биоорганическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Скворцов Дмитрий Александрович

Москва 2026

Оглавление

Список сокращений	6
Введение	8
Актуальность и степень разработанности темы исследования	8
Цели и задачи исследования	9
Объект и предмет исследования	9
Научная новизна исследования	9
Научная и практическая значимость исследования.....	10
Методология диссертационного исследования.....	10
Основные положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности результатов	12
Апробация работы	12
Публикации	13
Личный вклад автора.....	14
Структура и объем диссертации	15
Глава 1. Обзор литературы	16
1.1 Поиск новых малых молекул как противоопухолевых агентов	16
1.1.1 Использование известных фармакофоров: репозиционирование и модификации уже существующих лекарственных средств	16
1.1.1.1 Репозиционирование лекарственных средств	16
1.1.1.2 Структурная оптимизация противоопухолевых лекарственных средств.....	17
1.1.2 Поиск новых молекул как потенциальных противоопухолевых агентов	19
1.1.2.1 Рациональный дизайн противоопухолевых средств	20
1.1.2.2 Фенотипический скрининг для поиска новых противоопухолевых препаратов.....	21
1.1.2.3 Модели, которые используются для проведения фенотипических скринингов.....	22
1.1.2.4 Формирование библиотек химических соединений	25
1.2 Противоопухолевая активность производных пиразолкарбоксамидов	26
1.3 Противоопухолевая активность производных хроман-4-она	31
1.4 Противоопухолевая активность производных 1,4-нафтохинона.....	33
1.4.1 Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами и ферментами, ассоциированными с регуляцией клеточного цикла	36

1.4.2	Нарушение окислительно-восстановительного баланса в клетке.....	37
1.4.3	Ингибирование антиоксидантных ферментов и истощение внутриклеточного глутатиона	39
1.4.4	Активация АФК-зависимых сигнальных путей (MAPK, JNK, p38, STAT3).....	41
1.4.5	Другие белковые/ферментные мишени производных 1,4-нафтохинона.....	42
1.5	Противоопухолевая активность производных пирроло[1,2 α]хиноксалина.....	43
Глава 2.	Материалы и методы	47
2.1	Клеточные линии и среды.....	47
2.2	Библиотека химических соединений	47
2.3	Оценка цитотоксичности с использованием сокультур флуоресцентных клеточных линий (fluorescent co-culture test, FCCT).....	48
2.4	Тест по Мосманну	48
2.5	Анализ клеточного цикла.....	49
2.6	Анализ клеточной гибели (определение индукции апоптоза/некроза).....	50
2.7	Анализ интеркаляции в ДНК методом вытеснения бромистого этидия	50
2.8	Анализ ингибирования биосинтеза ДНК <i>in vitro</i>	51
2.9	Анализ продукции активных форм кислорода методом проточной цитометрии	51
2.10	Подготовка образцов для транскриптомного анализа и обработка данных транскриптомного анализа.....	52
2.11	Анализ ингибирования полимеризации тубулина <i>in vitro</i>	52
2.12	Иммуноцитохимическое окрашивание тубулина в клеточных линиях	53
2.13	Вестерн-блоттинг	53
2.14	Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.....	54
2.15	Подготовка растворимых форм соединений-лидеров для <i>in vivo</i> исследований переносимости и противоопухолевого эффекта	55
Глава 3.	Результаты и обсуждения	56
3.1	Высокопроизводительный скрининг цитотоксичности и селективности веществ с использованием флуоресцентных сокультур клеточных линий (FCCT)	57
3.2	Производные пиразолкарбоксамидов	58
3.2.1	Производные пиразолкарбоксамидов, избирательно цитотоксичные в сокультурах и монокультурах клеточных линий	58
3.2.2	Анализ зависимости структура-активность производных пиразолкарбоксамидов	60

3.2.3 Противоопухолевый эффект соединения-лидера класса производных пиразолкарбоксамиды	64
3.3 Производные хроман-4-она	65
3.3.1. Избирательная цитотоксичность производных хроман-4-она в модели рака молочной железы.....	65
3.3.2 Анализ взаимосвязи структура-активность производных спироциклогексанхроман-4-она	68
3.3.3 Цитотоксичность, остановка клеточного цикла и индукция апоптоза в клетках рака молочной железы MCF7 соединением-лидером	73
3.4 Производные 1,4-нафтохинона.....	74
3.4.1 Значимость нафтохинонового фрагмента в фармакофоре для избирательной цитотоксичности	74
3.4.2 Анализ закономерностей структура-активность для производных 1,4-нафтохинона	76
3.4.3 Механизмы действия соединений-лидеров 45 и 49	79
3.4.3.1 Остановка клеточного цикла и индукция позднего апоптоза/некроза	79
3.4.3.2 Транскриптомный анализ: изменение транскрипции генов, ассоциированных со стрессом ЭПР.....	80
3.4.3.3 Индукция стресса эндоплазматического ретикулума.....	81
3.4.3.4 Интеркаляция и ингибирование синтеза ДНК <i>in vitro</i>	83
3.4.3.5 Нарушение мембранного потенциала митохондрий.....	84
3.4.3.6 Индукция окислительного стресса	85
3.4.3.7 Сравнительный анализ механизмов действия соединений-лидеров 45 и 49	86
3.4.4 Противоопухолевая активность соединения-лидера 49 в модели привитой опухоли.....	87
3.5 Производные пирроло[1,2 α]хиноксалина	88
3.5.1 Анализ закономерностей структура-активность производных пирроло[1,2 α]хиноксалина	92
3.5.2 Ингибирование полимеризации тубулина <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> соединением-лидером 77	97
3.5.3 Противоопухолевая активность соединения-лидера 77 в моделях мышинных лейкозов и привитых опухолей.....	99
3.6 Соединения, проявляющие цитотоксическое действие при фотораспаде.....	101
3.6.1 Цитотоксичность соединений, содержащих тетраацетилрибофлавин в качестве лиганда,	

при фотообработке	102
3.6.2 Цитотоксичность соединений, содержащих BODIPY в качестве лиганда, при фотообработке	103
Заключение	106
Список литературы	108
Приложение	131

Список сокращений

- ADC – antibody-drug conjugates; конъюгаты моноклональных антител с лекарственными средствами
- ALK – anaplastic lymphoma kinase; киназа анапластической лимфомы
- Bax/BCL-2 – Bcl-2-associated X protein/ B-cell lymphoma; Bcl-2-ассоциированный X-белок 2 / В-клеточная лимфома 2
- CAF – cancer-associated fibroblasts; ассоциированные с раком фибробласты
- CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 – cyclin-dependent kinase ; циклин-зависимые киназы
- DTT – дитиотреитол
- EdU – 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; 5-этинил-2-дезоксисуридин
- EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor; рецептор эпидермального фактора роста
- FDA – Food and Drug Administration; Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- FCST – fluorescent coculture test; флуоресцентный тест в сокультурах
- GI₅₀ – growth inhibition 50%; концентрация, ингибирующая рост клеток на 50%
- GPER - G-protein-coupled estrogen receptor 1; G-белок сопряженный рецептор, связывающий эстроген
- GPX4 – GPX4 glutathione peroxidase; глутатионпероксидаза 4
- HDAC6 – Histone Deacetylase 6; гистондеацетилаза 6
- HER2 – Human Epidermal growth factor Receptor; мембранный белок, являющийся тирозинкиназой
- IC₅₀ – (half maximal) inhibitory concentration; (полу)максимальная ингибирующая концентрация
- JNK, p38MAPK, PI3-K/Akt – c-Jun N-terminal kinases; N-терминальные киназы c-Jun
- K_i – константа ингибирования
- KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; ГТФаза, протоонкоген, представитель семейства белков Ras
- LC₅₀ – lethal concentration 50%; концентрация, вызывающая гибель 50% клеток
- NQO1 – NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктаза 1
- PARP – Poly (ADP-ribose) Polymerase; поли(АДФ-рибоза)-полимераза

PBMC – human peripheral blood mononuclear cells; периферические мононуклеарные клетки крови

PDGFR – Platelet-derived growth factor receptor; рецептор тромбоцитарного фактора роста

PKI – protein kinase inhibitor; соединения, ингибирующие активность протеинкиназ

PROTAC – Proteolysis targeting chimera; бифункциональная молекула, таргетирующая белок-мишень и убиквитинлигазу

SAR – structure-activity relationship; зависимость структура-активность

STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3; сигнальный белок и активатор транскрипции

TGI – total growth inhibition; полное ингибирование роста

VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor; рецептор фактора роста эндотелия сосудов

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КИ – клинические испытания

МТТ - 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромидом

РНК – рибонуклеиновая кислота

ОФЕ – относительные флуоресцентные единицы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФДТ – фотодинамическая терапия

ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Онкологические заболевания остаются одними из самых серьезных вызовов для современного здравоохранения [1]. Несмотря на широкий спектр уже применяющихся в терапии лекарственных средств, высокая гетерогенность опухолей и склонность раковых клеток к мутациям приводят к развитию резистентности [2]. В связи с этим поиск новых противоопухолевых агентов остается важной задачей.

Согласно отчету CDER "*Advancing Health Through Innovation*" за 2025 год, около половины одобренных FDA противоопухолевых препаратов являются малыми органическими молекулами [2-4]. Большинство новых низкомолекулярных соединений представляют собой таргетные ингибиторы тирозинкиназ, серин/треонин-киназ и медиаторов ангиогенеза. Сохраняется интерес также и к агентам общей химиотерапии, в том числе ДНК-связывающим соединениям и ингибиторам полимеризации тубулина, но акцент смещён на селективность и персонализацию терапии [5-7]. Особое внимание в биоорганической и медицинской химии при поиске новых терапевтически активных малых органических молекул уделяется так называемым привилегированным структурным фрагментам. Привилегированные структурные фрагменты легко поддаются химическим модификациям и входят в структуру многих соединений с уже известной биологической активностью [8]. Методологически поиск новых лекарственных средств продолжает во многом опираться на фенотипические тесты, не требующие предварительного знания молекулярной мишени [9]. Такая стратегия ценна для открытия «первых в классе» лекарственных средств и выявления новых биологических мишеней [10]. Также при использовании фенотипических тестов избегается чрезмерное упрощение предполагаемых молекулярных мишеней, а внимание сосредотачивается на функциональных эффектах исследуемого соединения [11]. Объединение таких подходов, как фенотипический скрининг и рациональный структурный дизайн с включением привилегированных фрагментов, позволяет выявлять высокоселективные молекулы и оптимизировать их свойства на самых ранних этапах разработки лекарственных средств.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является выявление новых, обладающих высокой избирательной цитотоксичностью малых органических молекул в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Провести скрининг библиотеки низкомолекулярных органических соединений для выявления селективных соединений-хитов.
- Создать коллекции структурных аналогов соединений-хитов и провести анализ их цитотоксичности и селективности. Выделить ключевые фрагменты фармакофора и определить соединения-лидеры.
- Определить молекулярные механизмы действия соединений-лидеров *in vitro*.
- Продемонстрировать цитотоксические эффекты новых фотоактивируемых соединений платины *in vitro* при облучении их светом соответствующей длины волны.
- Разработать водорастворимые формы соединений-лидеров для проведения исследования их переносимой дозы и противоопухолевой активности на мышинных моделях привитых опухолей и лейкозов. Проанализировать результаты исследований *in vitro* в совокупности с данными *in vivo*.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования в настоящей работе являются малые органические молекулы, в частности относящиеся к структурным производным 1,4-нафтохинона, пирроло[1,2 α]хиноксалина, пиразолкарбоксамиды, хроман-4-она, а также фотоактивируемые соединения платины, конъюгированные с фотосенсибилизаторами. Предметами исследования являются избирательность действия и цитотоксичность изучаемых соединений, а также их механизмы действия.

Научная новизна исследования

В рамках данного исследования была проанализирована цитотоксичность и селективность действия нескольких классов коммерчески доступных и впервые синтезированных малых органических соединений. Для каждого класса соединений были выявлены ключевые зависимости между структурой исследуемых производных и проявляемыми эффектами. Исходя из полученных данных, был проведен рациональный дизайн и дальнейшая структурная оптимизация наиболее перспективных агентов. Среди производных 1,4-нафтохинона было выявлено избирательно цитотоксичное соединение-лидер, для которого не характерны такие эффекты, как взаимодействие с ДНК и индукция АФК, что, как правило, свойственно производным данного класса. При этом

соединение показывало выраженный противоопухолевый эффект в экспериментах *in vivo*. Обнаружен структурно новый ингибитор полимеризации тубулина, относящийся к производным пирроло[1,2 α]хиноксалина. Для данного соединения определен механизм действия и также установлены выраженные противоопухолевые эффекты *in vivo*.

Научная и практическая значимость исследования

В рамках работы получены данные о действии более 600 низкомолекулярных органических веществ на клеточные линии различной этиологии. Для четырех структурных классов соединений проанализированы зависимости структура-активность. Благодаря полученным данным возможна направленная модификация этих молекулярных каркасов для увеличения их цитотоксичности и избирательности действия. Соединения-лидеры, обладающие высокой селективностью и цитотоксичностью, проявили противоопухолевое действие в исследованиях *in vivo*.

Методология диссертационного исследования

При проведении экспериментов использовали современные методы клеточной и молекулярной биологии, а также биоорганической химии. Исследование проводилось на клеточных линиях человека различной этиологии (HepG2, U87, MDA-MB-231, SiHa, HT1080, HCT116, LNCaP, 22Rv1, PC3, A549, VA13, MCF7, MCF10A, HEK293T). В том числе использовались модифицированные клеточные линии, полученные в ходе предыдущей работы научной группы: MCF7_GFP и A549_GFP (линии опухолевой этиологии, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок); MCF10A_Katushka и VA13_Katushka (линии неопухолевой этиологии, экспрессирующие красный флуоресцентный белок). Данные модифицированные клеточные линии использовались для проведения скрининговых исследований для оценки токсичности и селективности соединений в сокультурах. Мы сочетанно культивировали клетки MCF7_GFP и MCF10A_Katushka (модель рака молочной железы); A549_GFP и VA13_Katushka (модель рака легкого). По соотношению интенсивности флуоресцентного сигнала в красном и зеленом каналах оценивались одновременно цитотоксичность и селективность исследуемых соединений, на основе которой оценивался рейтинг селективности (SR), соответствующий числу последовательных разведений, при которых наблюдалась двухкратная и более селективность в FCCT тесте.

Цитотоксичность исследуемых производных в монокультурах клеточных линий определяли стандартным МТТ тестом. Селективность соединений в МТТ тесте определялась как соотношение

IC₅₀ для линий опухолевой и неопухолевой этиологии (индекс селективности). В качестве соединений-лидеров выбирались молекулы, чей индекс селективности был равен или превышал 10 в сравнении по крайней мере с одной из неопухолевых клеточных линий, а IC₅₀ находилась в наномолярном или низком микромолярном диапазоне.

Влияние на клеточный цикл и клеточную гибель определяли методом проточной цитометрии, окрашивая клетки растворами йодистого пропидия и аннексина V, конъюгированного с флуорофором.

Для микроскопической визуализации изменения мембранного потенциала митохондрий использовался флуоресцентный краситель JC1. Изменение уровня новосинтезированной ДНК определяли при помощи инкубации клеток с модифицированным нуклеотидом (EdU) с последующим присоединением флуорофора по реакции [1,3]-диполярного циклоприсоединения. Нарушение полимеризации тубулина визуализировали методом иммуноцитохимии и турбидиметрическим методом на выделенном тубулине.

Для оценки индукции стресса ЭПР измеряли экспрессию генов ATF4 и количество сплайсированной формы XBP1s методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; а также изменение уровня фосфорилированной формы белка eIF2 α с помощью вестерн блоттинга.

При создании физиологически приемлемой водорастворимой формы исследуемых соединений для парентерального введения были разработаны составы, содержащие допустимые вспомогательные вещества (коллифор, этиловый спирт, ПЭГ300).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обнаруженные соединения-лидеры избирательно цитотоксичны в отношении опухолевых клеток различной этиологии. Полумаксимальные ингибирующие концентрации данных соединений находятся в низком микромолярном или наномолярном диапазоне. В структуре оптимизированных соединений-лидеров выделены фрагменты, критически важные для их цитотоксичности и селективности действия.

2. Молекулярный механизм действия исследованных производных пирроло[1,2 α]хиноксалина заключается в ингибировании полимеризации тубулина.

3. Механизм действия исследованных производных 1,4-нафтохинона опосредован индукцией стресса ЭПР. Выделенное в этом структурном классе соединение-лидер не является ДНК-интеркалятором и не ингибирует репликацию.

4. Исследованные фотоактивируемые производные платины проявляют цитотоксический эффект только при облучении их светом соответствующей длины волны.

5. Соединения-лидеры, относящиеся к производным 1,4-нафтохинона, пирроло[1,2 α]хиноксалина и пиразол-3-карбоксамиды, являются переносимыми для мышей в диапазоне концентраций от 5 мг/кг до 32 мг/кг.

6. Токсичность в отношении опухолевых клеток соединений-лидеров, являющихся структурными производными 1,4-нафтохинонов и пирроло[1,2 α]хиноксалина, воспроизводится в виде противоопухолевого эффекта в экспериментах *in vivo* на мышинных моделях привитых опухолей и лейкозов.

Степень достоверности результатов

Достоверность экспериментальных результатов диссертационной работы подтверждается воспроизводимостью биологических и биохимических методов анализа на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими российскими и мировыми компаниями. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждаются публикациями результатов исследования в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Апробация работы

Работа была доложена на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Основные результаты исследований докладывались на пяти конференциях (в том числе всероссийских и международных), а именно:

1. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2026» (Москва, 2026)

2. Международная научная конференция «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 2025)

3. Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений KOST-2025 (Владикавказ, 2025)

4. 6-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2024» (Нижний Новгород, 2024)

5. XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Сочи, 2024)

Публикации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1. **Ipatova D.A.**, Ikonnikova V.A., Kungurtsev K.D., Kashapov A.I., Shafikov R.R., Kartsev V.G., Glushkov A.K., Myasnyanko I.N., Baranov M.S., Mikhaylov A.A., Dontsova O.A., Skvortsov D.A. Spirocyclohexane-Chroman-4-one Derivatives as Selectively Cytotoxic Agents in Breast Cancer Models // ACS Medicinal Chemistry Letters. — 2026. — Vol. 17, №5. — pp. 1114–1120. Импакт-фактор 4,0 (JIF). Doi: 10.1021/acsmchemlett.6c00023. 0,35 п.л.

2. Skvortsov D.A.*, Zhirkina I.V.*, **Ipatova D.A.***, Vasilyeva L.A., Ivanenkov Ya.A., Rubtsova M.P., Kartsev V.G., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Coculture-Based Screening Revealed Selective Cytostatic Effects of Pyrazol-Azepinoindoles // ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery. — 2025. — Vol. 20, №12. — P. e202500052. Импакт фактор 3,4 (JIF). EDN: EPNRJJ. 0,6 п. л.

*одинаковый вклад (equal contribution)

3. Скворцов Д.А., Жиркина И.В., **Ипатов Д.А.**, Писарев А.Р., Малышев А.С., Иваненков Я.А., Карцев В.Г., Донцова О.А. Новые ингибиторы киназ, избирательно цитотоксичные для опухолевых клеток // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. — 2025. — Т. 521, №1. — С. 253-259. Импакт фактор 0,549 (РИНЦ). EDN: EPZTCF. 0.35 п.л.

Skvortsov D.A., Zhirkina I.V., **Ipatova D.A.**, Pisarev A.R., Malyshev A.S., Ivanenkov Y.A., Kartsev V.G., Dontsova O.A. New Kinase Inhibitors That Are Selectively Cytotoxic for Tumor Cells // Doklady Biochemistry and Biophysics. — 2025. — Vol. 521, №1. — pp. 239-245. Импакт фактор 0,7 (JIF). EDN: JURCVK. 0,35 п.л.

4. Spector D.V., Karetnikov G., Bublely A., Akasov R.A., Isaeva Yu.A., Egorova T.V., Martynov A.G., Bunin D., Skvortsov D.A., **Ipatova D.A.**, Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Mamed-Nabizade V., Kolmogorov V.S., Vaneev A.N., Rodin I.A., Vokuev M.F., Grishin Yu.K., Roznyatovsky V.A., Nikitina V.N., Beloglazkina E.K, Krasnovskaya O.O. Photoactivatable Cisplatin-Combretastatin-BODIPY Pt(IV) Prodrug for Dual-Action Light-Controlled Chemotherapy // ACS Pharmacology & Translational Science. — 2025. — Vol. 8, №9. — pp. 3296-3313. Импакт фактор 3,7 (JIF). EDN: AMRVSS. 0.9 п.л.

5. Krasnovskaya O.O., Akasov R.A., Spector D.V., Pavlov K.G., Bublely A.A., Kuzmin V.A., Kostyukov A.A., Khaydukov E.V., Lopatukhina E.V., Semkina A.S., Vlasova K.Yu., Sypalov S.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Vaneev A.N., Nikitina V.N., Skvortsov D.A., **Ipatova D.A.**, Mazur D.M., Zyk N.V., Sakharov D.A., Majouga A.G., Beloglazkina E.K. Photoinduced Reduction of Novel Dual-Action Riboplatin Pt(IV) Prodrug // ACS Applied Materials & Interfaces. — 2023. — Vol. 15, №10. — pp. 12882-12894. Импакт фактор 8,2 (JIF). EDN: ALDTEV. 0,65 п.л.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные, приведенные в рамках диссертационного исследования, за исключением *in vivo* исследований и химического синтеза, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Автором проведены скрининговые исследования в сокультурах и монокультурах клеточных линий различной этиологии. Получены и проанализированы данные о цитотоксичности и селективности исследуемых соединений, выполнен анализ связи структура-активность для 4 структурных классов (работы [1-3]). Дизайн направленной модификации соединений был проведен совместно с коллегами. Синтез был проведен научными группами Г.Л. Каретникова и Д.А. Гука в НИЛ элементоорганических соединений (ХФ МГУ) (производные пирроло[1,2 α]хиноксалина), А.В. Финько на кафедре органической химии (ХФ МГУ) (производные пиразолкарбоксамиды), А.А. Михайлова и В.А. Иконниковой в группе химии природных соединений ИБХ РАН (производные хроман-4-она), Д.В. Спектора и О.О. Красновской в НИЛ БАОС ХФ МГУ (фотоактивируемые соединения Pt). Коммерчески доступные соединения были получены из библиотеки IBScreen. Строение и чистота используемых в работе соединений была определена современными методами исследования органических соединений. Эксперименты по оценке противоопухолевой активности *in vivo* проведены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

При непосредственном участии автора выполнены эксперименты, по анализу данных которых возможно предположить механизмы действия соединений-лидеров, включая анализ клеточного цикла и клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии, анализ индукции стресса ЭПР через оценку изменения уровня фосфорилированной формы eIF2 α , соотношения сплайс-изоформ XBP1s и экспрессии ATF4, являющихся маркерами данного процесса. Также автором с помощью флуоресцентной микроскопии были исследованы изменения мембранного потенциала митохондрий и новосинтезированной ДНК *in vitro*. Автором подобраны экспериментальные условия

фотообработки клеточных линий и проведены эксперименты по анализу цитотоксичности новых фотоактивируемых соединений (работы [4-5]).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Список литературы» и «Приложение». Работа содержит 15 таблиц и 30 рисунков. Библиография включает 189 источников литературы.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Поиск новых малых молекул как противоопухолевых агентов

Онкологические заболевания остаются одним из самых серьезных вызовов для здравоохранения. В 2022 году было зарегистрировано 20 миллионов новых случаев заболевания и 10 миллионов летальных исходов, связанных со злокачественными новообразованиями [1]. Химиотерапия играет ключевую роль при лечении злокачественных опухолей, и, несмотря на наличие множества клинически одобренных противоопухолевых препаратов, поиск новых средств остается критически важной задачей [2]. Высокая изменчивость и способность раковых клеток адаптироваться к внешним воздействиям приводят к развитию резистентности и снижению эффективности терапии. Более того, клетки злокачественной опухоли могут проявлять различную чувствительность к химиотерапии. Из-за этого поиск и разработка новых противоопухолевых соединений являются актуальной задачей [3,4]. В 2021–2023 годах FDA одобрило 42 новых противоопухолевых терапевтических средства [12]. Согласно отчету CDER "*Advancing Health Through Innovation*" за 2025 год около половины одобренных FDA противоопухолевых препаратов являются малыми органическими молекулами [13].

1.1.1 Использование известных фармакофоров: репозиционирование и модификации уже существующих лекарственных средств

Одной из стратегий развития современной онкотерапии является не только поиск принципиально новых молекул, но и оптимизация уже известных фармацевтических субстанций. Данный подход подразумевает репозиционирование или химическую модификацию существующих соединений и позволяет значительно ускорить процесс разработки противоопухолевых препаратов.

1.1.1.1 Репозиционирование лекарственных средств

Перепрофилирование (или репозиционирование) лекарственных препаратов – это стратегия использования лекарственных средств для терапии изначально не предусмотренных заболеваний. Этот метод позволяет существенно ускорить разработку новых схем терапии и сократить сопутствующие затраты, поскольку профиль безопасности большинства репозиционируемых веществ уже хорошо изучен [14]. В сфере онкологических заболеваний возможность перепрофилирования препаратов активно исследуется: к настоящему времени более чем для 200

лекарственных препаратов, не относящихся напрямую к противоопухолевым средствам, была выявлена потенциальная противоопухолевая активность [14-16]. Вместе с этим, лишь небольшое число репрофилированных препаратов официально включено в клинические рекомендации по лечению рака из-за недостаточной эффективности, проявляющейся на более поздних стадиях клинических испытаний [17,18]. Кроме того, продвижение репозиционированных препаратов может быть осложнено патентными ограничениями [19].

В качестве альтернативы репозиционированию непрофильных средств может быть рассмотрена оптимизация уже валидированных противоопухолевых агентов. Данный подход, как и перепрофилирование препаратов, не требует поиска принципиально новых молекул, что позволяет ускорить процесс разработки [20].

1.1.1.2 Структурная оптимизация противоопухолевых лекарственных средств

Рациональная модификация химической структуры уже известных противоопухолевых препаратов позволяет сохранить базовый механизм их действия, при этом значительно улучшив фармакокинетические, фармакодинамические и токсикологические характеристики. При этом возможны модификации как фармакофорного фрагмента, так и не затрагивающие действующее структурное “ядро” молекулы.

В современной онкологии продолжают широко использоваться противоопухолевые препараты, которые, несмотря на высокую эффективность, обладают рядом критических недостатков – от выраженной системной токсичности до быстрого развития лекарственной устойчивости. Работы по рациональной модификации структуры таких терапевтических агентов широко представлены в литературе. Далее будут рассмотрены несколько примеров структурной модификации известных фармакофоров.

Таксаны – структурно сложные соединения природного происхождения, модификация которых дала клинически значимые полусинтетические производные. Механизм действия соединений этого класса заключается в стабилизации микротрубочек и нарушении динамики полимеризации тубулина. Из их существенных недостатков можно отдельно выделить сложную для синтеза структуру, низкую растворимость в воде, высокую неспецифическую токсичность и возможное развитие устойчивости. Существуют работы, описывающие попытки преодолеть все описанные ограничения [21,22]. За последние 5 лет в литературе представлены исследования по упрощению структуры и синтеза [23],

улучшению фармакокинетических свойств [24-28], и преодолению лекарственной устойчивости (в том числе *in vivo*) [29].

Препараты платины (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин) – основа многих схем химиотерапии, но их применение ограничено нефро- и нейротоксичностью, а также развитием резистентности. В настоящее время можно выделить три направления структурной модификации этого класса соединений: изменение природы лигандов, переход к Pt(IV)-пролекарствам и органелло-таргетный дизайн [30,31].

Антрациклины (доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин и др.) сохраняют ключевую роль в лечении широкого спектра опухолей, но их применение ограничено кумулятивной кардиотоксичностью [32,33]. Модификации их структуры позволяют сохранить противоопухолевую активность данных соединений, но при этом снизить нежелательную системную токсичность [34].

Также есть примеры модификаций структуры малых молекул, селективно ингибирующих специфическую для злокачественной опухоли молекулярную мишень и разработанных структурно-ориентированным способом. Так, например, была модифицирована структура ингибитора BCR-ABL иматиниба. При клиническом применении данного препарата был выявлен широкий спектр BCR-ABL-зависимых и независимых механизмов резистентности, включая мутации в зоне связывания АТФ. На основе подробного анализа структуры комплекса препарата с молекулярной мишенью были спроектированы структурные аналоги – нилотиниб и дазатиниб. Для новых препаратов была сохранена архитектура фармакофора и фрагменты, комплементарные гидрофобному карману киназы. Это позволило повысить аффинность и активность против большинства мутантных форм фермента [35-37].

Другой пример обеспечения высокого уровня селективности препарата с использованием конъюгированных соединений – конъюгаты моноклональных антител с лекарственными средствами (Antibody-Drug Conjugates, ADC) [38]. Механизм действия ADC-препаратов базируется на синергии двух компонентов: высокой специфичности моноклональных антител к опухоли и цитотоксичности противоопухолевого препарата. Такая архитектура позволяет осуществлять селективную доставку токсического агента непосредственно в опухолевые ткани. Это существенно снижает системную токсичность и минимизирует воздействие на здоровые клетки организма, что выгодно отличает ADC от классической химиотерапии [39]. Препараты первого поколения ADC начали применяться еще в 2000 году, первым одобренным FDA препаратом стал милотарг (mylotarg) – препарат для лечения острого миелоидного лейкоза, таргетирующий CD33 [40]. В настоящее время применяются

препараты уже третьего поколения, из которых примерами одобренных средств являются трастузумаб дерукстекан (enhertu [41]), сацитузумаб говитекан (trodelvy [42]), энфортамаб ведотин (padcev [43]), тисотумаб ведотин (tivdak [44]) и другие.

Кроме прямой модификации фармакофора, существуют стратегии молекулярного дизайна, основанные на введении дополнительных структурных фрагментов.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой метод таргетного лечения, обеспечивающий высокую селективность действия химиотерапевтических агентов. Ключевой принцип ФДТ заключается в использовании светочувствительных соединений, переходящих в возбужденное состояние только под влиянием света определенной длины волны. Такой подход позволяет локализовать цитотоксический эффект непосредственно в зоне патологии, минимизируя системное воздействие. На сегодняшний день FDA одобрило несколько фотосенсибилизаторов для клинического применения (Photofrin, Visudyne, Levulan, Ameluz) [45,46].

Объединение нескольких активных фармакофоров в одной молекуле также является одной из стратегий рациональной модификации лекарственных средств. Такие соединения становятся способны одновременно воздействовать на несколько молекулярных мишеней, но при этом могут обладать более простым фармакокинетическим профилем, чем комбинации нескольких отдельных лекарственных средств [47]. Поскольку онкологические заболевания имеют многофакторную природу, мультитаргетные соединения демонстрируют высокую терапевтическую эффективность. В настоящее время FDA одобрено более 10 мультитаргетных противоопухолевых соединений [48].

1.1.2 Поиск новых молекул как потенциальных противоопухолевых агентов

Комитет журнала “The Lancet Oncology” выделяет в качестве одной из приоритетных задач изучение противоопухолевой активности малых молекул, не применявшихся в терапии ранее [49]. Существует два основных подхода для поиска потенциальных противоопухолевых соединений: рациональный дизайн и фенотипический поиск. Первый подход применим, когда известен метаболический путь, лежащий в основе патогенеза, или ключевая для его развития молекулярная мишень. Второй подход направлен на отбор веществ, которые изменяют фенотип клетки или организма желаемым образом. При этом предварительное знание молекулярного механизма развития патологии не требуется, а поиск активных соединений не ограничивается известными мишенями [50].

1.1.2.1 Рациональный дизайн противоопухолевых средств

Согласно данным Американской ассоциации исследования рака, за 2019-2023 годы в качестве противоопухолевых препаратов одобрили 30 высокоспецифичных к определенным мишеням молекул [38, 51].

Рациональный дизайн лекарственных средств включает в себя систематический подход к выявлению и оптимизации химических соединений, взаимодействующих с конкретными биологическими мишенями [52]. Благодаря современным достижениям в развитии молекулярного моделирования и хемоинформатики, а также накопленным данным в области структурной биологии, стала возможна эффективная и детальная характеристика фармакофорного пространства мишени. На этапе фармакофорного моделирования выявляются водородные связи, гидрофобные контакты, электростатические взаимодействия и стерические ограничения, которые задают структурные особенности и определяют аффинность и селективность будущего препарата [53].

Одним из “поворотных моментов” к широкому распространению и активнейшему использованию рационального дизайна лекарственных средств стало открытие ингибиторов киназ. Это класс низкомолекулярных соединений, нацеленных на ингибирование активности сигнальных белков, контролирующих жизненный цикл раковых клеток [54, 55]. На сегодняшний день FDA одобрило свыше семидесяти низкомолекулярных ингибиторов киназ для клинического применения [55, 56]. В качестве примеров нозологий, для лечения которых применяются ингибиторы киназ, можно привести немелкоклеточный рак легкого (с активирующими мутациями в EGFR, KRAS, ALK и ROS1) [57, 58], хронический миелолейкоз (вызванный образованием химерного белка BCR-ABL, являющегося конститутивно активной тирозинкиназой) [59] и гепатоцеллюлярную карциному (с активирующими мутациями в VEGFR, PDGFR, FGFR) [60].

Помимо широко известных ингибиторов протеинкиназ, существуют и другие молекулярные мишени для направленного дизайна противоопухолевых средств. Эпигенетические нарушения, включая метилирование и деметилирование ДНК, а также модификации гистонов, признаны важным драйвером в опухолевой трансформации клеток. Воздействие на эпигенетические aberrации открывает широкие перспективы в качестве потенциальной противораковой терапии, учитывая обратимый характер эпигенетических изменений [61]. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз [62, 63], ингибиторы поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP)[64] и ингибиторы деацетилаз гистонов [62, 65-

67] в настоящее время применяются для лечения онкологических заболеваний, как в монотерапии, так и комбинированных схемах. Ингибиторы ВЕТ-белков (распознающих ацетилирование хроматина) находятся на I/II стадиях клинических испытаний. Основными ограничениями внедрения ВЕТ-ингибиторов в клиническую практику являются большое количество нежелательных реакций (желудочно-кишечные расстройства, тромбоцитопения, анемия, повышение билирубина), а также ограниченная эффективность в монотерапии [68-70].

Таргетная высокоспецифичная деградация определенных, в том числе неподдающихся лекарственному воздействию (undruggable) белков может быть осуществлена с помощью технологии PROTAC (Proteolysis targeting chimera) [71]. В отличие от традиционных препаратов, бифункциональные молекулы PROTAC выступают в роли «молекулярного мостика»: они одновременно связывают белок-мишень и убиквитинлигазу. Это активирует убиквитин-протеасомную систему клетки, которая маркирует мишень и направляет её на деградацию [71, 72]. В настоящее время ряд соединений на основе этой технологии уже проходит клинические испытания [73-75].

Таким образом, развитие рационального дизайна лекарственных средств привело к высокоточному проектированию молекул, что может значительно повысить шансы на успешный исход терапии.

1.1.2.2 Фенотипический скрининг для поиска новых противоопухолевых препаратов

Несмотря на успехи в поиске новых терапевтически активных молекул с помощью таргетных технологий, значительную долю в перечне недавно одобренных препаратов составляют молекулы, выявленные в ходе фенотипических тестов [9]. Фенотипический скрининг представляет собой подход к поиску новых лекарственных средств, при котором соединения оцениваются по их способности изменять наблюдаемый фенотип клетки или организма желаемым образом без априорного знания молекулярной мишени (желаемый фенотипический отклик) [76].

Такой подход позволяет избежать ловушек чрезмерно узкого поиска, когда определённая молекулярная мишень может оказаться неэффективной или недостаточной для достижения терапевтического эффекта. Кроме того, такая стратегия особенно ценна для открытия первых в классе лекарственных средств и выявления новых биологических мишеней, ранее не известных исследователям [10]. Существует представление о том, что фенотипический анализ может с большей вероятностью коррелировать с клинической эффективностью, так как избегается чрезмерное

упрощение предполагаемых молекулярных мишеней и вместо этого внимание сосредотачивается на функциональных эффектах исследуемого соединения [11].

Фенотипический скрининг применяется для поиска противоопухолевых препаратов уже несколько десятилетий. Поскольку основной целью химиотерапии является элиминация опухоли, наиболее очевидным желаемым фенотипом при отборе противоопухолевых соединений служит гибель опухолевых клеток [77]. Кроме того, целесообразно выявлять специфичность действия химических соединений на опухолевые клетки на самых ранних этапах разработки лекарственных препаратов.

1.1.2.3 Модели, которые используются для проведения фенотипических скринингов

В отличие от методов направленного поиска, модели для проведения фенотипических тестов часто оказываются более сопоставимыми с физиологическими условиями, что повышает предсказательную ценность результатов для клинической эффективности [10]. Для проведения фенотипических тестов используются различные модели, включая клеточные линии, трёхмерные культуры клеток, органоиды и модели с участием опухолевого микроокружения.

Одной из самых распространенных модельных систем являются культуры клеточных линий различной этиологии.

Монослойное (2D) культивирование клеточных линий широко распространено в настоящее время. Этот метод подходит для первичного скрининга благодаря относительно низкой стоимости, простоте выполнения и условий культивирования, а также хорошей масштабируемости [78]. Наиболее ярким примером широкого использования 2D культивирования является программа NCI Developmental Therapeutics Program, в рамках которой малые молекулы тестируются на 60 клеточных линиях человека (NCI-60). Раковые клеточные линии, включенные в NCI-60, представляют 9 основных типов опухолей (рак лёгкого, толстой кишки, ЦНС, кожи, рак яичников, почек, предстательной железы и молочной железы). С момента внедрения в 1988 году NCI-60 функционирует как уникальная платформа для системной оценки цитотоксичности и механизмов действия кандидатных соединений через измерение трех параметров роста в одном эксперименте: GI₅₀ (концентрация, ингибирующая рост клеток на 50%), TGI (полное ингибирование роста) и LC₅₀ (концентрация, вызывающая гибель 50% клеток) [79]. На сегодняшний день NCI-60 превратился в комплексный открытый ресурс, включающий данные по скринингу более 170 одобренных FDA

противоопухолевых препаратов и свыше 800 исследуемых против разнообразного набора целевых белков и механизмов соединений [80, 81].

Несмотря на очевидные преимущества, культивируемый в лабораторных условиях монослой клеток значительно отличается от трёхмерной архитектуры опухолей *in vivo*, а также не позволяет учитывать гипоксические градиенты и распределение химических веществ в объеме. Более того, культивирование в условиях монослоя может индуцировать нежелательные молекулярные и фенотипические изменения в клетках, включая изменение профиля экспрессии генов и потерю гетерогенности, характерной для первичных опухолей [78, 79]. Эти ограничения можно в какой-то мере обойти при использовании более сложных схем культивирования клеток: использование 3D моделей или сочетанного культивирования клеток опухолевой и неопухолевой этиологии. В таких случаях, по сравнению с 2D-культивированием монокультур, условия опухолевого микроокружения воспроизводятся с большей точностью.

Системы сочетанного 3D культивирования позволяют приблизить условия *in vitro* к воспроизведению сложной архитектуры реальной злокачественной опухоли. Такой подход позволяет отчасти воспроизвести опухолевые межклеточные взаимодействия [50]. В литературе описаны примеры, в которых сочетанное культивирование клеток приводило к лучшим результатам, чем использование клеточных монокультур. Так, например, 17 β -эстрадиол ингибирует пролиферацию опухолевой клеточной линии MCF-7 при совместном культивировании с неопухолевыми клетками MCF10A, тогда как в монокультуре клеток MCF-7 данный эффект не наблюдался [82]. Совместное культивирование клеток аденокарциномы легкого линии A549 с фибробластами SV-80 способствует повышению жизнеспособности опухолевых клеток по сравнению с монокультурой. Это сопровождается увеличением экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в клетках A549 и изменением уровня экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода [83]. Совместное культивирование макрофагов с клетками A549 приводит к усилению продукции цитокинов макрофагами, что способствует прогрессированию опухолевого роста [84].

Технологии систем сочетанного культивирования, подходящие для реализации высокопроизводительных скрининговых исследований, продолжают активно разрабатываться. Selvin et al. предложили платформу для высокопроизводительного скрининга малых молекул на противораковую активность по отношению к колоректальному раку. В их исследовании монокультуры клеток колоректального рака HCT116-GFP сравнивались с со-культурами HCT116 и активированных периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC). В результате скрининга

исследуемые Selvin et al. липофильные статины (мевастатин, симвастатин, питавастатин, ловастатин и флувастатин) продемонстрировали способность потенцировать действие активированных РВМС, что приводило к активации противоопухолевого иммунитета и вызывало гибель раковых клеток. В монокультурах опухолевых клеток статины демонстрировали лишь умеренное прямое цитотоксическое действие [85].

Ранее в нашей лаборатории были разработаны системы сочетанного культивирования клеточных линий (FCCT); к настоящему времени были разработаны две модели: рака молочной железы и рака легкого. В этих моделях используется совместное 2D культивирование клеток опухолевой и неопухолевой этиологии, что частично воспроизводит опухолевое микроокружение и процесс вытеснения нормальных клеток быстрорастущими опухолевыми линиями. Проведение эксперимента в одной лунке в идентичных условиях обеспечивает корректное сравнение жизнеспособности клеточных линий. Также FCCT позволяет выполнять высокопроизводительные скрининговые исследования [50, 86].

Сокультивирование может успешно применяться не только с иммортализованными клеточными линиями, но с более сложными моделями. В своем исследовании авторы [87] разработали модель тройной культуры, включающую культуру органоидов колоректального рака, полученную от пациентов (patient-derived colorectal cancer organoids), соответствующие им ассоциированные с раком фибробласты (cancer-associated fibroblasts, CAF) и моноциты, выделенные из крови. Согласно данной работе, используемые обычно среды для культивирования органоидов могут оказывать влияние на экспериментальные данные при работе с моноцитарными миелоидными клетками. Включение CAF позволяет использовать более простые культуральные среды, а также способствует формированию фенотипов, сходных с теми, которые наблюдаются в опухолевой ткани. Таким образом создается более физиологически релевантная система культивирования [87].

Трехмерные модели культивирования клеток позволяют более релевантно воссоздать архитектурную и физиологическую сложность раковых опухолей. Их использование позволяет учитывать градиент концентрации вещества в солидной опухоли и особенности микроокружения, включая взаимодействие с иммунными или стромальными клетками [88, 89]. В настоящее время трехмерные модели культивирования могут быть использованы и успешно применяются и в высокопроизводительном скрининговом формате. В литературе представлены методики, адаптированные к использованию 96 и 384-луночных планшетов, в которых производится скрининг библиотек из сотен соединений [90-93]. Теперь трехмерное культивирование клеточных линий

используется скорее как “второй барьер” отсева потенциальных противоопухолевых препаратов и следует за высокопроизводительным 2D-скринингом, в котором исследуют тысячи соединений. К ограничениям 3D-культур можно отнести высокую стоимость и сложность этих систем (требуются специализированные материалы (ULA-планшеты, матриксы/гидрогели), более длительное время культивирования, сложная оптика и трудоемкая аналитика получаемых изображений. Также остаётся проблема стандартизации (не все линии формируют стабильные компактные сфероиды, условия формирования сильно влияют на ответ) и неполной репрезентации опухолевого микроокружения; поэтому 3D-модели рациональнее рассматривать как критический «физиологический фильтр» после 2D-первичного высокопроизводительного скрининга, а не как его замену [94].

1.1.2.4 Формирование библиотек химических соединений

Высокопроизводительный скрининг малых молекул остаётся одним из ключевых этапов в самом начале разработки противоопухолевых препаратов как в таргетной, так и в фенотипической парадигме поиска лекарств. При этом именно качество и структура библиотеки в значительной степени определяют вероятность нахождения химически оптимизируемых и клинически перспективных хитов [79].

Среди подходов к формированию библиотек соединений можно выделить: масштабные drug-like/lead-like коллекции для первичных скринингов (для как можно более широкого охвата химического пространства); более узкоспециализированные библиотеки по классам мишеней (киназы, эпигенетические регуляторы, белок-белковые взаимодействия и пр.), соединения в которых подбираются исходя из знаний о том, какие структурные фрагменты молекул лучше всего ложатся в необходимые активные сайты предполагаемых молекулярных мишеней; фрагментный подход к поиску лекарственных средств (fragment-based drug design) – такой подход получил особое распространение при работе с фармакологически недоступными (undruggable) мишенями [51, 95, 96].

За последние годы большинство новых малых молекул в онкологии относятся к таргетным ингибиторам тирозинкиназ, серин/треонин-киназ, эпигенетических ферментов и медиаторов ангиогенеза; при этом сохраняется интерес к ДНК-связывающим и тубулин-направленным агентам, но акцент смещён на селективность и персонализацию терапии. Обзор FDA-одобренных препаратов 2016–2024 гг. показывает устойчивый рост доли гетероциклических структур с высокой плотностью функциональных групп, обеспечивающих сложные сети водородных связей и π -взаимодействий с

мишенями [5-7, 97]. Также особое внимание в биоорганической и медицинской химии при поиске новых терапевтически активных малых органических молекул уделяется так называемым привилегированным структурным фрагментам. Привилегированные структурные фрагменты легко поддаются химическим модификациям и входят в структуру многих соединений с уже известной биологической активностью [8].

Далее будут рассмотрены несколько структурных классов соединений, относящихся к привилегированным. Структурно родственные соединения данных классов далее исследовались в работе.

1.2 Противоопухолевая активность производных пиразолкарбоксамидов

Пиразол представляет собой пятичленный азотсодержащий ароматический гетероцикл, отличающийся выраженной полярностью и конформационной жесткостью. Также он относится к привилегированным структурным фрагментам в медицинской химии. Пиразол легко вступает в различные реакции замещения, что предоставляет широкие возможности синтеза структурных производных для поиска новых терапевтических агентов [98-101].

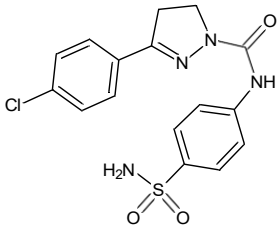
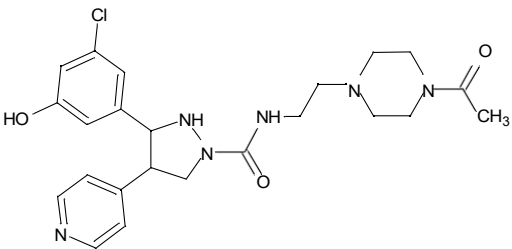
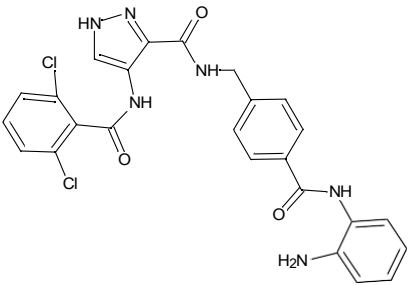
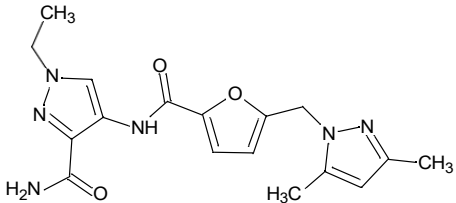
Производные пиразола демонстрируют широкий спектр биологической активности, проявляя противовоспалительные, антимикробные, анксиолитические, противоопухолевые, анальгетические и жаропонижающие свойства. В этом обзоре будет рассмотрена только противоопухолевая активность соединений данного класса.

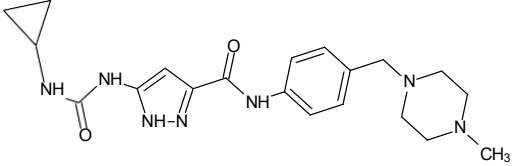
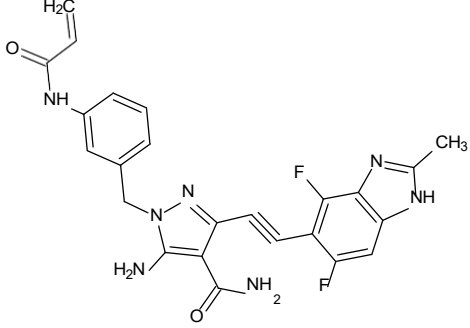
В контексте разработки противоопухолевых средств пиразол является базовым структурным фрагментом для ингибиторов протеинкиназ (PKI). Из 74 низкомолекулярных PKI, одобренных FDA, 8 препаратов содержат пиразольное кольцо (кризотиниб, авапритиниб, асциминиб, энкорафениб, эрдафитиниб, пралсетиниб, пиртобрутиниб, руксолитиниб) [98, 99, 101]. Киназные сигнальные каскады часто являются “узкими местами” опухолевой пролиферации, вследствие чего киназы становятся привлекательными молекулярными мишенями в таргетной противоопухолевой терапии. Отдельно как мишени пиразол-содержащих PKI можно выделить киназы CDK2 и Aurora (контролируют прохождения клеточного цикла), а также EGFR, VEGFR2 и BRAF (участвуют в передаче митогенных сигналов и ангиогенезе) [98, 99, 101].

Поскольку пиразольное ядро позволяет проводить множество модификаций, структурное разнообразие его производных чрезвычайно велико. В данном обзоре мы сфокусируемся исключительно на одной из групп соединений – пиразолкарбоксамидов. Помимо широко известного

и описанного потенциала этих соединений как ингибиторов протеинкиназ (что характерно для значительной части производных пиразола) можно выделить другие молекулярные мишени (Таблица 1).

Таблица 1: Молекулярные механизмы действия производных пиразолкарбоксамидов

ID	Структурная формула	Механизм действия/молекулярная мишень	Источник
Л1		Соединение Л1 обладало выраженным ингибирующим эффектом по отношению к ферментам карбоангидраза IX и XII. $K_i = 1,4$ нМ для карбоангидразы IX и 1,2 нМ для карбоангидразы XII	102
Л2		Соединение Л2 ингибировало циклооксигеназу 2 ($IC_{50} \sim 0,3$ мкМ), что сопоставимо с контрольным соединением целекоксибом. Также для соединения было отмечено дозозависимое ингибирование киназ ERK и MEK	103
Л3		Соединение Л3 является ингибитором гистондеацетилазы с $IC_{50} = 0.25$ мкМ. Также оно показало противоопухолевую активность в мышинной модели ксенографтов с привитой опухолью НСТ116	104
Л4		Соединение Л4 ингибировало белковый комплекс HIF-1 ($IC_{50} = 19.1$ мкМ)	105

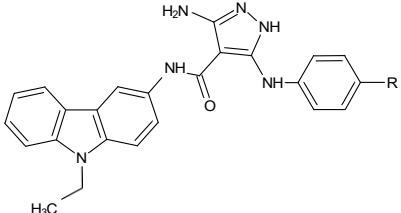
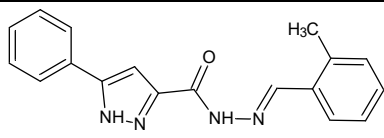
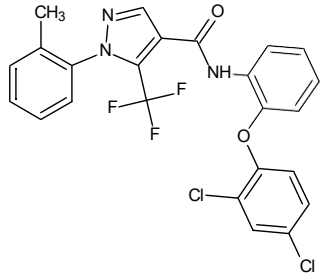
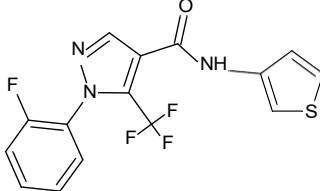
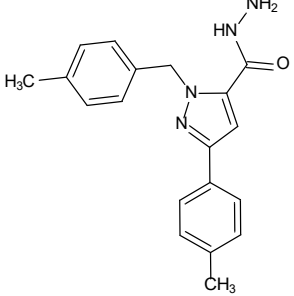
Л5		<p>Соединение Л5 демонстрировало способность с высокой аффинностью связываться с малой бороздкой ДНК ($K=1.06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)</p>	106
Л6		<p>Соединение Л6 ингибировало рецепторы фактора роста фибробластов FGFR1, FGFR2, FGFR3 с $IC_{50} = 46, 41$ и 99 нМ соответственно. Также 10h демонстрировало цитотоксический эффект на клеточные линии NCI-H520, SNU-16 и КАТО III в наномолярном диапазоне (значения $IC_{50} = 19, 59,$ и 73 нМ, соответственно)</p>	107

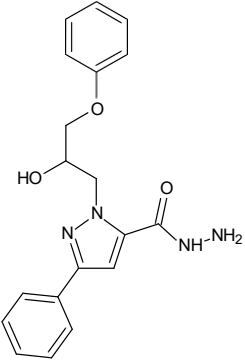
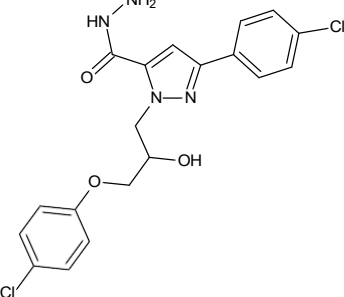
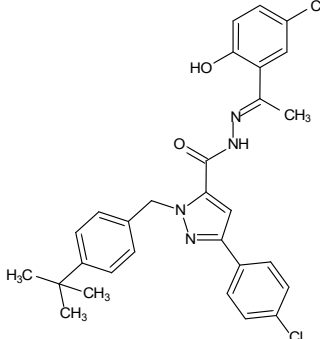
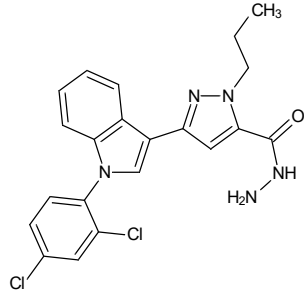
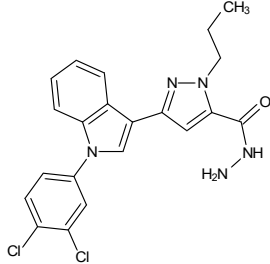
Рассмотренные производные пиразолкарбоксамиды проявляют цитотоксичность в низком микромолярном или наномолярном диапазоне концентраций. Их биологическая активность направлена на ключевые механизмы выживания, пролиферации и адаптации опухолевых клеток, пересечений среди рассмотренных мишеней нет.

Стоит отметить, что в литературе описан ряд производных, показавших цитотоксический эффект на различные опухолевые клеточные линии, но для которых мишень не была определена (Таблица 2).

Таблица 2: Цитотоксические эффекты производных пиразолкарбоксамиды в отношении опухолевых клеточных линий различной этиологии

ID	Формула соединения	Цитотоксический эффект		Источник
		Клеточная линия	Значение цитотоксического эффекта	

Л7-1 (R – H) Л7-2 (R-Cl)		HCT116	$IC_{50} = 3,36 \text{ мкМ}$ и $2,97 \text{ мкМ}$ для соединений Л7-1, Л7-2 соответственно	98
	R^1 H R^2 Cl	HepG2	$IC_{50} = 3,90 \text{ мкМ}$ и $3,37 \text{ мкМ}$ для соединений Л7-1, Л7-2 соответственно	
		MCF7	$IC_{50} = 8,53 \text{ мкМ}$ и $8,77 \text{ мкМ}$ для соединений Л7-1, Л7-2 соответственно	
Л8		NCIH460	$IC_{50} = 0,15 \text{ мкМ}$	98
Л9		A549	$IC_{50} = 10,2 \text{ мкМ}$	98
Л10		PC3	$IC_{50} = 12,4 \text{ мкМ}$	98
Л11		A549	$IC_{50} = 49,85 \text{ мкМ}$	99

Л12		NCIH460	$IC_{50} = 48 \text{ мкМ}$	99
Л13		NCIH460	$IC_{50} = 32 \text{ мкМ}$	99
Л14		A549	$IC_{50} = 0.28 \text{ мкМ}$	99
Л15		HepG2	$IC_{50} = 0.71 \text{ мкМ}$	99
		BT474	$IC_{50} = 1.39 \text{ мкМ}$	
		BGC823	$IC_{50} = 0.71 \text{ мкМ}$	
Л16		HepG2	$IC_{50} = 0.71 \text{ мкМ}$	99
		BT474	$IC_{50} = 1.39 \text{ мкМ}$	
		BGC823	$IC_{50} = 0.71 \text{ мкМ}$	

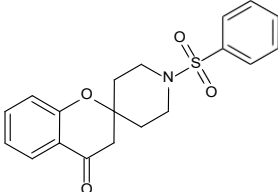
Ряд проанализированных производных пиразолкарбоксамидов действует в низком микромолярном диапазоне, при этом наибольшая цитотоксичность проявляется для линии рака легкого A549 ($IC_{50} = 0,28$ мкМ, Л14).

Таким образом, производные пиразолкарбоксамидов представляют собой перспективный класс соединений для разработки противоопухолевых агентов. Их структурное разнообразие за счет наличия различных функциональных групп обеспечивает широкий профиль действия: помимо ингибирования протеинкиназ (EGFR, BRAF, VEGFR2), они способны подавлять альтернативные пути выживания опухолевых клеток, включая ингибирование карбоангидраз, гистондеацетилаз и фактора транскрипции HIF-1. Наличие соединений с выраженной цитотоксичностью в наномолярном и микромолярном диапазонах, но с пока не установленными молекулярными мишенями, открывает перспективы для дальнейших фундаментальных исследований противоопухолевой активности производных данного класса.

1.3 Противоопухолевая активность производных хроман-4-она

Структурное ядро хроман-4-она признано привилегированным молекулярным фрагментом [108-111]. Производные хроман-4-она описаны в литературе как потенциальные противоопухолевые агенты, проявляющие цитотоксическую активность в отношении различных линий опухолевых клеток [112-117]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе цитотоксического потенциала производных хроман-4-она, на сегодняшний день окончательно не установлены [108]. Ключевые описанные механизмы противоопухолевого действия систематизированы в Таблице 3. Производные хроман-4-она, проявляющие цитотоксичность к опухолевым клеточным линиям различной этиологии, для которых не определена молекулярная мишень, представлены в Таблице 4.

Таблица 3: Механизмы действия производных хроман-4-она

ID	Структурная формула	Механизм действия	Источник
Л17		Соединение индуцировало ранний апоптоз в клеточной линии MCF7 в концентрации 5 мкМ и 10 мкМ. Также была зарегистрирована остановка клеточного цикла в G1-фазе	117

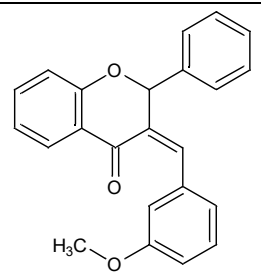
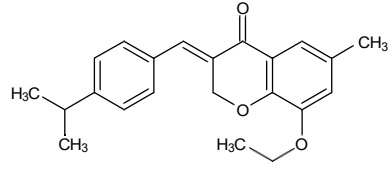
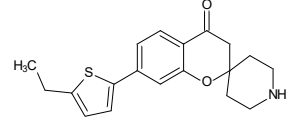
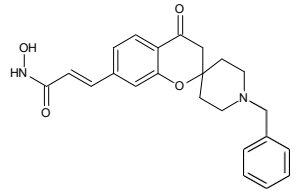
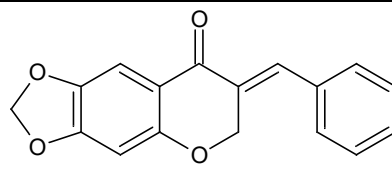
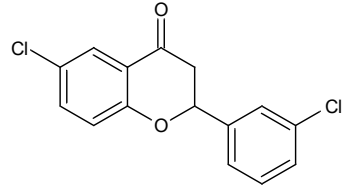
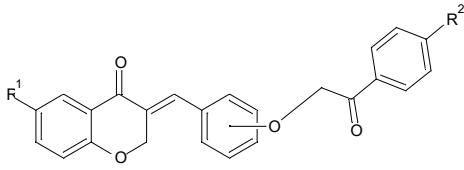
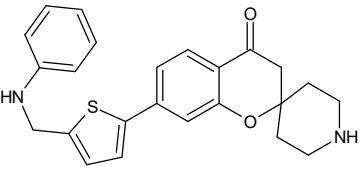
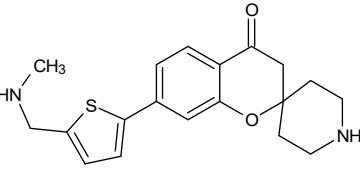
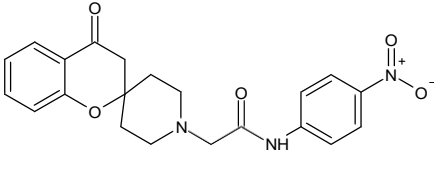
Л18		Соединение вызывало деполаризацию мембраны митохондрий и проявляло цитотоксический эффект на клеточных линиях НСТ116 (18.6 ± 1.4 мкМ) и SW620 (12.4 ± 2.1 мкМ)	116
Л19		Соединение ингибировало ER α и киназу Akt и вызывало индукцию апоптоза	113
Л20		Соединение вызывало ингибирование полимеризации тубулина, связываясь с колхициновым сайтом ($K_d = 10.98 \pm 1.32$ мкМ)	118
Л21		Соединение ингибировало HDAC2, HDAC3, HDAC6 в концентрациях 0,082 мкМ, 0,028 мкМ и 0,123 мкМ соответственно	119

Таблица 4: Цитотоксические эффекты производных хроман-4-она в отношении опухолевых клеточных линий различной этиологии

ID	Формула соединения	Цитотоксический эффект		Источник
		Клеточная линий	Значение цитотоксического эффекта	
Л22		MCF7	IC ₅₀ = 6.2±0.1 мкМ	120
		T74D	IC ₅₀ = 4.6±0.1 мкМ	
		MDAMB231	IC ₅₀ = 9.3±2.1 мкМ	
Л23		MCF7	IC ₅₀ = 11.3±0.4 мкМ	121
		MDAMB231	IC ₅₀ = 10.9±2.5 мкМ	
		LNCaP	IC ₅₀ = 35.9±6.6 мкМ	

		PC3	IC ₅₀ = 11.6±4.1 мкМ	
		Hep-G2	IC ₅₀ = 5.7±0.3 мкМ	
		KB	IC ₅₀ = 14.7±0.2 мкМ	
		SK-N-MC	IC ₅₀ = 12.8±2.1 мкМ	
		K562	IC ₅₀ = 78.8±9.5 мкМ	
Л24		Ряд производных с приведенной общей структурной формулой был протестирован на 60 клеточных линиях (NCI-60)	Все значения GI ₅₀ находятся в микромолярном диапазоне	122
Л25		MCF7	IC ₅₀ = 7.59 ± 0.84 мкМ	123
Л26		MCF7	IC ₅₀ = 5.64 ± 0.37 мкМ	
Л27		MCF7	IC ₅₀ = 8,24 мкМ	124

1.4 Противоопухолевая активность производных 1,4-нафтохинона

1,4-Нафтохиноны представляют собой органические соединения с жесткой бициклической структурой, содержащей два сопряженных карбонильных фрагмента (Рисунок 1А) [125]. Нафтохиноны рассматриваются в медицинской химии как привилегированные структуры [8]. До настоящего времени было проведено множество исследований, направленных на изучение широкого фармакологического профиля как природных, так и синтетических производных нафтохинонов. Для

них выделяют кардиопротекторную, противомикробную, противоопухолевую, антиоксидантную, противопаразитарную активность и ряд других эффектов [125-128]. В рамках данной работы внимание будет сосредоточено на противоопухолевом потенциале соединений данного класса.

Благодаря системе сопряженных двойных связей нафтохиноны действуют как эффективные акцепторы электронов. Именно способность принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях обычно считается ключевой для реализации их биологического действия [129-131]. С другой стороны, высокая реакционная способность нафтохинонов может рассматриваться и как существенный недостаток. Хинонные фрагменты признаны мультипотентными интерферирующими структурами (pan-assay interference compounds, PAINS), что может выражаться в проявлении неспецифической активности [132]. Несмотря на это, производные 1,4-нафтохинона (как фрагмент антрахинона) входят в состав ряда известных и широко применяемых противоопухолевых лекарственных препаратов: доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин и митоксантрон [130,133] (Рисунок 1Б). В настоящее время клинические испытания (КИ) по определению противоопухолевой активности новых низкомолекулярных соединений, содержащих 1,4-нафтохиноновый фрагмент, продолжаются. В частности, за последние несколько лет проводились многочисленные исследования напабукасина (nabucasin) – структурно нового ингибитора (first-in-class) сигнального каскада STAT3 [134], и YM-155 (sepantronium bromide), ингибитора биосинтеза сурвивина [128, 135]. Данные соединения успешно прошли I и II фазу КИ, и их исследования продолжаются (Рисунок 1Б) [131].

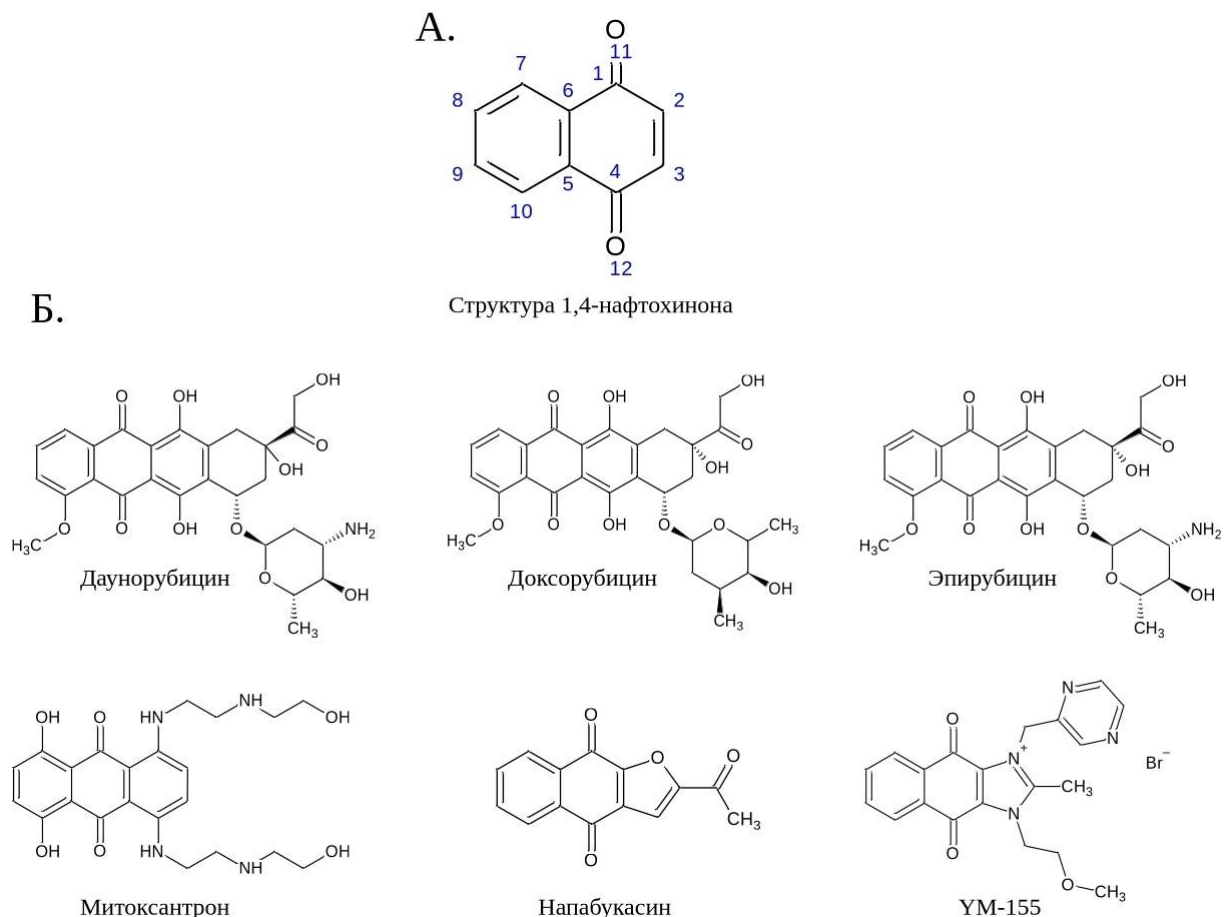


Рисунок 1: А. Общая структура 1,4-нафтохинона Б. Лекарственные препараты, содержащие 1,4-нафтохиноновый фрагмент и применяемые в качестве противоопухолевых средств в клинической практике или КИ

Производные 1,4-нафтохинонов способны реализовывать биологическую активность через множество различных механизмов, затрагивая целый ряд сигнальных путей, влияющих на выживаемость клетки [128]. Важно отметить, что у этих соединений чаще всего отсутствует однозначный специфический механизм действия: их эффекты взаимосвязаны и часто перетекают друг в друга, образуя сложную сеть взаимодействий. Далее будут рассмотрены основные механизмы реализации биологической активности производных 1,4-нафтохинонов в контексте их противоопухолевого действия.

1.4.1 Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами и ферментами, ассоциированными с регуляцией клеточного цикла

Взаимодействие с ДНК является одним из самых известных молекулярных механизмов действия производных нафтохинонов. В качестве примеров можно привести митоксантрон и доксорубин – известные противоопухолевые препараты, способные интеркалировать в ДНК [136]. Митоксантрон также является селективным ингибитором топоизомеразы II (фермента, играющего ключевую роль в организации топологии ДНК) [101]. Синтетические аналоги также показывают высокую ингибирующую активность в отношении топоизомеразы. Производные 1,4-нафтохинонов **Л28** [137], **Л29** [138] и **Л30** [139] (Рисунок 2) подавляют активность топоизомеразы II, что приводит к накоплению клеток в S-фазе клеточного цикла и индукции апоптоза.

Помимо прямого воздействия на ДНК и топоизомеразы, нафтохиноны способны взаимодействовать и с другими молекулярными мишенями, непосредственно связанными с процессом клеточного деления. Природный нафтохинон лавсон (**Л31**, Рисунок 2) подавляет экспрессию циклина В1 и циклин-зависимой киназы 1 (CDK1) в клеточной линии рака толстого кишечника [140].

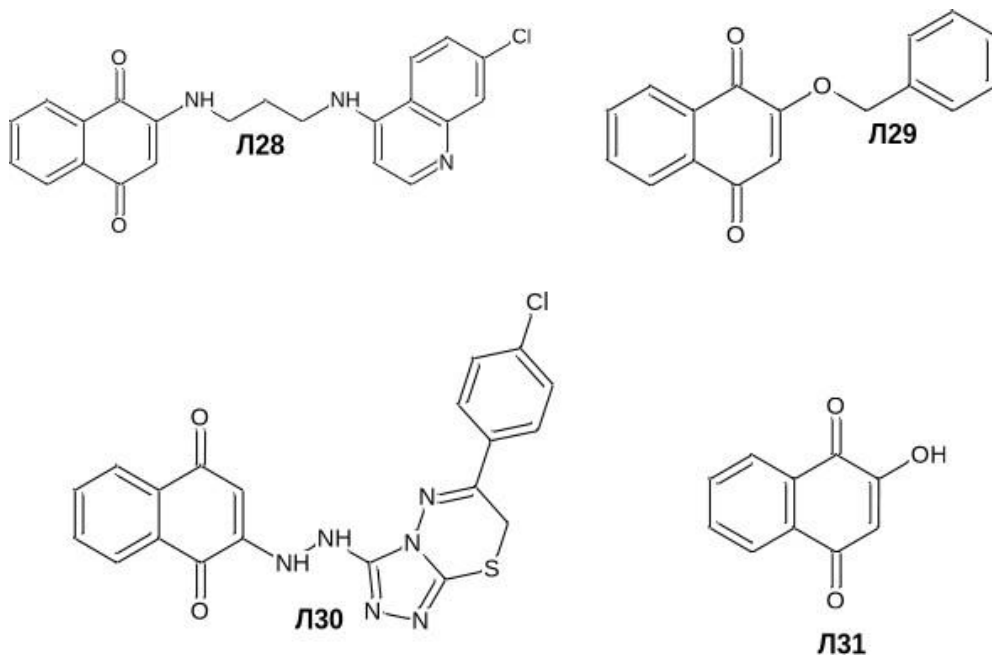


Рисунок 2: Примеры производных нафтохинонов, взаимодействующих с ДНК и ферментами, ассоциированными с прохождением клеточного цикла

1.4.2 Нарушение окислительно-восстановительного баланса в клетке

1,4-Нафтохиноны способны принимать один или два электрона по карбонильным группам с образованием семихинона и гидрохинона – высокореакционноспособных промежуточных форм. Эти превращения в клетке катализируются НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазой 1 (NQO1) (Рисунок 3). Принятие электронов нафтохиноновым ядром приводит к возникновению семихинонного радикала или дианионной формы, которые легко вступают в последующее окисление при контакте с кислородом. В ходе этих окислительно-восстановительных реакций происходит генерация активных форм кислорода. Накопление АФК вызывает окислительный стресс, что приводит к цитотоксичности и индукции апоптоза [125].

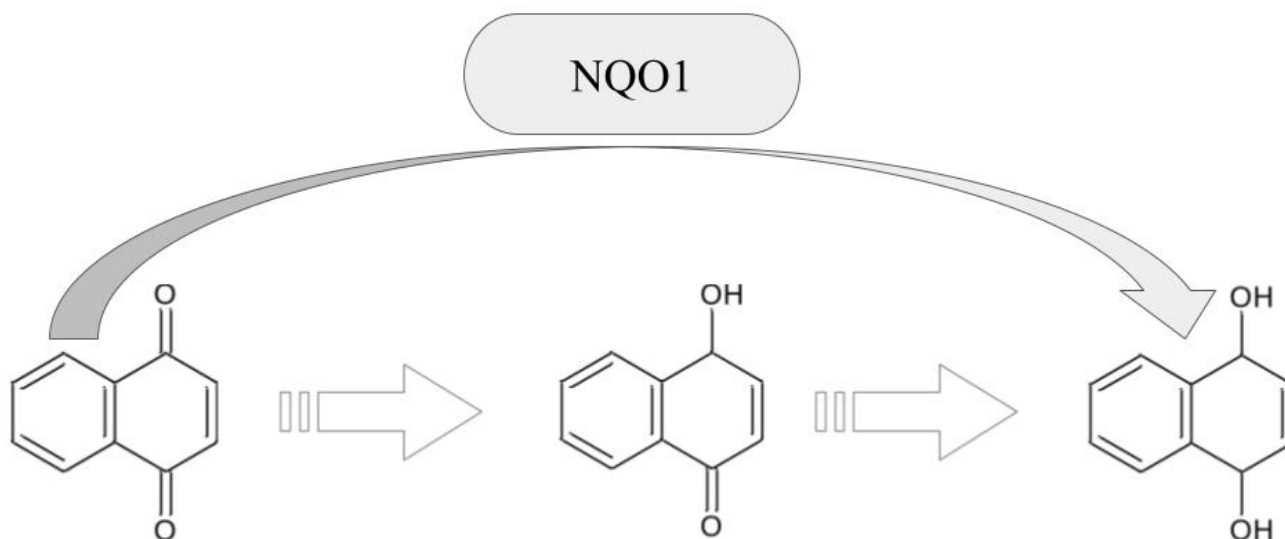


Рисунок 3 Восстановление хинонного фрагмента НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазой 1 (NQO1)

В литературе описаны примеры того, как цитотоксичные производные 1,4-нафтохинонов, выступают в роли субстратов НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы 1. В исследовании [143] продемонстрирована (Рисунок 4) избирательная цитотоксичность соединения **Л34** в отношении клеток плоскоклеточной карциномы полости рта (OC3-IV2), в том числе в экспериментах *in vivo*. После восстановления NQO1 соединение **Л32** (Рисунок 4) ингибировало комплекс IV в дыхательной цепи митохондрий [142]. Соединение **Л33** (Рисунок 4) также действует через нарушение митохондриальной функции. Оно является разобщителем митохондриального окислительного фосфорилирования, вызывая деполяризацию митохондриальной мембраны и индукцию апоптоза [143]. Соединение **Л34** (Рисунок 4) вызывало индукцию апоптоза в клетках аденокарциномы лёгкого A549, опосредованную активацией проапоптотического белка Вах и подавления антиапоптотического BCL-2[141].

Непосредственная генерация активных форм кислорода в качестве основного механизма действия описана как для природных, так и для синтетических производных 1,4-нафтохинонов. Тем не менее, чаще этот процесс рассматривается не изолированно, а в комплексе с другими сопутствующими клеточными эффектами. В качестве примеров АФК-индуцирующих соединений природного происхождения можно выделить плюмбагин (**Л35**, Рисунок 4) и юглон (**Л36**, Рисунок 4).

Юглон вызывает АФК-зависимое повреждение ДНК, а также апоптоз и аутофагию, активируя сигнальные пути JNK и p38MAPK [144]. Для плюмбагина также характерна индукция АФК и летального стресса эндоплазматического ретикулула [145]. Производные 1,4-нафтохинона с алкилтрифенилфосфонием в изолированных митохондриях крысы и клетках A549 повышают продукцию активных форм кислорода, действуя как разобщители дыхательной цепи митохондрий и индуцируя апоптоз [146].

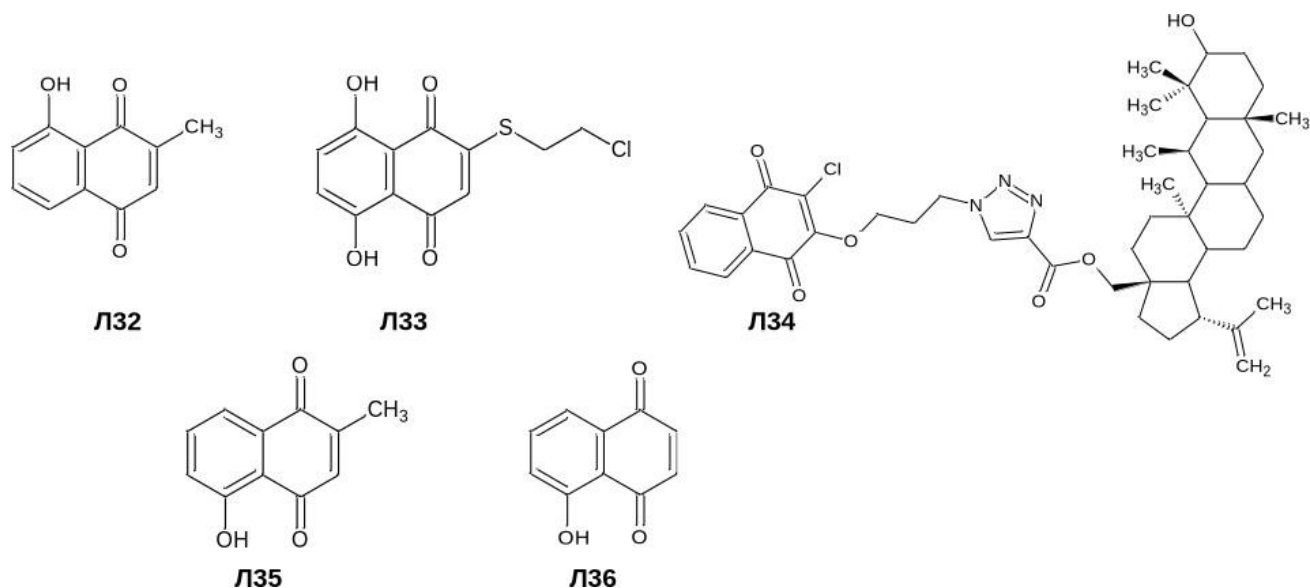


Рисунок 4: Примеры структур производных 1,4-нафтохинонов, индуцирующих нарушение окислительно-восстановительного баланса клетки

1.4.3 Ингибирование антиоксидантных ферментов и истощение внутриклеточного глутатиона

Производные 1,4-нафтохинонов могут оказывать цитотоксическое действие, связанное с нарушением редокс-статуса опухолевых клеток, не только непосредственно генерируя АФК, но и взаимодействуя с компонентами ферментативных антиоксидантных систем.

Ключевым антиоксидантным ферментом, ингибируемым нафтохинонами, является тиоредоксинредуктаза (TrxR). Этот фермент играет ключевую роль в реализации ответа на про-

апоптотический стресс и поддержании редокс-баланса опухолевых клеток [147]. Плюмбагин ингибирует TrxR в промиелоцитарных лейкозных клетках HL-60 (IC_{50} 1,5 μ M), что приводит к накоплению АФК и индукции апоптоза, опосредованного окислительным стрессом.

Синтетическое соединение **Л37** (Рисунок 5) является мощным ингибитором TrxR, связываясь с остатком селеноцистеина в активном центре фермента. Синтетическое соединение **Л38** (производное менадиона с метоксигруппой; Рисунок 5) способно снижать экспрессию TrxR2, что способствует окислительному стрессу в клетках линии Mgc-803 и приводит к деполяризации митохондриальной мембраны [148].

Соединение **Л39**, представляющее собой конъюгат ML162 с 1,4-нафтохиноном, ингибирует глутатионпероксидазу 4, а также индуцирует внутриклеточное накопление липидных пероксидов и активных форм кислорода [149]. Соединение **Л40** (Рисунок 5) снижает уровень экспрессии глутатионпероксидазы 4, вызывая истощение внутриклеточных запасов глутатиона, накопление АФК и ферроптоз [150].

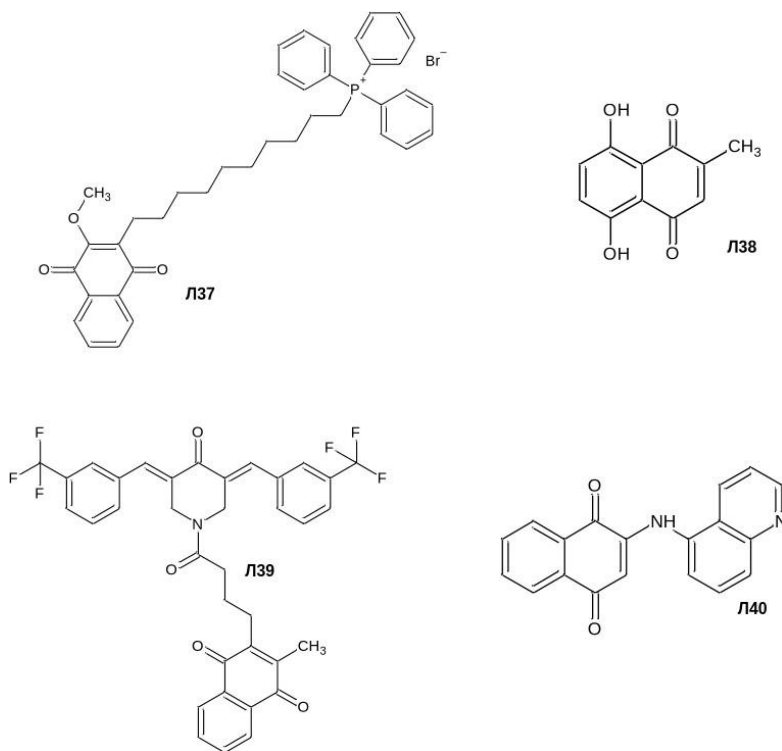


Рисунок 5: Примеры производных 1,4-нафтохинонов, ингибирующие антиоксидантные ферменты и вызывающие истощение внутриклеточного глутатиона

1.4.4 Активация АФК-зависимых сигнальных путей (МАРК, JNK, p38, STAT3)

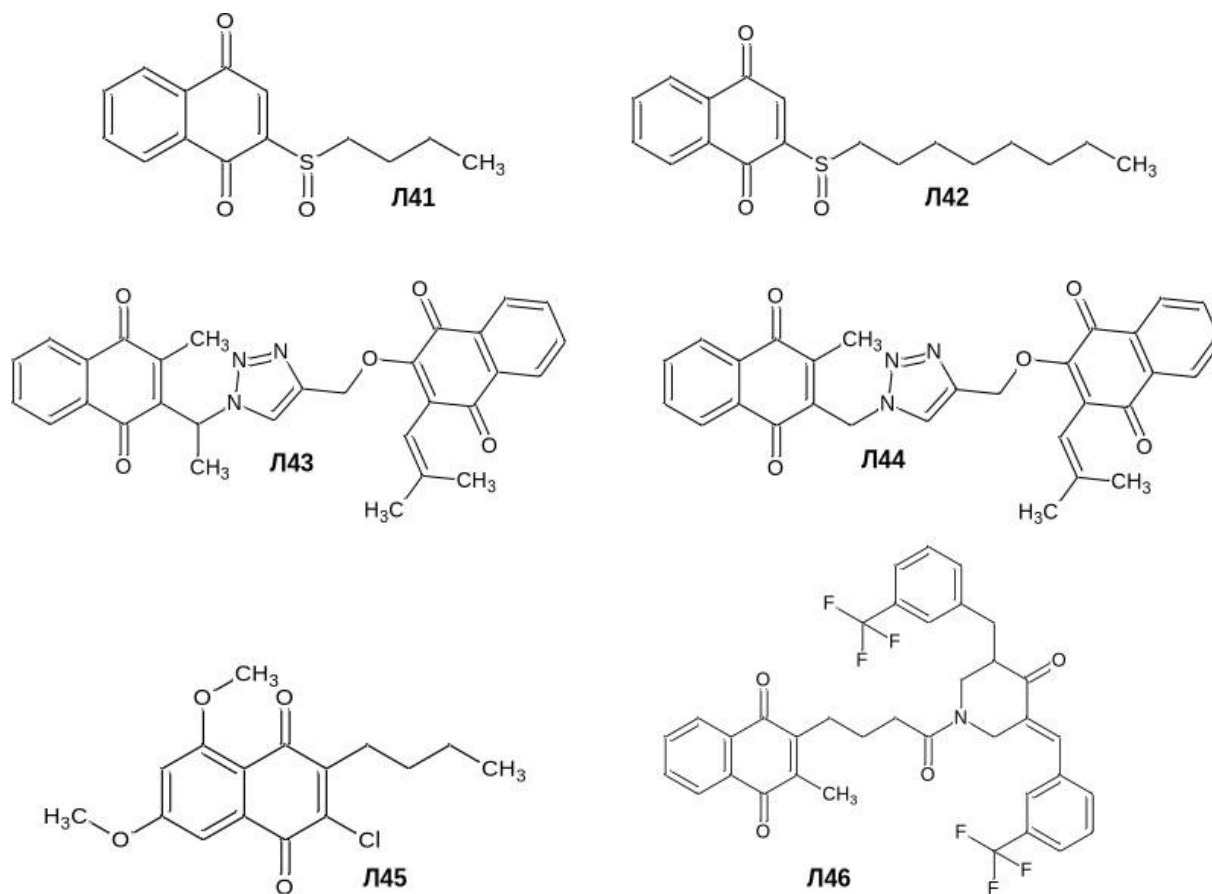


Рисунок 6: Примеры структур производных 1,4-нафтохинонов, индуцирующие активацию АФК-зависимых сигнальных каскадов

Накопление АФК может индуцировать/ингибировать определенные сигнальные каскады. В качестве примеров можно выделить сигнальные пути JNK, p38МАРК, PI3K/Akt и STAT3 [151].

К известным ингибиторам STAT3, относящихся к производным 1,4-нафтохинонов, относится напабукасин, который в настоящее время находится на стадии прохождения клинических испытаний [134]. Соединения **L41** [152], **L42** [153] и **L45** [154] (Рисунок 6) индуцируют развитие апоптоза в различных клеточных линиях через сигнальные пути МАРК, Akt и STAT3. Для соединения **L42** [152] (Рисунок 6) также показана противоопухолевая активность в экспериментах *in vivo*. Соединение **L46** (Рисунок 6) ингибирует фосфорилирование STAT3, непосредственно связываясь с доменом SH2.

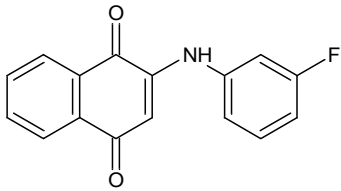
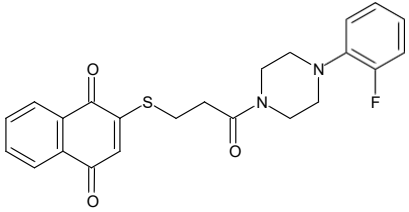
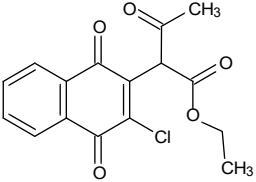
Также в клетках наблюдалось повышение уровня активных форм кислорода, снижение экспрессии белка Bcl-2, снижение мембранного потенциала митохондрий, подавление активности глутатионпероксидазы 4 (GPX4) и усиление перекисного окисления липидов, что в конечном итоге вызывало гибель опухолевых клеток по механизмам апоптоза и ферроптоза [155].

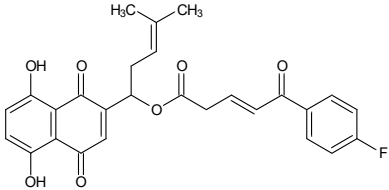
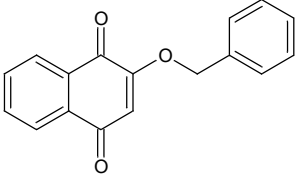
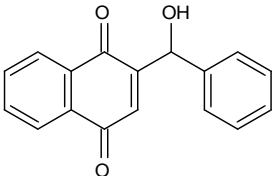
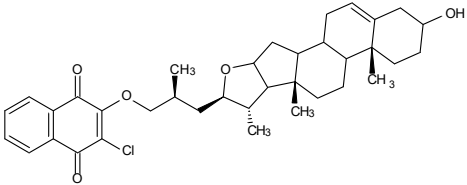
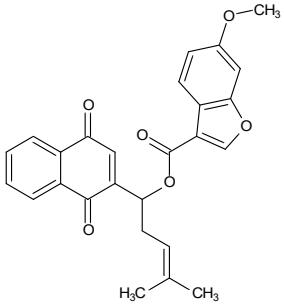
Соединения **Л43** и **Л44** (Рисунок 6), представляющие собой производные 1,4-нафтохинонов с триазольным фрагментом, повышают активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК). В клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB-231, при обработке **Л43** и **Л44**, наблюдалось повышение уровня активирующего фосфорилирования АМРК по остатку Thr172. Кроме того, сами соединения непосредственно продуцируют активные формы кислорода, что также приводит к активации АМРК как сенсора клеточного стресса [156].

1.4.5 Другие белковые/ферментные мишени производных 1,4-нафтохинона

Помимо подробно рассмотренных механизмов действия, связанных с окислительно-восстановительными процессами, ниже в Таблице 5 приведены другие молекулярные мишени производных 1,4-нафтохинонов.

Таблица 5: Молекулярные мишени производных 1,4-нафтохинона

ID	Структура	Молекулярная мишень/механизм действия	Источник
Л47		Ингибирование EGFR	157
Л48		Ингибирование EGFR	158
Л49		Снижение экспрессии EGFR и ингибирование гистондеацетилазы 6 (HDAC6)	159

Л50		Ингибирование EGFR, деполимеризация тубулина, приводящая к подавлению сборки микротрубочек	160
Л51		Ингибирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, приводящее к развитию апоптоза; также соединение ингибирует топоизомеразу II	138
Л52		Ингибирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы; индукция сигнального пути JNK/c-Jun	161
Л53		Ингибирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы; генерация АФК	162
Л54		Ингибирование полимеризации тубулина	163

1.5 Противоопухолевая активность производных пирроло[1,2а]хиноксалина

Пирролохиноксалиновый каркас представляет собой трициклическую конденсированную ароматическую систему, характеризующуюся плоской геометрией, а также структурной жесткостью и наличием сопряженной π -электронной системы. Такое строение позволяет производным пирролохиноксалина одновременно проявлять донорно-акцепторные свойства и способность π -

π -стэкинг-взаимодействиям, а также участвовать в образовании водородных связей [164]. В основном пирролохиноксалины из-за структурного сходства с бензодиазепинами и другими трициклическими психоактивными веществами рассматриваются как потенциальные психотропные средства [165]. Из производных пирролохиноксалинов в данном обзоре будут рассмотрены пирроло[1,2 α]хиноксалины, обладающие схожими подструктурными элементами с исследуемыми далее в данной работе соединениями. Для детального обзора более широкого спектра производных хиноксалинов можно отметить недавний обзор [166].

Несмотря на то, что производные пирроло[1,2- α]хиноксалина на данный момент еще не внедрены в клиническую практику, они демонстрируют значительный потенциал в качестве кандидатов для противоопухолевой терапии. Исследования последних лет подтверждают их высокую антипролиферативную активность в отношении различных линий раковых клеток [167-170]. Далее рассмотрим известные молекулярные механизмы, которые могут лежать в основе противоопухолевого действия производных пирроло[1,2- α]хиноксалина.

Рецептор GPER один из важных регуляторов пролиферации, миграции и инвазии клеток в контексте противораковой терапии. Особое внимание этому рецептору уделяется при исследовании тройного негативного рака молочной железы, хотя результаты различных работ остаются неоднозначными. Среди известных модуляторов GPER можно выделить тамоксифен — широко применяемый в клинической практике препарат [171].

В исследовании [164] была синтезирована серия производных пирроло[1,2 α]хиноксалина, изначально разработанных как антагонисты GPER. Одно из соединений — **J55** (Рисунок 7)— продемонстрировало высокую аффинность к GPER (что было подтверждено *in silico*) и проявило выраженный цитотоксический эффект в отношении GPER-положительных клеточных линий рака молочной железы MCF7 и SKBR3, оставаясь при этом нетоксичным для неонкогенных клеток НЕК293Т. Кроме того, соединение **J55** уменьшало экспрессию циклина D1, индуцировало остановку клеточного цикла в фазе G1/S и активировало регуляторные белки p53 и p21 [171]. Carullo и коллеги синтезировали пять новых соединений на основе пирроло[1,2- α]хиноксалинового скаффолда, опираясь на структуры известных лигандов GPER — агониста G-1 и антагонистов G-15 и G-36. Новые производные также вызывали остановку клеточного цикла в фазе G1/S и проявляли цитотоксическую активность в отношении клеточных линий MCF7 и SKBR3 в низком микромолярном диапазоне концентраций [164].

В работе [172] описывали производные пирроло[1,2- α]хиноксалина, разрабатываемые как ингибиторы Akt-киназы. В качестве модели для оценки действия новосинтезированных соединений *in vitro* были выбраны клеточные линии K562, U937 и MCF7 (чувствительные к ингибированию Akt-киназы) и HL60 (нечувствительные к ингибированию Akt-киназы). Было выделено 2 соединения-лидера (**Л56** и **Л57**) (Рисунок 7), показавших более выраженную, чем у контрольного соединения А6730 (известный коммерчески доступный ингибитор Akt), цитотоксичность на чувствительных к ингибиторам Akt клеточным линиям [172]. Guillon и коллеги синтезировали библиотеку 15 соединений, которые были проверены на ингибирующую активность к киназе СК2. Наиболее активное соединение **Л58** (Рисунок 7) ингибировало человеческую СК2 с $IC_{50} = 49$ нМ [173].

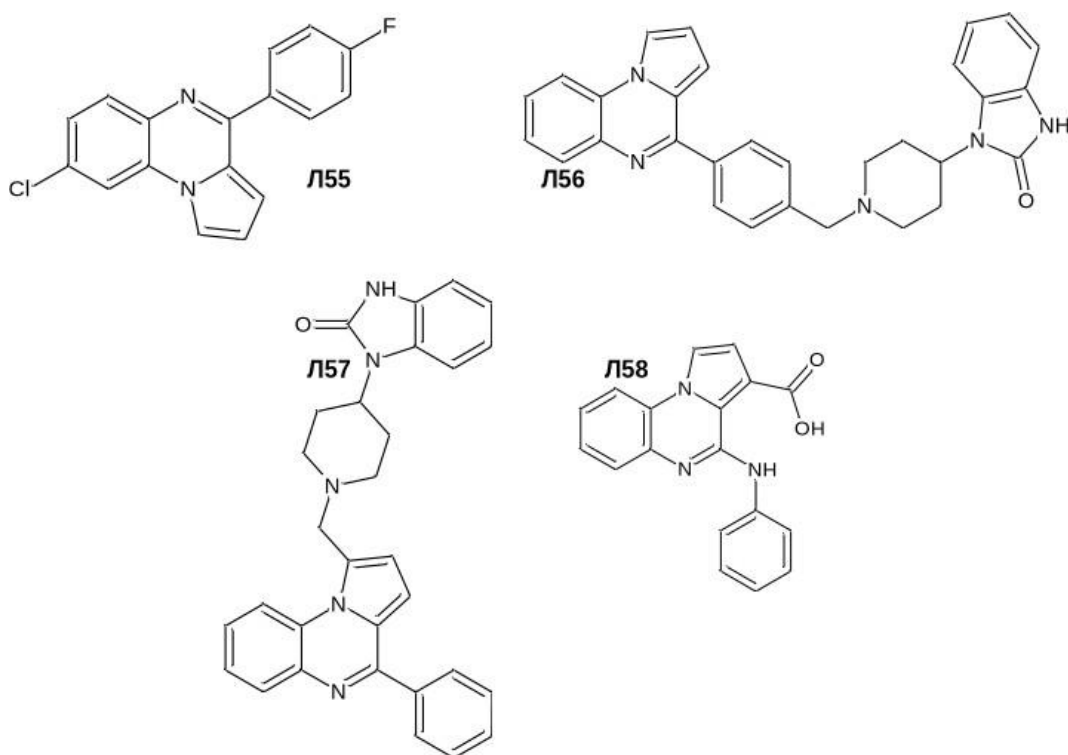


Рисунок 7: Производные пирроло[1,2 α]хиноксалина, являющиеся антагонистами GPER (**Л55**); и ингибиторами киназ (**Л56**, **Л57**, **Л58**)

В завершение, несмотря на то, что цитотоксичность многих рассмотренных в обзоре соединений (производных пирозолкарбоксамиды, хроман-4-она, 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 α]хиноксалина) находится в низком микромолярном диапазоне и во многих случаях не определены молекулярные мишени, производные данных классов обладают высоким

терапевтическим потенциалом в отношении широкого спектра злокачественных клеточных линий. Их дальнейшее изучение и структурная оптимизация остается актуальной задачей для современной медицинской химии.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Клеточные линии и среды

Клеточные линии A549, VA13, HEK293T, HCT116, PC3, HEPG2, MDAMB231, BT474, U87, PANC1 культивировали в среде DMEM/F-12 («ПанЭко», Россия), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS; GLOBE KANG Pharmaceutical, Китай), 50 ед/мл пенициллина и 0,05 мг/мл стрептомицина (HiMedia Laboratories, Индия). Клетки MCF7 выращивали в тех же условиях с добавлением 10 мкг/мл инсулина человека («ПанЭко»). Клетки 22RV1 культивировали в тех же условиях, с использованием питательной среды RPMI («ПанЭко», Россия). Клетки MCF10A культивировали в среде 10A6+, приготовленной на основе DMEM/F-12 с добавлением 5% лошадиной сыворотки (Invitrogen), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF; Invitrogen), 0,5 мг/мл гидрокортизона (Sigma-Aldrich), 100 нМ изопротеренола (Sigma-Aldrich), 10 мкг/мл инсулина («ПанЭко») и 50 ед/мл пенициллина и 0,05 мг/мл стрептомицина (HiMedia Laboratories, Индия). Культуры содержали при 37°C с 5% CO₂. Для FCST использовали среду F12(+++), содержащую 10% FBS, 50 ед/мл пенициллина и 0,05 мг/мл стрептомицина. Для модели рака молочной железы использовалась смесь сред, состоящая из F12(+++) (до 80%) и 10A6+ (до 20%). Клеточные культуры регулярно проверялись на отсутствие контаминации микоплазмой и были генотипированы методом анализа коротких tandemных повторов (STR-профилирование).

2.2 Библиотека химических соединений

Соединения **1**, **2**, **15**, с **45** по **47**, с **48-1** по **48-151**, а также с **па-1** по **па-306** коммерчески доступны. Они были получены из библиотеки ООО АйБиСкрин (IBScreen). Строчные записи структур (SMILES) этих соединений приведены в Приложении (Таблица 1.1 и Таблица 1.2). Соединения **3-14** (производные пирозолкарбоксамиды) были синтезированы А.В. Финько и Имин Сунь на кафедре органической химии (на химическом факультете МГУ). Соединения **16-38** (производные хроман-4-она) были синтезированы А.А. Михайловым и В.А. Иконниковой в группе химии природных соединений ИБХ РАН. Соединения **48-96** (производные пирролохиноксалина) были синтезированы Г.Л. Каретниковым и Д.А. Гуком в НИЛ элементоорганических соединений (на

химическом факультете МГУ). Соединения **97-100** (фотоактивируемые производные) были синтезированы Д.В. Спектором и О.О. Красновской в НИЛ БАОС химического факультета МГУ. Структуры этих соединений приведены в соответствующих главах. Строение и чистота синтезированных соединений была определена современными методами исследования органических соединений (ЯМР и ВЭЖХ).

2.3 Оценка цитотоксичности с использованием сокультур флуоресцентных клеточных линий (fluorescent co-culture test, FCCT)

Для культивирования клеток использовали поликарбонатные 384-луночные планшеты (Greiner, №781182). Клетки линий A549_EGFP и VA13_Kat высевали в плотности 400 и 800 клеток на лунку соответственно, используя среду F12(+++). Клетки MCF7_EGFP и MCF10A_Kat высевали в плотности 500 и 700 клеток на лунку. После посева клеток на планшеты следовала 18-часовая инкубация при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. По завершении инкубации в лунки добавляли исследуемые соединения, предварительно разведенные в питательной среде (в концентрациях 2,5 мг/л – 50 мг/л), при этом малорастворимые вещества были осаждены предварительным центрифугированием (в течение 10 минут при скорости 12.000 gcf). Затем планшеты инкубировали еще 72 часа. Детекция флуоресцентного сигнала проводили с помощью сканера Turbopoint FLA950 (GE Healthcare) с разрешением 10 мкм. Параметры детекции флуоресценции были следующими: для eGFP: лазер с длиной волны 473 нм (напряжение 600 В) и эмиссионный фильтр 520–540 нм; для Katushka2S: лазер с длиной волны 635 нм (напряжение 850 В) и эмиссионный фильтр ≥665 нм. Обработка полученных данных выполнялась в программе ImageJ. Использовался алгоритм автоматизированной обработки на базе плагина, описанного в [174], согласно процедуре, подробно изложенной в [50].

2.4 Тест по Мосманну

Цитотоксичность оценивали с помощью теста МТТ [175] (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) с некоторыми модификациями. Клетки линий VA13, MCF7, BT474, U87, PANC1 (по 5000 клеток на лунку), MDAMB231, HEPG2, 22RV1, MCF10A (по 3000 клеток на лунку), HEK293T, A549, HCT116 (по 2500 клеток на лунку) рассеивали в 140 мкл среды DMEM/F12 (PanEco LLC, Россия) в 96-луночный планшет и инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 18 ч. Все тестируемые вещества растворяли в ДМСО. После растворения образцы переносили к клеткам по 11

мкл разведений: шаг разведения составлял х3. Максимальная концентрация исследуемых веществ составляла 100 мкМ или 50 г/л (непосредственно в среде с клеточными линиями). Чистый раствор ДМСО использовали в качестве контроля токсичности растворителя. Максимальная концентрация ДМСО в ростовой среде после добавления веществ составляла менее 1%.

В случае анализа фотораспадаемых соединений, инкубация с исследуемыми веществами составляла 2-4 часа. После инкубации производилась смена культуральной среды и последующее облучение светом необходимой длины волны: 30 секунд облучения светом 450 нМ в случае конъюгатов с рибофлавином; 15 минут облучения светом 650 нМ в случае производных с BODIPY.

После добавления образцов (и облучения в случае фотоактивируемых соединений) клетки инкубировали в течение 48 или 72 ч, затем измеряли метаболическую активность с помощью МТТ-теста. Реагент МТТ (Ранесо LLC, Россия) добавляли в среду до концентрации 0,5 г/л. Клетки инкубировали с МТТ в течение 2–4 ч, затем среду удаляли и заменяли на 120 мкл ДМСО. Количество МТТ, восстановленного клетками до синего производного формазана, измеряли спектрофотометрически при 565 нм на микропланшетном ридере VICTOR (PerkinElmer, Сингапур) и нормировали относительно значений для клеток, инкубированных без соединений.

2.5 Анализ клеточного цикла

Клетки линии MCF7 и A549 рассеивали в 6-луночный планшет в количестве 300 000 клеток на лунку в 1 мл полной среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 20 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли по 2 мкл растворов тестируемых веществ в смеси среда-ДМСО (конечная концентрация ДМСО в среде не превышала 0,5%) и инкубировали в течение 24 часов. Клетки осаждали центрифугированием в пробирки объемом 1,5 мл (все этапы осаждения проводили при 300 g), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 70% холодным этанолом в течение часа и окрашивали в течение 2 часов раствором йодистого пропидия (100 мкг/мл) при температуре +4°C. Анализ клеток проводили на проточном цитометре (SinoCyte, Biosino (Suzhou) Medical Technology Co., Ltd) через 30 минут после окрашивания.

2.6 Анализ клеточной гибели (определение индукции апоптоза/некроза)

Клетки линии MCF7 и A549 высевали в 6-луночный планшет в количестве 300 000 клеток на лунку в 1 мл полной среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 20 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли по 2 мкл растворов тестируемых веществ в смеси среда-ДМСО (конечная концентрация ДМСО в среде не превышала 0,5%) и инкубировали в течение 16 часов. После инкубации среду и сами клетки осаждали в пробирки объемом 1,5 мл, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и окрашивали в течение 15 минут при комнатной температуре окрашивающим раствором (5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуорофором Alexa (ThermoFisher Scientific), 2,5 mM CaCl₂, 140 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7,3)). После окрашивания клетки промывали PBS и окрашивали раствором пропидия иодида (PI, Lumiprobe, Россия) в концентрации 0,1 г/л в течение 15 минут при +4°C в темноте. По завершении этого этапа клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (SinoCyte X, Biosino (Suzhou) Medical Technology Co., Ltd).

2.7 Анализ интеркаляции в ДНК методом вытеснения бромистого этидия

Анализ проводили в 384-луночных полистирольных планшетах с плоским дном (Greiner, №781182). Общий объем реакционной смеси в лунке составлял 40 мкл.

Были использованы следующие реактивы: буферный раствор (Tris-HCl (pH 7,5; 1 M), KCl (1 M)), раствор ДНК тимуса теленка (80 мкМ), раствор бромистого этидия (100 мкМ). В качестве контроля фоновой флуоресценции использовали смесь бромистого этидия и буферного раствора. В качестве отрицательного контроля (образец с максимальным флуоресцентным сигналом) использовалась смесь буферного раствора, ДНК и бромистого этидия. Для контроля поглощения флуоресценции в контрольные лунки добавляли акридин-9-амин. Исследуемые соединения добавлялись в концентрациях 320, 80, 20 и 5 мкМ (содержание ДМСО в исследуемых растворах составляло 3%). После добавления всех компонентов планшет инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Далее измеряли флуоресценцию на планшетном ридере (Victor X5 (PerkinElmer)). Для оценки интеркаляции исследуемых соединений в ДНК оценивали уровень

падения флуоресцентного сигнала относительно смеси буферного раствора, ДНК и бромистого этидия.

2.8 Анализ ингибирования биосинтеза ДНК *in vitro*

Клетки линии A549 высевали в плоскодонный микротитрационный 384-луночный планшет (Greiner, №781182) и инкубировали в течение 20 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. На второй день после посева к клеткам добавляли рабочий раствор EdU (20 мМ) до конечной концентрации 100 мкМ одновременно с исследуемыми соединениями в концентрации 500 нМ. Клетки инкубировали в течение 24 часов. По окончании инкубации среду удаляли, клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, затем промывали PBS. Для детекции встроенного в новосинтезированную ДНК модифицированного нуклеотида EdU использовали реакцию мечения азидом, конъюгированным с флуорофором Cy5, катализируемую медью(I). Реакционная смесь состояла из 2 мМ комплекса Cu-ТВТА (Lumiprobe), 10 мМ аскорбиновой кислоты (Lumiprobe), 10 мМ раствора флуорофора Cy5 в ДМСО (Lumiprobe), буфера Tris/Hcl (рН 7,4). Инкубация с клетками составляла 20 мин при 37 °С, 5% CO₂. После этого клетки дважды промывали PBS и окрашивали ядерным красителем Hoechst (1 мкг/мл, 10 мин) для визуализации всех клеток, инкубация составляла 15 минут. Микроскопию проводили на автоматическом цифровом микроскопе CELENA® X High Content Imaging System (Logos Biosystems, Южная Корея). Для каждой лунки снимали не менее 4 полей зрения. Количественный анализ изображений выполняли при помощи программного обеспечения CELENA® X Cell Analyzer. Определяли долю клеток, включивших EdU (положительных по Cy5), относительно общего числа клеток (окрашенных Hoechst). Ингибирование репликации рассчитывали как процентное снижение количества EdU-позитивных клеток в исследуемых образцах по сравнению с контролем (клетки, обработанные только EdU без исследуемых соединений).

2.9 Анализ продукции активных форм кислорода методом проточной цитометрии

Клетки линии A549 высевали в 6-луночном планшете в количестве 300000 клеток на лунку в 1 мл полной среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 16 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После к клеткам добавлялись 2 мкл исследуемых соединений в смеси ДМСО-культуральная среда, в качестве положительного контроля использовали пероксид водорода до

финальной концентрации 0,3%. Клетки инкубировались с исследуемыми соединениями в течение 1 часа. Далее культуральная среда заменялась на среду DMEM-F12 без сыворотки (чтобы избежать разрушения красителя ферментами, содержащимися в сыворотке); и добавлялся краситель H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, Lumiprobe, Россия) до финальной концентрации 10 мкМ. Клетки инкубировали с реагентом для изучения продукции активных форм кислорода в течение 30 минут. После инкубации клетки осаждали в пробирки объемом 1,5 мл, промывали 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (SinoCyte X, Biosino (Suzhou) Medical Technology Co., Ltd).

2.10 Подготовка образцов для транскриптомного анализа и обработка данных транскриптомного анализа

Клетки рака легкого линии A549 высевали на 6-луночный планшет в количестве 300000 клеток на лунку в 1 мл среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 16 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После к клеткам добавлялись 2 мкл исследуемых соединений в смеси ДМСО-культуральная среда до финальной концентрации 0,45 мкМ (концентрация была выбрана исходя из рассчитанной IC₅₀ для этого соединения). Инкубация с исследуемыми соединениями составляла 6 часов. После инкубации из клеток выделялась тотальная РНК набором для выделения РНК на колонках (Biolabmix, Россия). Эксперимент повторяли в четырех биологических репликах. Для получения образца для проведения транскриптомного анализа объединяли РНК из всех четырех биологических реплик.

Последовательности прочтений были предварительно обработаны с помощью fastp¹⁷⁶ и выровнены на геном человека hg38 с использованием STAR¹⁷⁷. Идентификация дифференциально экспрессированных генов выполнена с помощью GFOLD¹⁷⁸.

2.11 Анализ ингибирования полимеризации тубулина *in vitro*

Ингибирование полимеризации тубулина исследовали с помощью анализа оптической плотности раствора белка, повышающейся во время процесса полимеризации. Чистота тубулина составляла >99% (Porcine (BK006P производства Cytoskeleton, Inc.)). Растворы тестируемых соединений в концентрации 100 мкМ в 80 мМ PIPES (pH 7,0) объемом по 2,5 мкл каждый добавляли в 384-луночный оптически прозрачный планшет. Планшет нагревали до 37°C, после чего добавляли 25 мкл тубулина в концентрации 3 мг/мл в буфере, содержащем 80 мМ PIPES (pH 7,0), 0,5 мМ ЭГТА,

2 mM MgCl₂, 1 mM ГТФ и 10% глицерина. Далее проводили измерения поглощения при 340 нм при температуре 37°C. Оптическую плотность регистрировали каждые 30 или 60 секунд. Обработка данных выполнялась в программе GraphPad Prism.

2.12 Иммуноцитохимическое окрашивание тубулина в клеточных линиях

Клетки высевали на покровные стекла, предварительно обработанные полилизинном (обработка проводилась в концентрации 33 мг/л в течение часа). На следующий день добавляли соединения в исследуемых концентрациях и инкубировали клетки в течение 24 часов. После инкубации проводили фиксацию клеток с использованием метанола, охлажденного в жидком азоте, в течение 20 минут без предварительной промывки PBS; дополнительная пермеабиллизация не проводилась. Для предотвращения неспецифического связывания антител клетки обрабатывали 4% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в PBS в течение часа. После этого добавляли раствор мышинных моноклональных антител против альфа-тубулина, конъюгированных с Alexa488 (ThermoFisher Scientific, 32-2588), в концентрации 5 мкг/мл в 1% растворе БСА в PBS и инкубировали при 5°C в течение 24 часов. Затем клетки трижды промывали буферным раствором PBS и заключали в среду Mowiol.

2.13 Вестерн-блоттинг

Клетки A549 высевали в 6-луночные планшеты (200000 на лунку) в 2 мл питательной среды. Через 24 ч после посева в лунки добавляли исследуемые соединения в концентрации 0,45 мкМ, контрольный препарат туникамицин – 2.5 мкг/мл. Были проанализированы три временные точки инкубации: 20 минут, 2 и 24 часа. После инкубации клетки дважды промывали PBS.

Клетки лизировали в RIPA-буфере (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,1% дезоксихолата натрия). В каждую лунку вносили по 100 мкл буфера, инкубировали 15 мин при комнатной температуре на орбитальном шейкере, затем лизаты собирали и центрифугировали (10 мин, 14 000 g, 4 °C). Супернатанты переносили в новые пробирки.

Концентрацию белка измеряли с использованием набора Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США). Для построения калибровочной кривой использовали растворы бычьего сывороточного альбумина с известными концентрациями (0,1–1,5 мг/мл), разведённые в RIPA-буфере. Образцы

лизатов разводили в 3 раза тем же буфером. Оптическую плотность измеряли при 590 нм, концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой.

Образцы, содержащие по 10 мкг белка, смешивали с 4-кратным буфером Лэммли (250 мМ трис-глицина pH 6,8, 8% SDS, 40% глицерин, 20% 2-меркаптоэтанол, 0,004% бромфеноловый синий), прогревали 5 мин при 95 °С. Разделение проводили в 12% (разрешающий гель) полиакриламидном геле (концентрирующий гель – 5%) в системе Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad). Перенос белков на PVDF-мембрану (0,45 мкм, Thermo Scientific) осуществляли методом полусухого переноса в блотаторе Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) в буфере для переноса (20% Tris-Gly, 20% этанол) в течение 30 мин.

Мембрану блокировали 1 ч при комнатной температуре в 5% растворе BSA в TBST (Tris-буферный солевой раствор с 0,1% Tween-20). Первичные антитела (Anti-eIF2S1 (phospho S51) antibody [E90] для детекции фосфорилированной формы eIF2 α и Anti-eIF2A antibody [EPR11042] для общего eIF2 α , оба Abcam) разводили в 5% BSA/TBST (1:1000) и инкубировали с мембраной в течение 12 часов при 4 °С. После отмытки TBST (5–6 раз, 1–2 мин) мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP (Invitrogen, G21234) в разведении 1:10 000 в 5% BSA/TBST. Хемилюминесцентную детекцию проводили (с помощью набора Thermo Fisher) на системе ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Для удаления связанных антител мембрану обрабатывали буфером для отмытки (62,5 мМ Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 мМ 2-меркаптоэтанол) в течение 30 мин при 50–70 °С, затем промывали TBST. Повторную блокировку проводили 5% BSA/TBST, после чего мембрану инкубировали с первичными антителами против GAPDH (Anti-GAPDH antibody [6C5], разведение 1:1000) в течение 12 часов при 4 °С, а затем с вторичными антителами. Нормализацию проводили по GAPDH для определения концентрации внесенного белка.

2.14 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени

Клетки линии A549 в 6-луночном планшете в количестве 300000 клеток на лунку в 1 мл среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 16 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ без обработки. После этого к клеткам добавляли исследуемые соединения (0,8 мМ) в растворе ДМСО-культуральная среда и инкубировали в течение 6 часов. После удаляли питательную среду, промывали клетки раствором фосфатно-солевого буфера и обрабатывали раствором ExtractRNA

(Evrogen, Россия). После выделяли РНК фенол-хлороформным методом согласно инструкции производителя (Evrogen, Россия). Обратная транскрипция производилась с помощью ревертазы Magnus; количественная ПЦР проводилась с помощью набора реактивов 5X qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия).

2.15 Подготовка растворимых форм соединений-лидеров для *in vivo* исследований переносимости и противоопухолевого эффекта

Для производных 1,4-нафтохинонов: навеска соединения **49** растворялась в аптечном ДМСО до финальной концентрации вещества 67 г/л. К аликвоте соединения, необходимой для приготовления 21 инъекционного раствора, добавлялся коллифор до финальной концентрации 15%. После формуляция доводилась до объема 400 мкл физиологическим раствором. Для исследования переносимости тестировались концентрации 32 мг/кг и 20 мг/кг. Для исследования противоопухолевого эффекта тестировались концентрации 20 мг/кг, 10 мг/кг и 5 мг/кг.

Для производных пирроло[1,2 α]хиноксалина: навеска соединения **77** растворялась в 96% этиловом спирте до концентрации 100 мг/мл. К спиртовому раствору соединения добавлялся коллифор и физиологический раствор до финальной концентрации 10%. Для исследования переносимости тестировались концентрации 20 мг/кг и 10 мг/кг. Для исследования противоопухолевого эффекта тестировались концентрации 10 мг/кг и 5 мг/кг.

Для производных пиразол-3-карбоксамиды: навеска соединения **2** растворялась в ДМСО до финальной концентрации 15 г/л. К аликвоте соединения добавлялся 20% раствор ПЭГ300 в воде до финальной концентрации солюбилизатора 3,6%. После формуляция доводилась до объема 400 мкл физиологическим раствором. Для исследования переносимости тестировались концентрация 10 мг/кг. Противоопухолевая активность соединения тестировалась в концентрациях 5 мг/кг и 2,5 мг/кг.

Глава 3. Результаты и обсуждения

В работе представлены результаты многоуровневого отбора низкомолекулярных органических соединений по их цитотоксичности и селективности действия. В результате скрининга были выделены наиболее перспективные соединения-хиты, проанализированы зависимости структура-активность их производных и новых фотоактивируемых соединений платины. Для ключевых соединений-лидеров исследованы механизмы действия, а также подтверждена их противоопухолевая эффективность *in vivo*. Общая схема работы приведена на Рисунке 8.

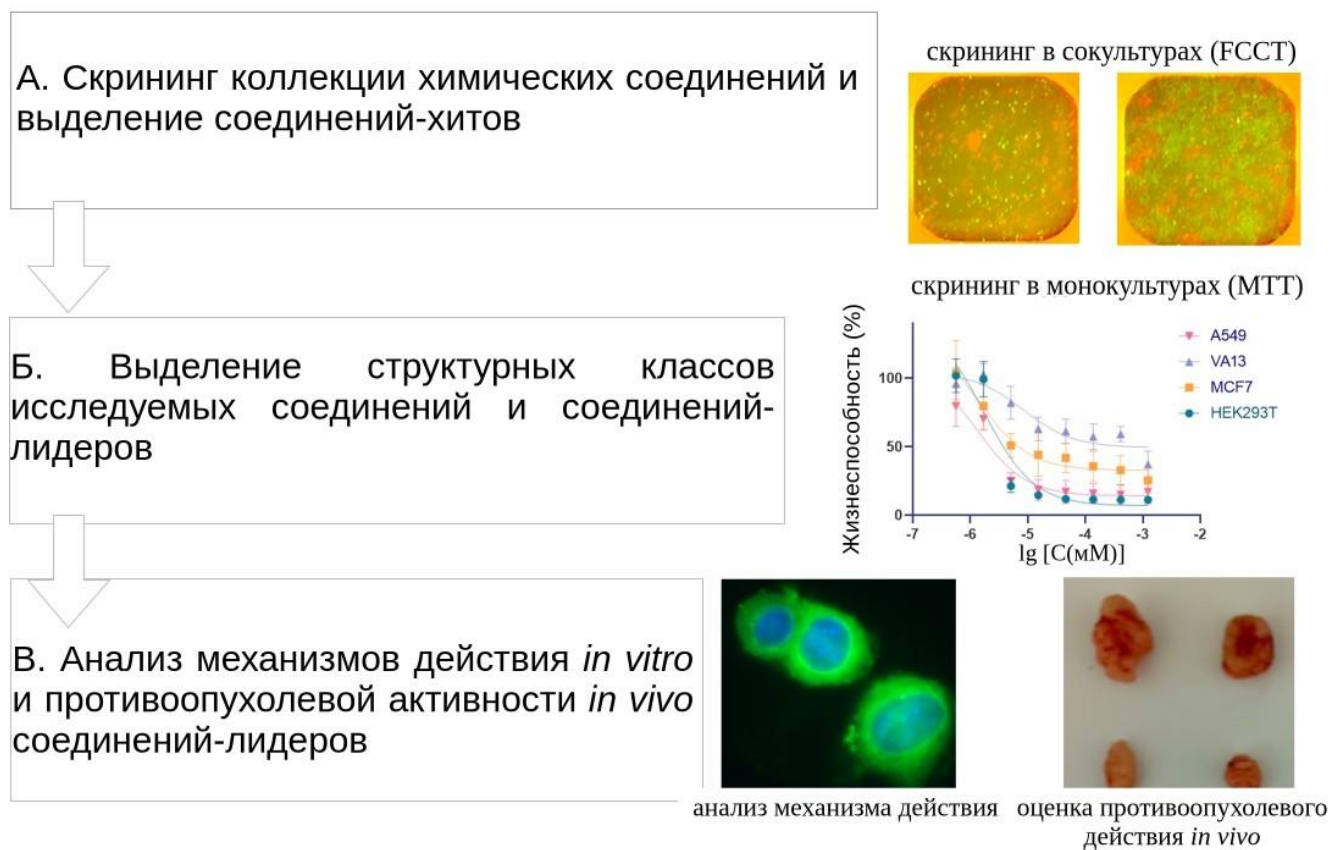


Рисунок 8. Общая схема проведенного исследования. А. Проведение скрининга в сокультурах клеточных линий (FCCT), в качестве иллюстрации приведено изображение модели рака молочной железы (клетки MCF7_GFP и MCF10A_Katushka). Б. Выделение фармакофора, анализ цитотоксичности коллекций соединений методом MTT, в качестве иллюстрации приведен график зависимости цитотоксичность-жизнеспособность клеток для соединения 77. В. анализ механизма действия соединений-лидеров и их *in vivo* противоопухолевой активности. В качестве иллюстрации приведены изображения ингибирования полимеризации тубулина соединением 77 и фрагменты привитой опухоли колоректального рака в мышинных моделях после лечения их соединением 77.

3.1 Высокопроизводительный скрининг цитотоксичности и селективности веществ с использованием флуоресцентных сокультур клеточных линий (FCCT)

В ранее собранной лабораторной базе данных были доступны показатели цитотоксичности и селективности, полученные при первичном скрининге библиотеки из более 8000 химических соединений. На основе этих данных были выделены молекулы для адресной сборки коллекции соединений; выбор производных осуществлялся по принципу структурного подобия. Подструктурные элементы, по которым проводился поиск в библиотеке химических соединений IBScreen для классов селективных соединений, обсуждаемых далее в работе приведены в Таблице 1.1 в Приложении. Список исследованных соединений структурных классов, в которых не были выделены селективные хиты, приведены в Таблице 1.2. Соединения были получены из коллекции химических соединений IBScreen.

Для оценки цитотоксичности и селективности соединений из сформированной коллекции был проведен высокопроизводительный скрининг с использованием флуоресцентных сокультур клеточных линий (FCCT) (Рисунок 8). Клетки опухолевой и неопухолевой этиологии культивировались совместно, что позволяет отчасти смоделировать опухолевое микроокружение [50, 86]. В используемых моделях опухолевые клетки (A549 и MCF7) экспрессировали зеленый флуоресцентный белок (GFP), а неопухолевые (VA13 и MCF10A) — красный (Katushka2S). После инкубации с препаратами мы измеряли интенсивность флуоресценции обоих типов клеток. На основе полученных данных рассчитывался рейтинг селективности: он соответствовал числу лунок в ряду последовательных разведений, в которых интенсивность красного сигнала (от неопухолевых клеток) преобладала над интенсивностью зеленого (от опухолевых).

По результатам проведенного скринингового исследования было выделено несколько хитов – соединений, показавших высокие значения селективности и цитотоксичности (рейтинг селективности хотя бы в одной из исследуемых моделей должен был быть равным или превышать 2). На основании этого были определены классы соединений (производные 1,4-нафтохинона, пирроло[1,2 α]хиноксалина, пиразол-3-карбоксамид, спироциклогексан-хроман-4-она), изучение которых было продолжено. Для каждого высокоселективного хита была сформирована из коммерчески доступных соединений в библиотеке IBScreen и/или синтезирована коллекция соединений и определены ключевые точки для рациональных структурных модификаций и оптимизации фармакофоров. Полные списки молекул (из выделенных четырех классов структурных соединений) и их рейтинги селективности приведены в Таблице 1 в Приложении.

Далее будут подробно описаны проведенные, согласно схеме (приведена на Рисунке 8), исследования для каждого из выделенных классов соединений.

3.2 Производные пиразолкарбоксамида

3.2.1 Производные пиразолкарбоксамида, избирательно цитотоксичные в сокультурах и монокультурах клеточных линий

В исходной коллекции соединений было выделено селективное производное пиразолкарбоксамида. Прототипом данного класса стало вещество **1** (N-([1,1-бифенил]-4-ил)-1-метил-4-нитро-1H-пиразол-3-карбоксамид, Таблица 1.1 в Приложении), в флуоресцентном скрининге в сокультурах клеточных линий для выделения фармакофорного ядра было протестировано 22 его структурных аналога.

Наиболее выраженную цитотоксичность и селективность продемонстрировало соединение **2** (N-(2,5-дихлорфенил)-1-метил-4-нитро-1H-пиразол-3-карбоксамид): рейтинг селективности составил 3 в модели рака легкого и 2 в модели рака молочной железы (Рисунок 9). Эффекты остальных протестированных соединений были значительно ниже (подробные данные приведены в Таблице 1 в Приложении).

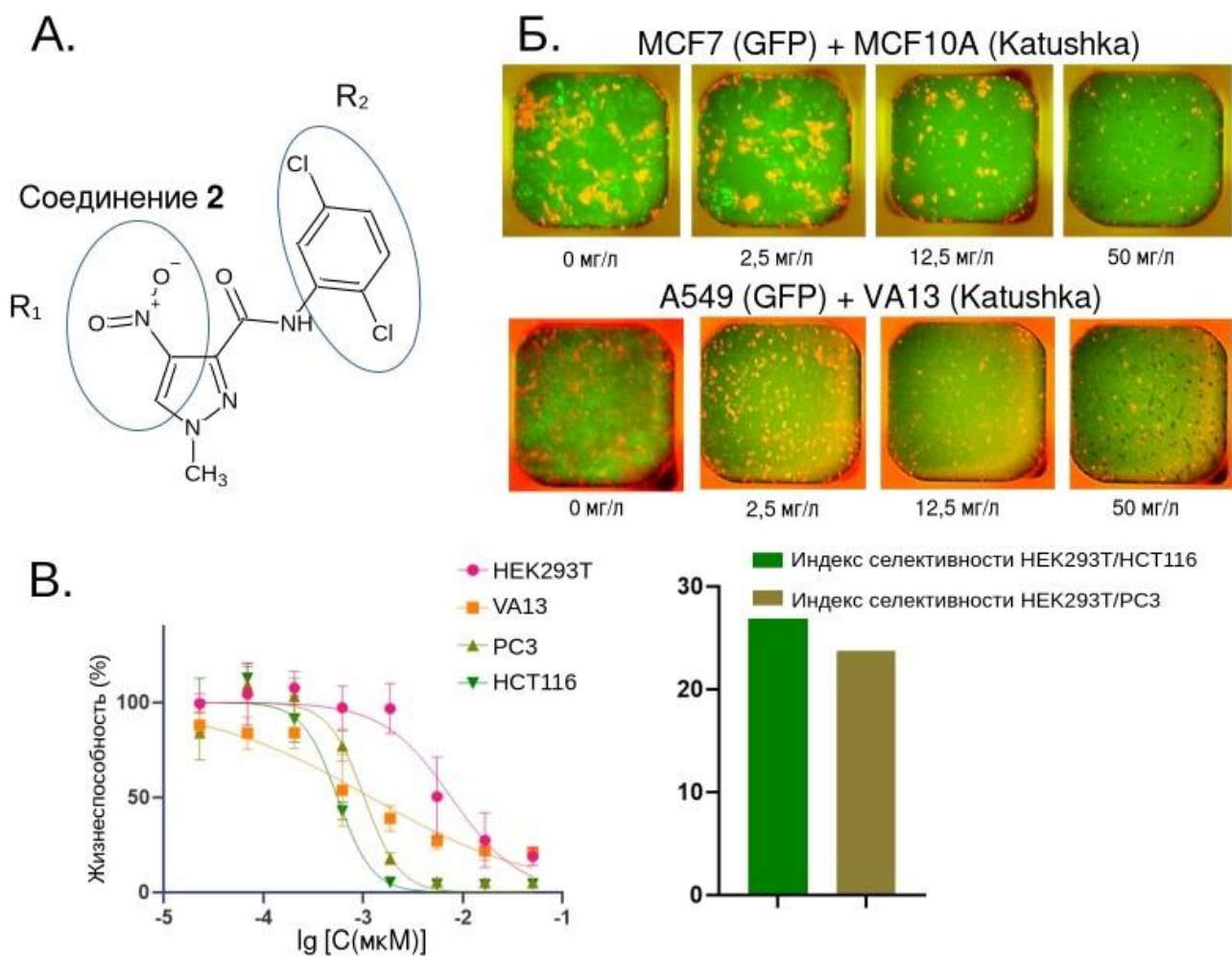


Рисунок 9. Цитотоксичность соединения **2** в сокультурах и монокультурах клеточных линий. *А.* Структура соединения-лидера **2**, структурные модификации проводили по положениям R1 и R2. *Б.* Цитотоксичность и селективность действия соединения **2** в сокультурах клеточных линий (селективность действия выражается в виде преобладания клеток, имитирующих неопухолевые и меченных красным флуоресцентным белком *KatushkaS2*). Селективная цитотоксичность наблюдается вплоть до концентрации вещества 2,5 мкг/мл, как в модели рака легкого, так и в модели рака молочной железы. *В.* График, отражающий цитотоксичность соединения-лидера **2** в монокультурах. По оси ординат — содержание жизнеспособных клеток; по оси абсцисс — концентрация соединения **2** (мкМ). Наибольшая токсичность наблюдается для линий PC3 (рак предстательной железы) и HCT116 (рак толстого кишечника). Справа представлена гистограмма, отражающая индексы селективности, рассчитываемые как соотношение цитотоксического эффекта (IC_{50}) для опухолевых клеток PC3/HCT116 и неопухолевых HEK293T.

Ввиду высокой селективности в обеих моделях FCCT соединение **2** было исследовано методом МТТ. МТТ представляет собой колориметрический тест для оценки жизнеспособности и пролиферации клеток по активности клеточных ферментов (оксидоредуктаз). Нами было использовано 13 клеточных линиях различной этиологии (Таблица 6). Максимальная токсичность

зафиксирована для клеток линий рака толстого кишечника HCT116 и предстательной железы PC3 (Рисунок 9), которые характеризуются высокой скоростью пролиферации. Однако для быстро пролиферирующей неопухолевой линии HEK293T значение IC₅₀ составило ~17 мкМ, что в 24 раза превышает показатели для линий PC3 и HCT116 (IC₅₀ ~ 0,7 мкМ). Отсутствие выраженной токсичности на неопухолевой модели при сопоставимой скорости деления позволяет выдвинуть гипотезу о том, что цитотоксичность соединения **2** не коррелирует напрямую с темпом пролиферации. Это указывает на возможное наличие специфического механизма действия, не связанного исключительно с подавлением клеточного деления.

Таблица 6. Результаты оценки цитотоксичности соединения **2** на 13 клеточных линиях различной этиологии.

Клеточная линия	IC ₅₀ (мкМ)
HepG2	2.2±0.2
U87	1.2±0.1
A549	5.2±0.8
LNCap	5.6±0.9
MDAMB231	6.7±0.8
HEK293T	19±4
PC3	0.7±0.1
HCT116	0.7±0.1
SiHa	3.4±0.2
Va13	5±1
McF7	19±1
HT1080	3.5±0.8
Panc1	10±1

Таким образом, вещество **2** стало новым соединением-лидером, для которого далее были предприняты попытки оптимизации структуры.

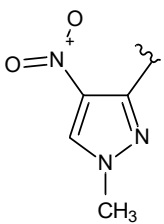
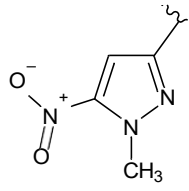
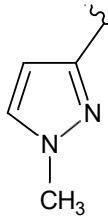
3.2.2 Анализ зависимости структура-активность производных пиразолкарбоксамидов

Для исследования зависимостей «структура-активность» (SAR) в данном классе группой А.В. Финько и Имин Сунь на кафедре органической химии химического факультета МГУ была синтезирована серия из 12 производных с варьируемыми функциональными группами. Цитотоксичность новосинтезированных производных оценивалась методом МТТ. В качестве

исследуемых опухолевых клеточных линий были выбраны НСТ116 (рак толстого кишечника) и РС3 (рак предстательной железы), так как они показали наибольшую чувствительность к соединению **2**. Также для оценки селективности действия были использованы неопухолевые клеточные линии – VA13 и НЕК293Т.

На первом этапе оценивалось влияние нитрогруппы в пиразольном цикле (Таблица 7). Изменение положения нитрогруппы (соединение **3**) или её удаление (соединение **4**) приводят к потере активности: значения IC_{50} для всех протестированных клеточных линий превысили 30 мкМ.

Таблица 7. Цитотоксичность производных соединения **2** с варьируемым положением нитрогруппы.

ID	Наличие и положение нитрогруппы	Значение IC_{50} (мкМ)			
		НЕК293Т	VA13	НСТ116	РС3
2		19±4	5±1	0.7±0.1	0.7±0.1
3		~30	>30	>30	>30
4		~30	>30	>30	>30

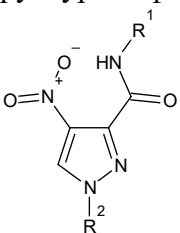
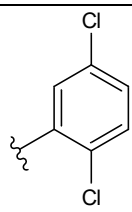
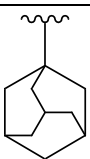
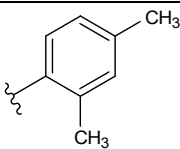
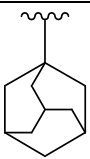
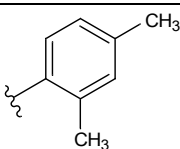
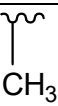
На втором этапе были исследованы производные, содержащие переменные заместители в фенильном и/или пиразольном фрагментах (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**) (Таблица 8). Также были рассмотрены ди-карбоксамидные производные (**11**, **12**, **13**, **14**).

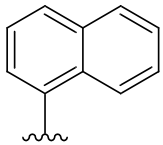

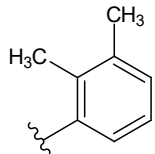

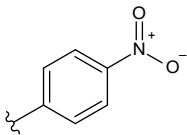

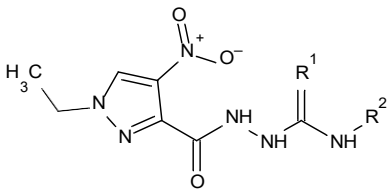
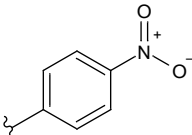
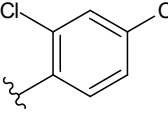
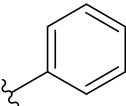
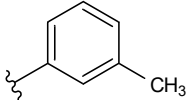
Замена фенильного радикала на нафталиновый (**8**), так же, как и замена атома хлора на другие функциональные группы (**7**, **9**, **10**) приводит либо к полному исчезновению цитотоксичности, либо к сильному снижению активности по сравнению с исходным соединением **2**. Введение объемного заместителя в пиразольный фрагмент приводит к появлению обратной

селективности – соединения **5** и **6** проявляют более выраженную цитотоксичность к клеткам НЕК293Т.

Соединения с дикарбоксамидным фрагментом **11** и **12** показали слабые цитотоксические эффекты. Соединение **13** имело сходный с прототипом – соединением **2** – профиль селективности, при этом оно показало слабую токсичность не только для линии НЕК293Т, но и для VA13. Но, несмотря на это, эффекты на опухолевых линиях НСТ116 и РС3 были выражены слабее, чем у соединения **2** (Таблица 8).

Таблица 8. Цитотоксичность дикарбоксамидных производных и соединений, содержащих переменные заместители в фенильном и/или пиразольном фрагменте.

ID	Структурная формула	Значение IC ₅₀ (мкМ)				
		НЕК293Т	VA13	РС3	НСТ116	
Общая структурная формула соединений 5-10 						
	R1	R2				
5			2.3±0.3	2.9±0.4	9±1	3.5±0.4
6			2.1±0.2	5.1±0.7	10±1	3.4±0.4
7			>30	>30	>30	>30

8			26±3	21±4	8±1	3.7±0.6
9			15±2	18±3	>30	~30
10			12±1	3.5±0.5	2.8±0.4	3.4±0.4
Общая структурная формула 11-14						
						
11	O		>30	>30	>30	>30
12	S		22±2	23±4	21±3	16±2
13	S		~30	>30	3.5±0.6	3.0±0.3
14	S		>30	>30	>30	>30

Таким образом, производное **2** осталось соединением-лидером. Были выявлены критическое значение нитрогруппы в пиразольном фрагменте и значимость полярных заместителей в фенильном радикале. Поскольку соединение **2** демонстрировало цитотоксический эффект в низком

микромольном диапазоне и индекс селективности (по сравнению с клетками неопухолевой этиологии НЕК293Т) составляет более 25, было принято решение о возможности тестирования его противоопухолевой активности *in vivo*.

3.2.3 Противоопухолевый эффект соединения-лидера класса производных пиразолкарбоксамида

Дальнейшие исследования соединения **2** были сфокусированы на оценке его противоопухолевого действия. Данные были предоставлены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

Первоочередной задачей стала разработка инъекционной формы, пригодной для внутривенного введения и содержащей допустимые концентрации физиологически переносимых вспомогательных веществ. Для достижения необходимой растворимости в 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия были использованы солюбилизаторы ДМСО и ПЭГ300 в итоговых концентрациях 1,5% и 3,6% соответственно. Полученная инъекционная форма представляла собой прозрачный гомогенный раствор, сохраняющий стабильность при центрифугировании в течение 5 минут при 10 000 g и при последующей инкубации в течение нескольких часов на комнатной температуре.

Данные экспериментов *in vivo* были предоставлены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). При однократном введении препарата в хвостовую вену мышей в дозе 5 мг/кг соединение **2** не показало токсического эффекта, что позволило перейти к изучению противоопухолевой активности. Исследование проводили на модели перевиваемого лимфолейкоза Р388 с использованием иммунокомпетентных самок мышей линии DBA/2. Соединение **2** не вызывало преждевременной гибели животных, и динамика изменения средней массы тела в опытных группах практически не отличалась от показателей контрольной группы.

При дозировке 5 мг/кг соединение **2** проявляет умеренный противоопухолевый эффект, обеспечивая увеличение продолжительности жизни животных на 70,2%. Препарат сравнения (таксол) в дозировке 1 мг/кг продемонстрировал показатель 85,1%. Таким образом, несмотря на достижение определенных положительных эффектов *in vivo*, противоопухолевая активность соединения **2** остается ниже значений препарата сравнения, что не позволяет признать вещество успешным в его нынешнем виде.

3.3 Производные хроман-4-она

3.3.1. Избирательная цитотоксичность производных хроман-4-она в модели рака молочной железы

Структура хроман-4-она (рассмотренная в пункте 1.3 обзора литературы) относится к числу привилегированных фрагментов в медицинской химии. При сборке и анализе библиотеки соединений наше внимание было сфокусировано на его спироциклических производных. Интерес к спироциклическим каркасам обусловлен их объемной и жёсткой структурой, которая может обеспечивать более избирательное взаимодействие с биологическими мишенями [179].

При скрининге в сокультурах клеточных линий (FCST) были протестированы 28 соединений, содержащих спироциклогексан, соединенный с хроман-4-оном.

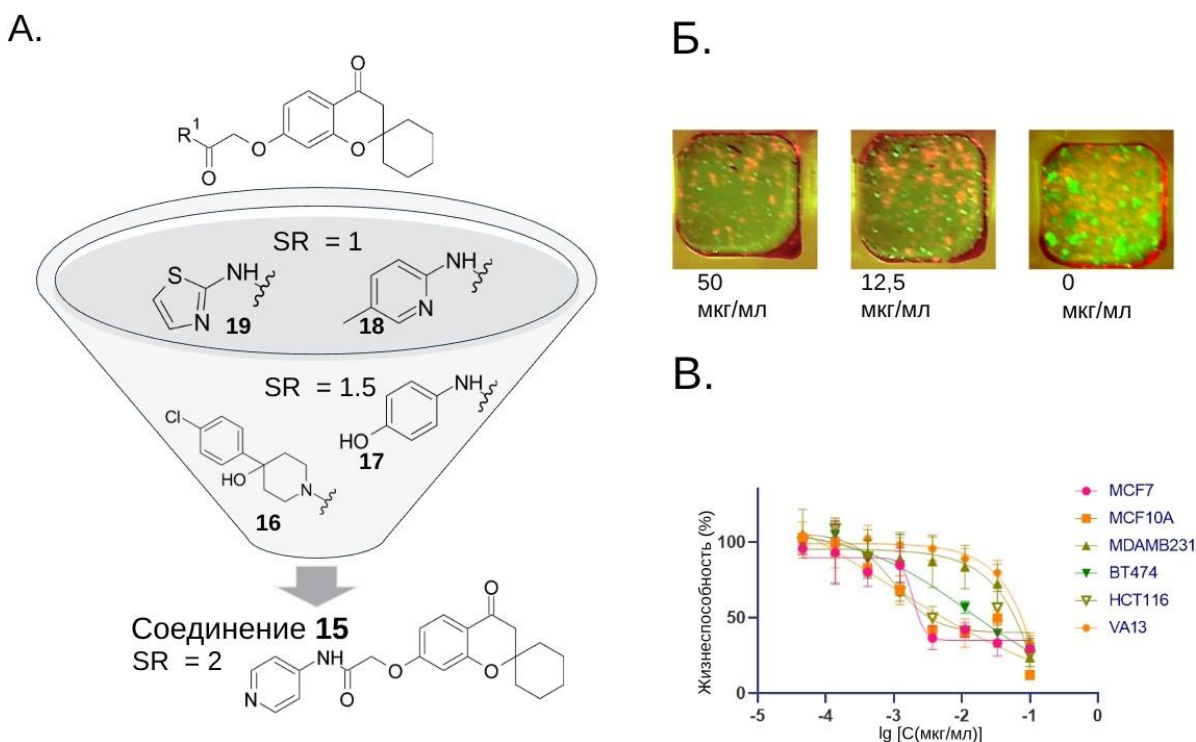


Рисунок 10. Выделение соединения-лидера группы производных хроман-4-она. А. Анализ зависимости структура-активность и последовательная фильтрация проанализированных в FCST производных спироциклогексанхроман-4-она. Соединение 15 является наиболее селективным, SR = 2 (в модели рака молочной железы). Б. Микроскопические изображения клеток в модели рака молочной железы (в FCST) при их обработке соединением 15. Преобладание неопухолевых клеток MCF10A (экспрессирующих красный флуоресцентный белок Katushka2S) свидетельствует о селективности действия соединения. В. Цитотоксичность соединения 15 в монокультурах клеточных линий (MTT). Наибольшая токсичность наблюдается для линии MCF7, что согласуется с результатами, полученными в FCST.

В качестве исследуемых заместителей были выбраны различные циклические (в том числе гетероциклические) структуры (Таблица 9). Полные данные о селективности и токсичности всех протестированных соединений приведены в Таблице 1.1, в Приложении.

Таблица 9. Цитотоксичность обсуждаемых в тексте производных спироциклогексанхроман-4-она в модели рака молочной железы (FCST).

Общая структурная формула соединений 15-24		
Соединение	R1	Рейтинг селективности в модели рака молочной железы
15		2
16		1,5
17		1,5
18		1
19		1
20		0.5
21		0.5
22		0.5
23		0
24		0

Оптимальными заместителями в положении R1 (Рисунок 10А) являются пиридиновый и фенильный фрагмент, содержащие заместители с неподеленной электронной парой (атомы хлора или гидроксильные группы). Соединения **15**, **16** и **17**, содержащие данные структурные элементы, продемонстрировали наиболее выраженный эффект (Таблица 9). Для пиридиновых производных ориентация цикла существенно влияет на общую токсичность: так, соединение **19** (производное 2-амино-5-метилпиридина) проявило меньшую токсичность по сравнению с соединением **15**, в котором атом азота находится в пара-положении. Все образцы, содержащие алкильные фрагменты с заместителями, отличными от пиридина (**20**, **23**, **24**), кислородсодержащие гетероциклы (**21**, **22**), а также включающие длинный линкер в R1, не проявили цитотоксическое действие.

Для валидации избирательности действия и цитотоксичности соединение **15** было протестировано в монокультурах клеток методом МТТ-теста. Для подтверждения данных FCST об активности вещества в модели рака молочной железы были выбраны соответствующие клеточные линии: MCF7, MDA-MB-231, BT474 (линии рака молочной железы) и MCF10A (линия эпителиальных клеток молочной железы). Дополнительно были выбраны: неопухолевая линия VA13 (иммортизированные фибробласты легкого) и линия рака толстого кишечника HCT116, характеризующаяся высокой скоростью пролиферации (Рисунок 10В). В FCST был использован субклон линии MCF7, для которого характерна более высокая скорость деления. Соответственно, было необходимо проверить, что высокая селективность соединения **15** обусловлена специфическим действием именно на опухолевые клетки молочной железы, а не на все клеточные линии с высоким уровнем пролиферации. Для этого к набору исследуемых на цитотоксичность линий была добавлена линия аденокарциномы толстого кишечника (HCT116) с высокой скоростью пролиферации.

В МТТ соединение **15** проявило наиболее выраженную цитотоксичность в низком микромолярном диапазоне в отношении клеточных линий MCF7 и MCF10A. Эффекты на другие линии рака молочной железы и клетки VA13 были значительно слабее. Цитотоксичность в отношении HCT116 также была менее выражена по сравнению с MCF7, что подтверждало предположение о возможном избирательном механизме действия.

Таким образом, соединение **15** было выбрано как соединение-лидер в данном классе. В его структуре были выделены фрагменты, которые были модифицированы (Таблица 10, Рисунок 11). Для полученных производных была проанализирована зависимость структура-активность.

3.3.2 Анализ взаимосвязи структура-активность производных спироциклогексанхроман-4-она

В структуре соединения **15** были выбраны три фрагмента (Таблица 10), которые были модифицированы. Новые структурные производные соединения **15** были синтезированы и предоставлены А.А. Михайловым и В.А. Иконниковой в группе химии природных соединений ИБХ РАН. Коллекция из 22 новосинтезированных соединений была протестирована с помощью МТТ-теста (Таблица 10). На этом этапе работы были выбраны две линии рака молочной железы (MCF7, MDA-MB-231) и две линии клеток неопухолевой этиологии (MCF10A, VA13).

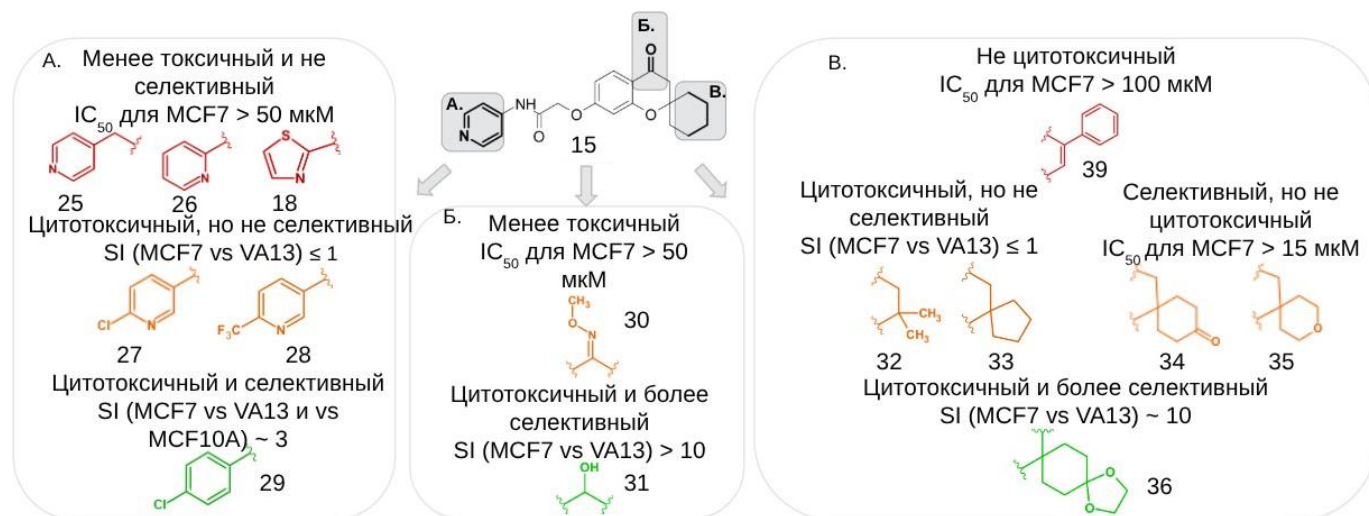


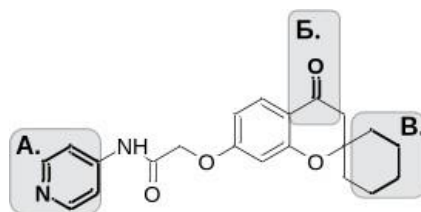
Рисунок 11. Анализ структура-активность для производных соединения **15**. Для каждого варьируемого структурного фрагмента (А, Б, В) были определены оптимальные заместители (хлорфенильный; гидроксогруппа; диоксолан), отмеченные зеленым. Соединения, содержащие заместители, отмеченные красным/оранжевым, демонстрировали меньшую цитотоксичность и/или селективность действия.

Первые структурные производные содержали замены в фрагменте А. Согласно результатам ФССТ, наиболее выраженную селективность проявляли соединения, содержащие в своей структуре пиридин и замещенную фенильную группу. При этом пиридинсодержащее соединение **15** продемонстрировало более высокую селективность по сравнению с производными **16** и **17** (Таблица 9). На основании этих данных для дальнейшего изучения был синтезирован ряд соединений (**25–37**), содержащих замещенный или незамещенный пиридин, а также соединение **29** с хлорфенильной группой. Цитотоксичность всех полученных веществ оценивалась с помощью МТТ-теста (Таблица 10).

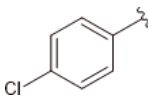
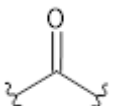
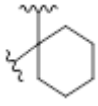
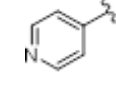
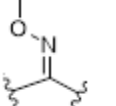
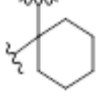
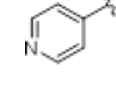
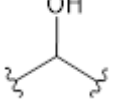
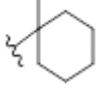
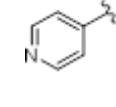
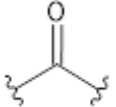

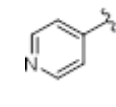
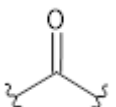

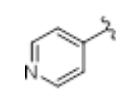
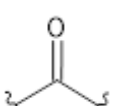
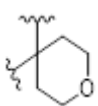
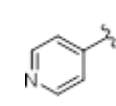
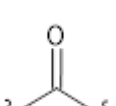
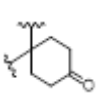
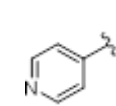
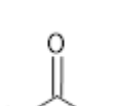
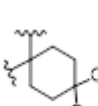
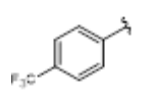
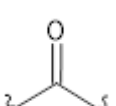

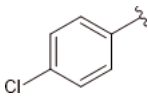
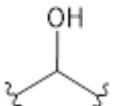
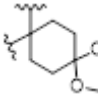
Таблица 10. Цитотоксичность и селективность действия новосинтезированных структурных производных соединения **15**. Индекс селективности (SI) рассчитывался как

соотношение IC_{50} линий MCF7/MCF10A или MCF7/VA13. Доксорубин был использован как контрольное цитотоксическое соединение.

Общая структура соединений 15-38



Соединение	Заместитель			Цитотоксичность, IC_{50} (мкМ)				SI (MCF7 vs MCF10A)	SI (MCF7 vs VA13)
	Фрагмент А	Фрагмент Б	Фрагмент В	MCF7	MCF10A	MDAMB2 31	VA13		
15				55±1	5±1	49±2	31±3	0,78	8,54
18				53±6	~100	34 ±5	47±5	1,55	0,88
25				>100	>100	>100	>100	1,00	1
26				>100	>100	>100	40±4	1,00	0,40
27				~100	~100	52±2	~100	1	1
28				12±1	14±1	19±2	16±1	1,18	1,32

29				28±4	~100	~100	~100	2,84	3,58
30				18±3	28±3	38±2	51±3	1,51	2,83
31				9±1	9±1	>100	>100	1	11,51
32				~100	49±1	>100	>100	0,48	1
33				~100	36±8	~100	~100	0,49	0,89
34				16±1	24±4	~100	>100	1,51	6,22
35				20±2	32±4	>100	>100	1,61	7,19
36				10±1	7 ±1	>100	>100	0,68	9,45
37				0,9±0,2	30±2	16,3±0,9	19±3	5,58	3,59
38				0,9±0,1	39±3	31±1	35±1	9,99	8,95

Доксорубицин (нМ)	3±1	2,0±0,4	83±5	6±1	0,59	1,95
-------------------	-----	---------	------	-----	------	------

Соединения **26** и **15** (прототип) существенно различаются по профилю цитотоксичности в МТТ-тесте, несмотря на то что положение азота относительно заместителя в пиридиновом цикле является их единственным структурным отличием. Это подтверждает данные скрининга FCST о важности положения азота в пиридиновом фрагменте для проявления цитотоксического эффекта. Соединение **26** проявляет обратную селективность и проявляет преимущественную токсичность в отношении неопухолевых клеток VA13 с IC₅₀ равным 40 мкМ, оставаясь при этом нетоксичным для других клеточных линий (Таблица 10). Тем не менее, именно пиридиновый фрагмент для реализации токсического действия не оказался критически значимым фрагментом.

Наиболее перспективным в данной серии оказалось соединение **29**, содержащее хлорфенильную группу вместо пиридина. Только соединение **29** продемонстрировало умеренную селективность к клеточной линии MCF10A, практически не оказывая токсического воздействия на клетки VA13 (Таблица 10). Однако соединение **29** проявляло менее выраженную цитотоксичность по отношению к клеткам MCF7 в сравнении с прототипом **1** (IC₅₀ составило 28 мкМ против 8 мкМ соответственно). Замена хлорфенильной группы на хлорпиридиновую (соединение **27**) привела к полной потере токсичности в отношении MCF7: значения IC₅₀ превысили 100 мкМ (Таблица 10). При замене атома хлора на другую галогенсодержащую группу – трифторметильную CF₃ – наблюдалась утрата избирательности действия. Соединения **28** и **37** проявили значительную токсичность в отношении линии VA13 с показателями IC₅₀ 15,9 мкМ и 19,2 мкМ соответственно (Таблица 10).

Таким образом, оптимальным заместителем по положению А стал хлорфенильный фрагмент (соединение **29**). Хотя это несколько снизило общую цитотоксичность (для линии MCF7 IC₅₀ = 28 мкМ), селективность действия существенно возросла.

Следующим структурным фрагментом, который был модифицирован, стал фрагмент Б (Рисунок 11). Были рассмотрены два заместителя: гидроксильная группа и N-метоксиимин. Соединение **30**, содержащее N-метоксииминогруппу, проявило цитотоксичность со значением IC₅₀ 18 мкМ для клеток линии MCF7 и 51 мкМ для клеток VA13. Соединение **31**, содержащее гидроксильную группу, продемонстрировало цитотоксичность в отношении клеток MCF7 с IC₅₀ 8

мкМ (что сопоставимо с исходным соединением), в то время как показатель IC_{50} для клеток VA13 превысил 100 мкМ.

Таким образом, восстановление карбонильной группы способствует повышению селективности действия относительно VA13 при сохранении высокой цитотоксичности в отношении MCF7.

Последним варьируемым фрагментом на данном этапе исследования стал фрагмент В. Было установлено, что неполярные заместители – такие как две метильные группы в соединении **32** или спироциклопентановый фрагмент в соединении **33** – не способны эффективно заменить спироциклогексановую группу (Рисунок 11).

В структуру спироциклогексанового фрагмента были внесены три модификации при сохранении его основного скелета. Введение кетогруппы (соединение **35**) или гетероатома кислорода (соединение **34**) не привело к улучшению цитотоксических свойств полученных веществ. Однако внедрение диоксолановой группы (соединение **36**) позволило сохранить цитотоксичность по отношению к целевой клеточной линии MCF7 ($IC_{50} \sim 10,5$ мкМ) при одновременном снижении токсичности для клеток VA13 ($IC_{50} > 100$ мкМ) (Рисунок 10).

Наилучшим результатом в этой серии стало внедрение диоксолановой группы (соединение **36**). Данная модификация обеспечила одновременно токсичность против MCF7 и отсутствие цитотоксичности против VA13.

На данном этапе работы были определены наиболее эффективные структурные модификации: введение хлорфенильного заместителя в фрагмент А (соединение **29**), восстановление карбонильной группы до спирта в фрагменте Б (соединение **31**) и добавление диоксоланового цикла в фрагмент В (соединение **36**). Эти структурные модификации обеспечивают улучшение избирательного действия на клетки аденокарциномы молочной железы, снижая при этом токсичность для неопухолевых линий. В связи с этим было принято решение объединить все три модификации в структуре одной молекулы. Предполагается, что такой подход обеспечит синергетический эффект и приведет к существенному росту селективной цитотоксичности в отношении линии MCF7.

3.3.3 Цитотоксичность, остановка клеточного цикла и индукция апоптоза в клетках рака молочной железы MCF7 соединением-лидером

Соединение **38** объединило в себе все выделенные в предыдущем пункте работы структурные модификации. Исследование цитотоксичности этого соединения подтвердило гипотезу о синергетическом эффекте выделенных структурных модификаций: соединение **38** проявило более высокую токсичность в отношении клеток MCF7 по сравнению с прототипом **15**, продемонстрировав при этом улучшенную селективность к клеткам линий MCF10A и VA13 (Рисунок 12). Согласно результатам анализа клеточного цикла, воздействие вещества **38** в концентрации 20 мкМ в течение 24 часов индуцирует остановку цикла в G1-фазе в клетках MCF7. При оценке механизмов гибели клеток был зафиксирован умеренный, но значимый уровень апоптоза.

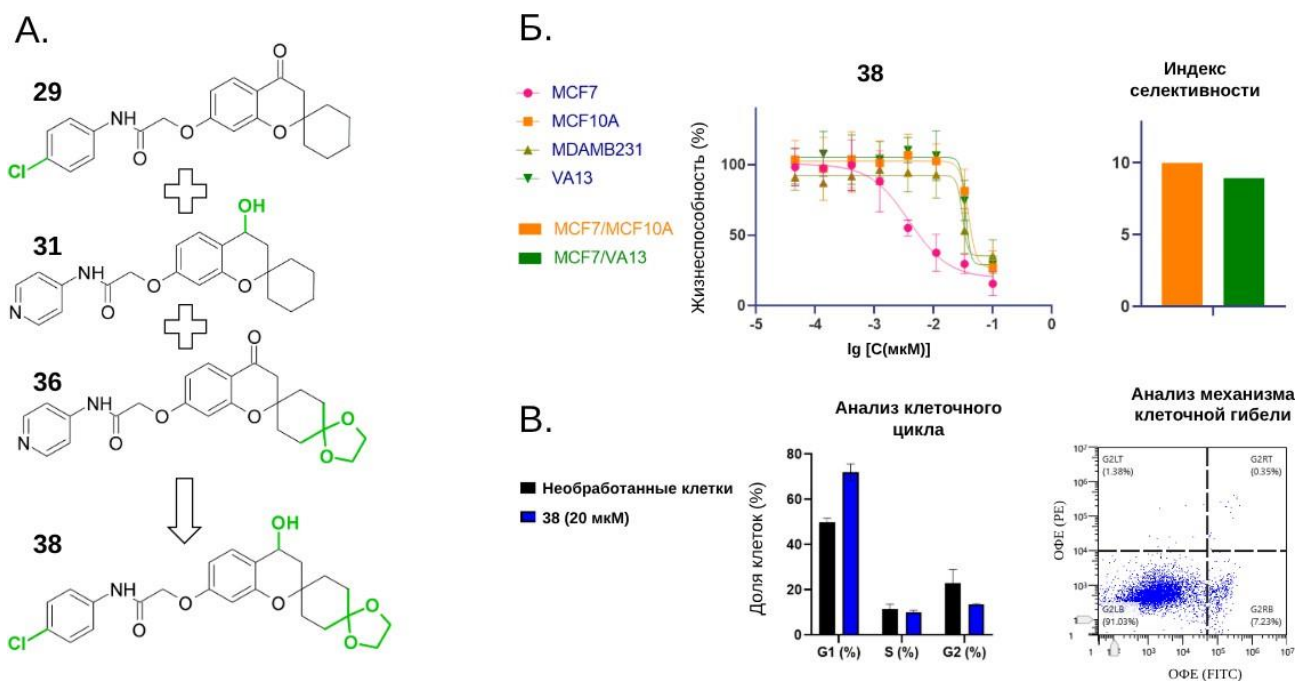


Рисунок 12. Выделение соединения-лидера **38**. А. Объединение найденных ранее наиболее перспективных заместителей в одном соединении (**38**). Б. Цитотоксичность соединения-лидера **38** в монокультурах клеточных линий и избирательность действия и индексы селективности MCF7/MCF10A и MCF7/VA13. В. Анализ влияния соединения-лидера **38** на клеточный цикл и клеточную гибель клеток аденокарциномы молочной железы — MCF7. Соединение вызывает остановку цикла в G1-фазе и индуцирует апоптоз.

Таким образом, сочетание выделенных трех наиболее перспективных структурных замен в одном соединении (**38**) привело к выявлению соединения-лидера данного класса. Соединение **38** демонстрирует улучшенную, по сравнению с прототипом, цитотоксичность к линии MCF7 и более высокую селективность действия (индекс селективности для линий MCF7/MCF10A и MCF7/VA13 составляет порядка 10).

3.4 Производные 1,4-нафтохинона

3.4.1 Значимость нафтохинонового фрагмента в фармакофоре для избирательной цитотоксичности

Найденное ранее соединение **40** демонстрировало избирательную цитотоксичность как в модели рака легкого (рейтинг селективности = 2), так и в модели рака молочной железы (рейтинг селективности = 3) [86]. В структуре данного вещества нами были выделены два фрагмента: гетероциклический триазолотриазинный и нафтохиноновый. В библиотеку были включены 27 производных соединения **40**, модификации подвергались оба выделенных фрагмента молекулы. Несмотря на описанную частую неспецифическую активность хинонов, результаты скрининга (FCST) показали, что лишь одно производное – **45**, сохранившее нафтохиноновый фрагмент, – обладает значимой цитотоксичностью и селективностью. Остальные соединения серии в FCST оказались неактивны (Рисунок 13).

Для валидации результатов FCST соединение **45** было протестировано в монокультурах с помощью МТТ-теста на четырех клеточных линиях: A549 (немелкоклеточный рак легкого), VA13 (иммortalизованные фибробласты легкого), MCF7 (рак молочной железы) и HEK293T (иммortalизованные клетки почки эмбриона).

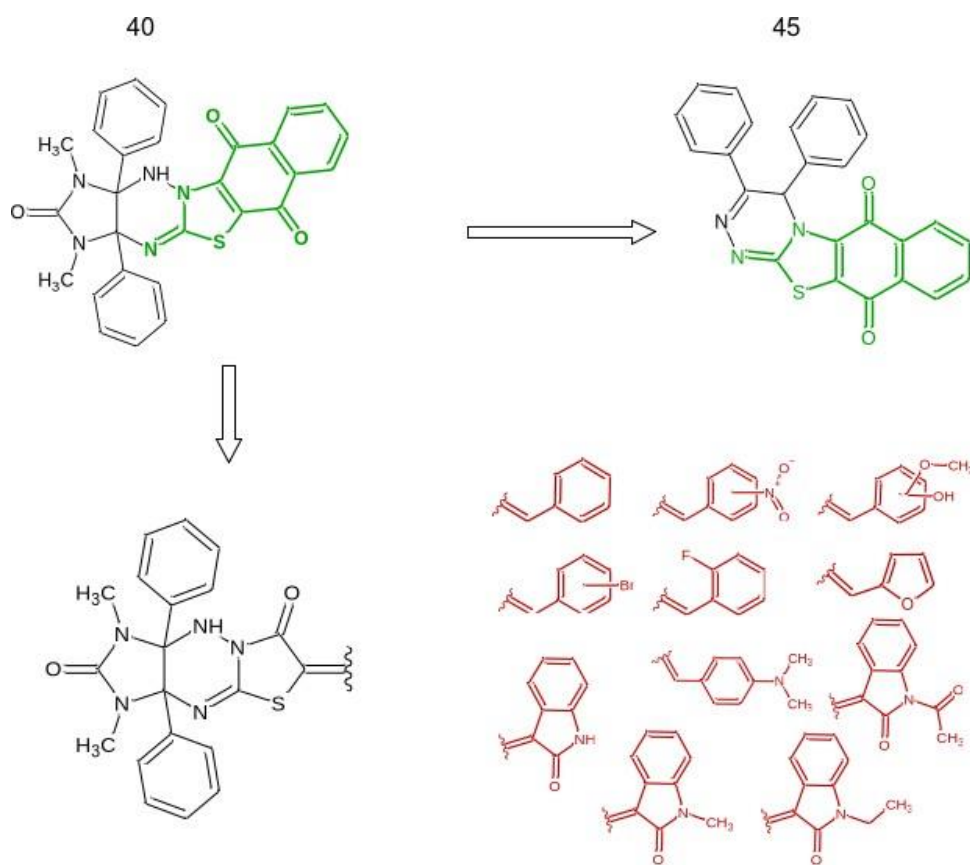


Рисунок 13. Анализ структура-активность соединения **40**. Зеленым выделен фармакофорный фрагмент, сохраненный в соединении-лидере **45**, проявившем избирательную цитотоксичность в FCST. Красным выделены заместители, присутствовавшие в производных данного класса, которые не показали цитотоксичность и селективность действия в FCST.

Полученные результаты подтвердили высокую селективность **45**. Значение IC_{50} для линии A549 составило ~45 нМ, в то время как для клеток VA13 и HEK293T оно оказалось существенно выше – 635 нМ и 5110 нМ соответственно. Таким образом, индекс селективности составил более 10 при сравнении цитотоксичностей для клеточных линий A549/VA13 и превысил 100 для A549/HEK293T. Такие значения селективности действия подтвердили перспективность дальнейших исследований **45**, а также значимость хинонного фрагмента для данного фармакофора.

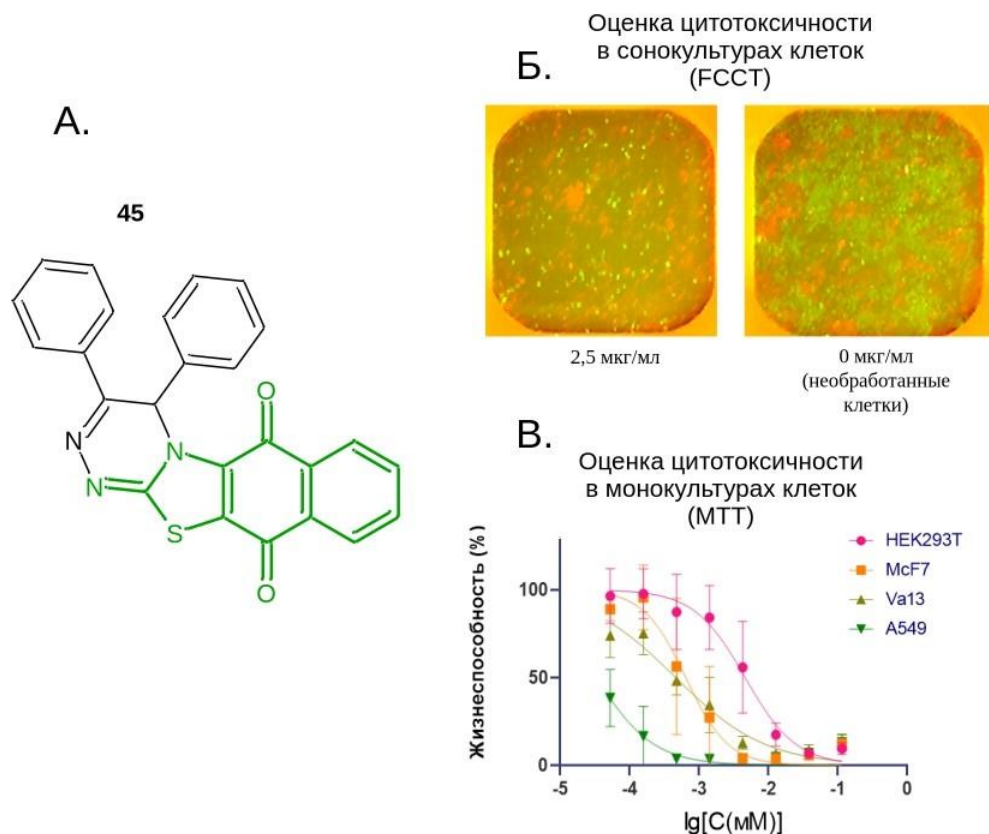


Рисунок 14. Цитотоксические эффекты соединения **45** в сокультурах и монокультурах клеточных линий. А. Структура соединения **45**. Б. Микроскопическое изображение FCST. Неопухолевые клетки VA13, экспрессирующие красный флуоресцентный белок *Katishka2S*, преобладают над опухолевыми клетками A549, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок GFP, вплоть до концентрации соединения **45** 2.5 мкг/мл. В. Оценка токсичности вещества **45** методом MTT. Наибольшая цитотоксичность наблюдается для линии рака легкого A549.

3.4.2 Анализ закономерностей структура-активность для производных 1,4-нафтохинона

Для соединения **45** была собрана коллекция из 60 структурных аналогов. В библиотеке IBScreen не представлены близкие структурные аналоги **45**, содержащие нафтотиазолотриазининовые фрагменты. Поиск по подобию подструктур привел к выбору бензотриазолов, соединенных с 1,4-нафтохиноновым фрагментом. В данном каркасе сохраняется структурно близкое пространственное расположение атомов азота с хинонным фрагментом (Рисунок 15).

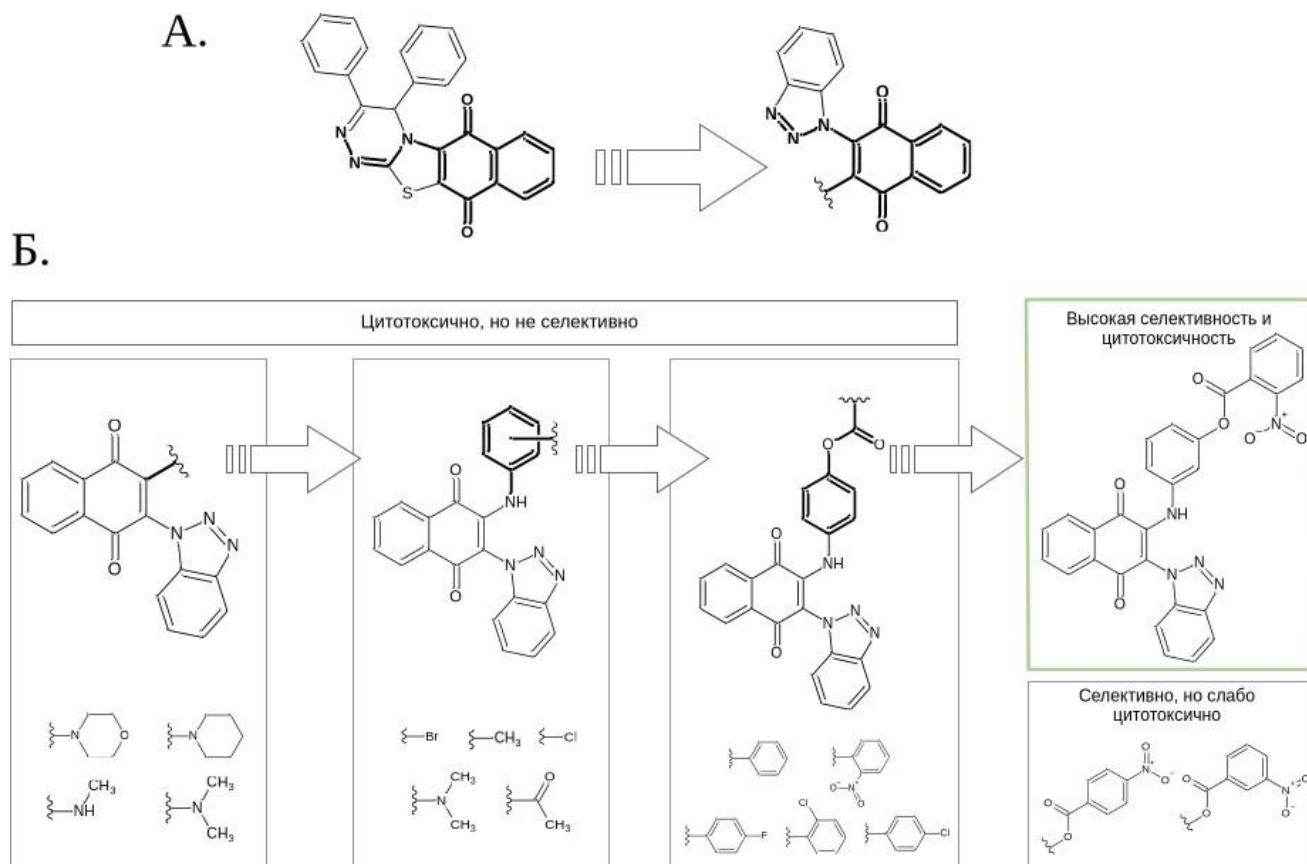


Рисунок 15. Анализ структура-активность структурных аналогов соединения 45. А. Структурный переход от соединения 45 к бензотриазольным производным. Б. Выделение оптимальных заместителей. По данным FCST и MTT, только одно из исследованных соединений проявляет избирательность действия и остается цитотоксичным. Упрощение структуры приводит к потере селективности и/или цитотоксичности.

Выбранные соединения, как и в предыдущем раунде оптимизации структуры, были проанализированы в сокультурах клеток (FCST) (полные данные представлены в Таблице 1.1 в Приложении). Наибольшую селективность действия показало соединение 49 – рейтинг селективности в модели рака легкого - 2,5. Всего избирательность действия показали 34 соединения, рейтинг селективности был равен или превышал 1 хотя бы в одной из моделей. Селективно токсичные соединения были далее исследованы в монокультурах клеточных линий методом МТТ (полные данные представлены в Таблице 2 в Приложении). По результатам проведенных скрининговых исследований был проведен анализ зависимости структура-активность (Рисунок 15). Тридцать одно соединение, показавшее селективность действия в сокультурах клеток (в том числе с рейтингом селективности ≥ 2), оказалось неизбирательно цитотоксично в МТТ. Из

всей коллекции только три вещества – **46**, **47**, **49** – продемонстрировали селективность действия как в монокультурах, так и в сокультурах клеток. Единственное отличие в структуре данных трех соединений – положение нитрогруппы в фенильном радикале. Соединения **46** и **47**, содержащие нитрогруппу в пара- и мета-положении соответственно, показали более слабые цитотоксические эффекты, чем **49**, где нитрогруппа расположена в орто-положении (Рисунок 15, Таблица 2 в Приложении).

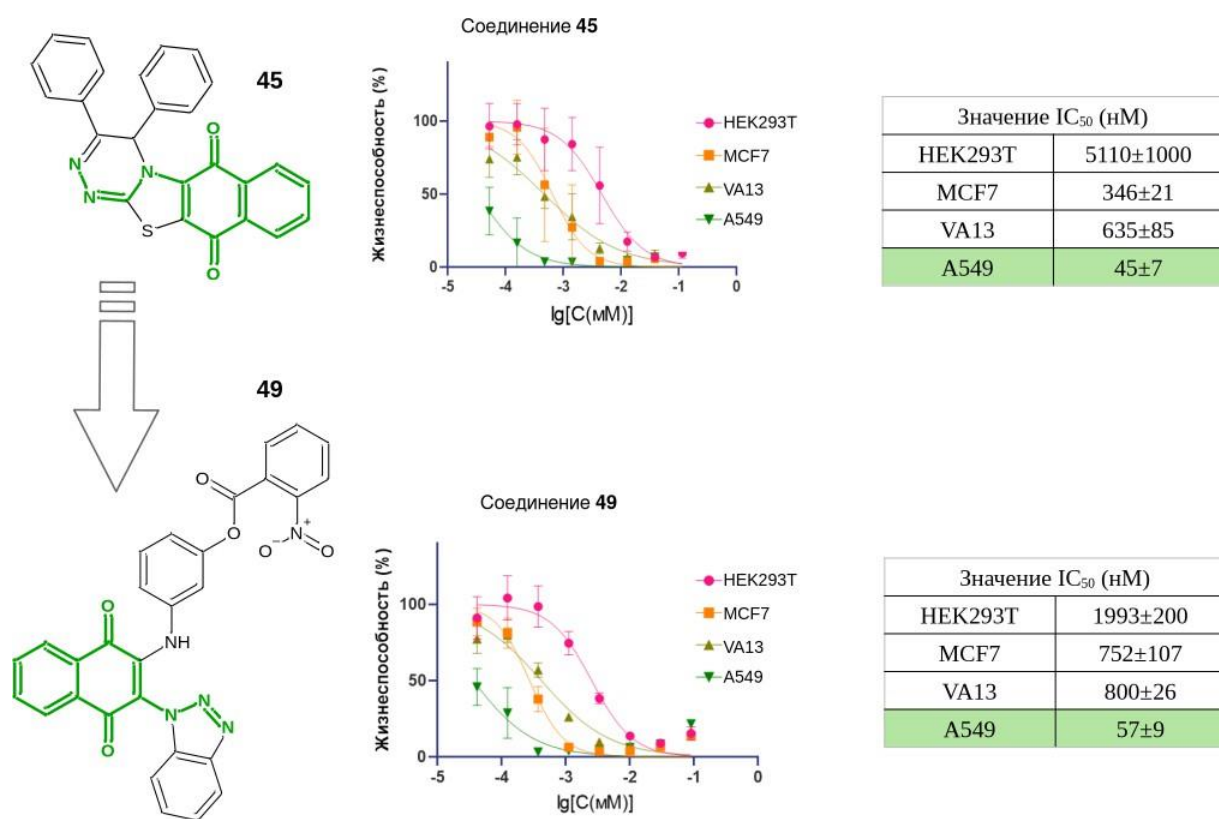


Рисунок 16. Цитотоксическое действие соединений-лидеров **45** и **49** в монокультурах клеточных линий. Наибольшая цитотоксичность проявляется для линии рака легкого — A549 и составляет порядка 50 нМ. При этом токсичность для неопухолевых клеток HEK293T и VA13 выражена значительно слабее.

Таким образом, только соединение **49** показало сопоставимую с исходным веществом **45** избирательность действия и токсичность в наномолярном диапазоне, при этом профиль цитотоксичности этих веществ в МТТ практически совпадает (Рисунок 15). Для получения большего количества данных относительно спектра действия соединений был проведен МТТ-тест на двенадцати клеточных линиях различной этиологии (Таблица 11).

Таблица 11. Анализ цитотоксичности соединений **45** и **49** на двенадцати клеточных линиях различной этиологии.

Клеточная линия	IC ₅₀ , соединение 45 (мкМ)	IC ₅₀ , соединение 49 (мкМ)	IC ₅₀ , доксорубицин (нМ)
HEPG2	3,5±0,5	1,9±0,10.	1,2±0,5
U87	1,4±0,2	0,64±0,05	0,6±0,2
A549	0,045±0,007	0,046±0,009	4,0±0,5
MDA_MB231	0,54±0,07	2,1±0,2	0,4±0,1
HEK293T	2,1±0,4	1,5±0,2	0,13±0,03
PC3	2,1±0,7	0,07±0,01	0,9±0,2
HCT116	1,5±0,1	0,16±0,02	0,5±0,2
22RV1	11±1	2,3±0,6	0,36±0,08
Va13	0,64±0,09	0,64±0,05	1,09±0,33
MCF7	0,93±0,03	0,61±0,1	1,5±0,6
Panc1	2,8±0,5	1,8±0,4	2,3±0,5
Bt474	2,6±0,5	1,5±0,2	1,0±0,2

Соединения **45** и **49** продемонстрировали наибольшую токсичность к клеткам рака легкого A549. Клетки рака толстого кишечника HCT116 и глиобластомы U87 также оказались чувствительны к исследуемым соединениям, но значение IC₅₀ для этих линий было выше, чем для A549 (Таблица 11).

Таким образом, в результате проведенных скрининговых исследований были обнаружены два производных 1,4-нафтохинона **45** и **49**, демонстрирующие избирательную цитотоксичность к линии рака легкого A549 в наномолярном диапазоне. Далее были проведены исследования, направленные на поиск механизма действия данных веществ.

3.4.3 Механизмы действия соединений-лидеров **45** и **49**

3.4.3.1 Остановка клеточного цикла и индукция позднего апоптоза/некроза

Для более детальной оценки влияния соединений **45** и **49** на клетки A549 была проведена проверка их влияния на клеточный цикл и клеточную гибель методом проточной цитометрии

(Рисунок 17). Клетки были окрашены растворами пропидия йодида и/или аннексина V, получаемый флуоресцентный сигнал был соотнесен с фазой клеточного цикла или с состоянием жизнеспособности клетки.

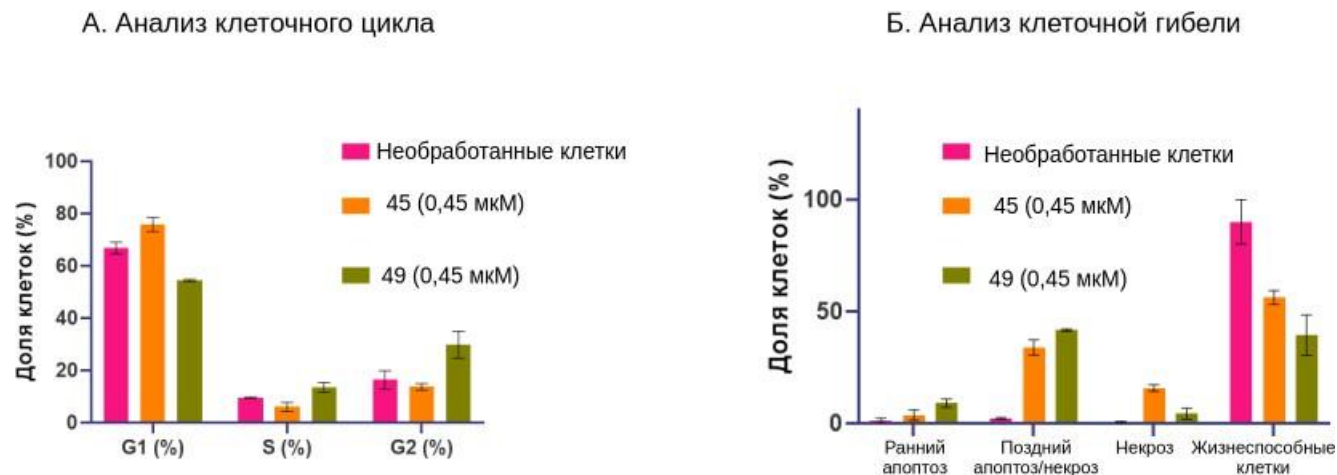


Рисунок 17. Анализ клеточного цикла и клеточной гибели клеток A549. А. Обработка клеток A549 соединениями 45 и 49 приводит к небольшим изменениям распределения клеток по фазам клеточного цикла. Соединение 45 вызывает накопление в фазе G1, в то время как соединение 49 приводит к накоплению клеток в G2/M фазе. Б. Соединения 45 и 49, в основном, индуцируют поздний апоптоз/некроз.

Полученные результаты указывают на несущественное влияние соединений 45 и 49 на клеточный цикл. Достоверных изменений в соотношении фаз клеточного цикла при обработке клеток A549 соединениями по сравнению с необработанными контрольными клетками не наблюдалось. Тем не менее, была зафиксирована тенденция к накоплению клеток в фазе G1/S для соединения 45 и в фазе G2/M для соединения 49. В экспериментах по оценке клеточной гибели оба исследуемых соединения индуцируют поздний апоптоз/некроз (Рисунок 17, Рисунок 1 в Приложении).

3.4.3.2 Транскриптомный анализ: изменение транскрипции генов, ассоциированных со стрессом ЭПР

Для получения большего количества данных о влиянии соединений 45 и 49 на клетки рака легкого (A549) был проведен транскриптомный анализ (секвенирование было выполнено ООО

«Секвенцию»). В качестве материала для проведения секвенирования была выделена тотальная РНК клеток A549, обработанных исследуемыми соединениями, в качестве контроля были использованы необработанные клетки. При обработке исследуемыми соединениями в клетке изменяется профиль экспрессии генов, характерных для стресса эндоплазматического ретикулума.

3.4.3.3 Индукция стресса эндоплазматического ретикулума

Согласно данным, полученным при анализе транскриптома, соединения **45** и **49** индуцируют стресс ЭПР. Для экспериментального подтверждения данного эффекта методом ОТ-ПЦР в реальном времени (q-RT-PCR) был проанализирован уровень таких маркеров стресса ЭПР как XBP1s и ATF4, а также методом вестерн-блоттинга был оценен уровень фосфорилирования белка eIF2 α . В качестве контрольного соединения были использованы туникамицин (известный индуктор стресса ЭПР) и DTT (для индукции стресса ЭПР при неправильной свертке белков; соединение нарушает структуру дисульфидных связей).

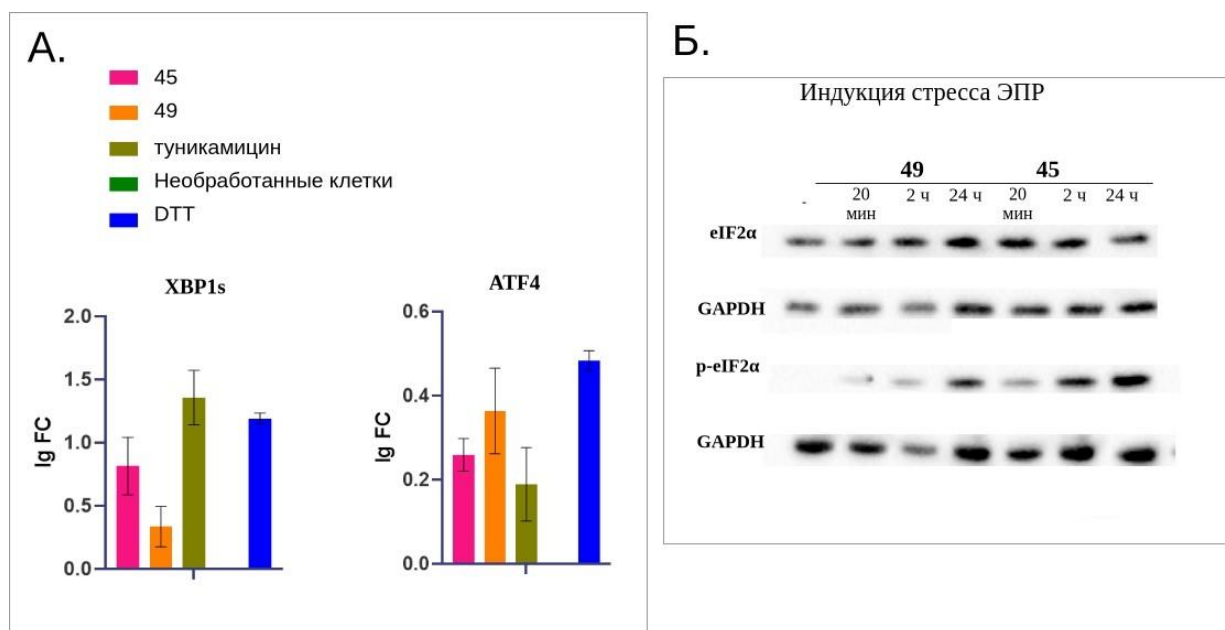


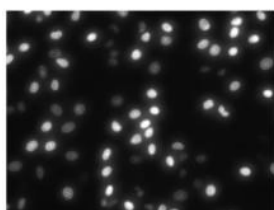
Рисунок 18. Анализ индукции стресса ЭПР соединениями **45** и **49**. А. Оценка изменения уровня сплайсированной формы XBP1s и уровня экспрессии ATF4 методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Соединения **45** и **49** не вызывают накопление сплайсированной формы XBP1s в той же мере, что и контрольные соединения (туникамицин и DTT). Соединение **49** вызывает увеличение экспрессии ATF4, сопоставимое с контрольными препаратами, что соответствует индукции стресса ЭПР. Б. Оценка изменения уровня фосфорилированной формы eIF2α. Наибольший уровень достигается при инкубации клеток с соединениями в течение 24 часов. Для соединения **45** эффект заметен уже при 20-минутной обработке.

Вещества **45** и **49** не вызвали накопление сплайсированной формы XBP1s в той же мере, что и контрольные соединения (DTT и туникамицин). Производное **49** повышало экспрессию ATF4 сопоставимо с DTT, и в то же время для обоих соединений методом вестерн-блоттинга было выявлено отчетливое повышение уровня фосфорилированной формы белка eIF2α. Наиболее сильный сигнал достигается за 24 часа, но видимые изменения регистрируются и за более короткие времена инкубации – за 2 часа и за 20 минут (Рисунок 18).

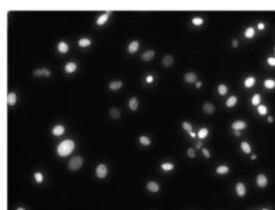
3.4.3.4 Интеркаляция и ингибирование синтеза ДНК *in vitro*

Способность хинонов к интеркаляции в ДНК широко описана в литературе (рассмотрено в пункте 1.4.1 обзора литературы), в связи с чем данная активность была изучена и для соединений **45** и **49**. Исследование проводили методом вытеснения бромистого этидия, используя акридин-9-амин в качестве положительного контроля. Также оценивали влияние соединений на синтез ДНК *de novo* по включению модифицированного основания в новосинтезированную ДНК с последующей реакцией клик-химии с флуорофором и количественным анализом полученных микроскопических изображений. Соединение **45** продемонстрировало более выраженный эффект в обоих экспериментах. Эти данные закономерно коррелируют между собой: вероятно, эффективная интеркаляция молекул **45** создает стерические препятствия для процесса репликации. В то же время соединение **49** не продемонстрировало значимых интеркалирующих свойств и не вызвало ингибирования синтеза ДНК (Рисунок 19).

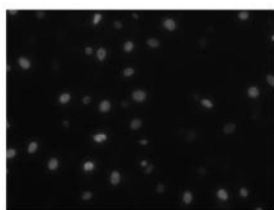
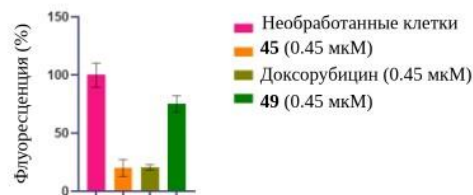
А. *In vitro* ингибирование биосинтеза ДНК



А549, инкубированные с 100 мкМ EdU и окрашенные SY5



А549, инкубированные с 100 мкМ EdU и 0,45 мкМ соединения **49**, окрашенные SY5



А549, инкубированные с 100 мкМ EdU и 0,45 мкМ соединения **45**, окрашенные SY5



А549, инкубированные с 100 мкМ EdU и 0,45 мкМ доксорубином, окрашенные SY5

Б. *In vitro* интеркаляция в ДНК

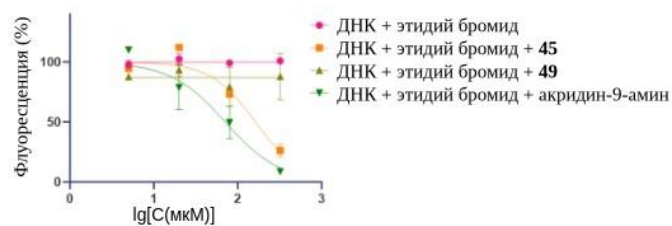


Рисунок 19. Интеркаляция в ДНК и ингибирование репликации. А. Изображения клеток А549, обработанных соединениями **45** и **49**, и инкубированные с модифицированным нуклеотидом (EdU) в течение 24 часов. После инкубации клетки были окрашены с помощью клик-присоединения флуорофора к EdU. Снижение интенсивности флуоресценции соответствует снижению включения EdU в новосинтезированную ДНК, что свидетельствует об ингибировании репликации соединением **45**. Для соединения **49** снижение флуоресценции не наблюдалось. Б. Анализ интеркаляции соединений **45** и **49** в ДНК. При интеркаляции соединений и вытеснении бромистого этидия наблюдается снижение интенсивности флуоресцентного сигнала. Соединение **45** показало сопоставимую с положительным контролем активность, в то время как для соединения **49** снижение флуоресценции не было зафиксировано.

Таким образом, можно сделать вывод, что структурный переход от соединения **45** к **49** приводит к утрате способности молекул взаимодействовать с ДНК.

3.4.3.5 Нарушение мембранного потенциала митохондрий

Ранее полученные нашей группой данные [180, 181] указывают на то, что селективная токсичность исследуемых соединений в отношении линии A549 может быть обусловлена способностью молекул нарушать мембранный потенциал митохондрий. Также такой молекулярный механизм действия описан в литературе для производных нафтохинонов.

Для соединений **45** и **49** способность вызывать деполяризацию мембраны митохондрий была проверена экспериментально. Клетки A549 были инкубированы с исследуемыми соединениями, после чего окрашивались катионным карбоцианиновым красителем JC1. Данный краситель способен изменять флуоресценцию с красной на зеленую при деполяризации митохондриальных мембран; таким образом, соотношение сигналов в этих каналах напрямую отражает функциональное состояние органелл. Оба исследуемых соединения индуцируют менее выраженное снижение мембранного потенциала по сравнению с контрольным соединением C10TPP (Рисунок 20). Важно отметить, что данный эффект регистрируется уже через 20 минут инкубации с соединениями **45** и **49**. Такой короткий временной интервал позволяет обоснованно предположить отсутствие влияния неспецифических факторов, таких как, например, вторичные эффекты, вызванные активно протекающим апоптозом [182].

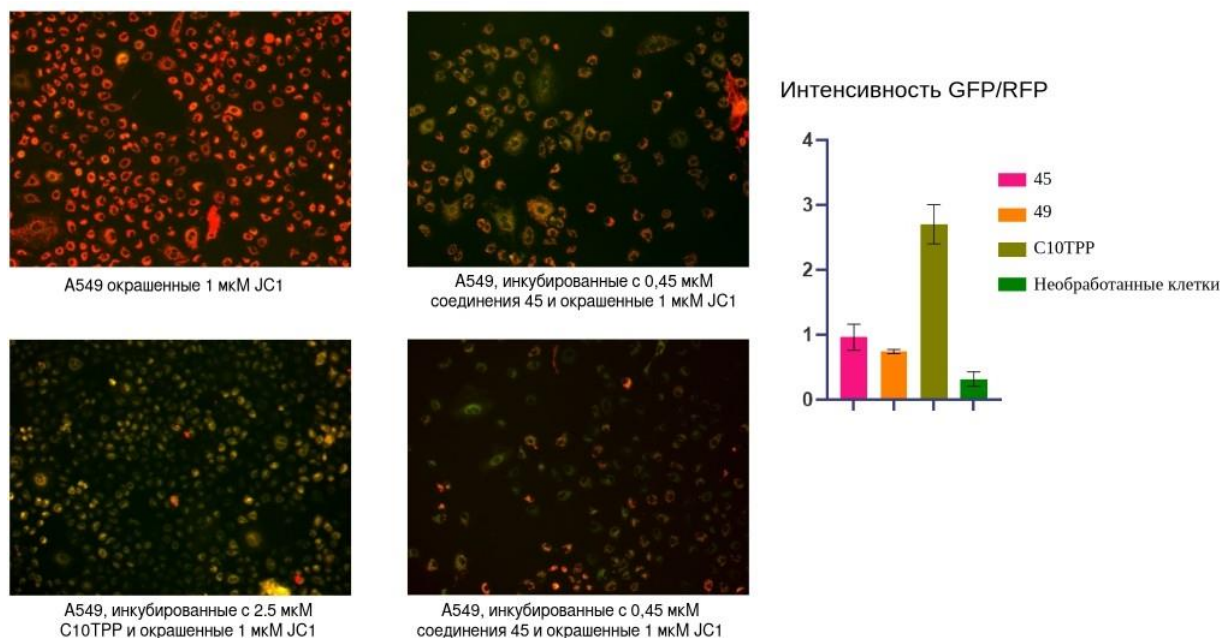


Рисунок 20. Оценка нарушения мембранного потенциала митохондрий соединениями 45 и 49. При снижении мембранного потенциала митохондрий происходит изменение флуоресцентного сигнала с красного на зеленый. При обработке клеток A549 соединениями 45 и 49 наблюдается частичное накопление зеленого флуоресцентного сигнала.

3.4.3.6 Индукция окислительного стресса

Биологический эффект производных нафтохинона во многом предопределен их структурой, которая способствует генерации и последующему накоплению активных форм кислорода. Этот процесс может быть первопричиной, обуславливающей наблюдаемые эффекты на клеточных линиях: избыток АФК провоцирует стресс эндоплазматического ретикулума и вызывает падение мембранного потенциала митохондрий.

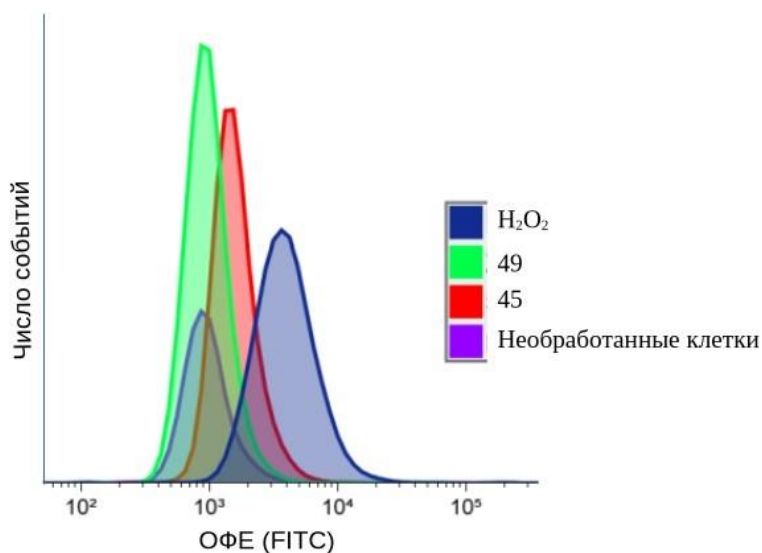


Рисунок 21: Генерация АФК соединениями 45 и 49. Наблюдаемые эффекты для соединений 45 и 49 менее выражены, чем у контрольного вещества

Тем не менее, за 60 минут инкубации с изучаемым соединением 49 генерация активных форм кислорода не была детектирована. При обработке клеток соединением 45 наблюдалось смещение пика флуоресценции, но эффект был менее выраженным, относительно положительного контроля (Рисунок 21).

3.4.3.7 Сравнительный анализ механизмов действия соединений-лидеров 45 и 49

На основании всех полученных результатов была составлена сравнительная таблица, суммирующая полученную информацию о механизмах действия соединений 45 и 49.

Таблица 12. Анализ механизмов действия соединений 45 и 49; (“+” - величина наблюдаемого эффекта сопоставима с положительным контролем; “±” - эффект наблюдается, но не достигает сопоставимых с положительным контролем значений; “-” - нет эффекта).

Наблюдаемые эффекты		45	49
Индукция клеточной гибели		Индукция некроза	Индукция апоптоза/некроза
Влияние на клеточный цикл		Накопление клеток в G1-фазе	Накопление клеток в G2-фазе
Интеркаляция в ДНК		+	-
Ингибирование биосинтеза ДНК <i>in vitro</i>		+	-
Изменение мембранного потенциала митохондрий		±	±
Индукция стресса ЭПР	ATF4	±	±
	XBP1S	±	-

	p-eIF2 α (за 20 минут)	±	±
	p-eIF2 α (за 2 часа)	±	±
	p-eIF2 α (за 24 часа)	+	+
Индукция АФК		±	-

Несмотря на значительное сходство в цитотоксическом профиле и практически идентичные значения IC₅₀ на линии A549, исследуемые соединения отличаются по механизмам действия.

Наша основная гипотеза предполагает наличие общей мишени, идентификация которой затруднена из-за вероятной мультитаргетности данных агентов. Для соединения-лидера **49** не наблюдается интеркаляция в ДНК и подавление её синтеза *in vitro*. Кроме того, в сравнении с **45**, данное вещество оказывает менее выраженное влияние на мембранный потенциал митохондрий и в меньшей степени провоцирует генерацию активных форм кислорода.

На основании этих выводов, соединение **49** было выбрано для дальнейших исследований противоопухолевой активности *in vivo*.

3.4.4 Противоопухолевая активность соединения-лидера **49** в модели привитой опухоли

Для подготовки растворимой формы, пригодной для парентерального введения, **49** был растворен в ДМСО до финальной концентрации 67 г/л. Далее, непосредственно перед введением, в раствор добавлялся коллифор (до финальной концентрации 15%) и физиологический раствор для доведения до необходимого объема.

Данные экспериментов *in vivo* были предоставлены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Была исследована переносимость соединения **49** *in vivo*. После однократного введения вещества в дозировках 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг и 32 мг/кг иммунодефицитным мышам BALB/c Nude токсический эффект не наблюдался.

Было принято решение об анализе противоопухолевой активности вещества **49** при многократном внутривенном введении иммунодефицитным мышам BALB/c Nude на модели подкожных ксенографтов с использованием клеточной линии рака легких человека A549. Исследовались те же действующие концентрации, что и в экспериментах на переносимость (5 мг/кг; 10 мг/кг; 20 мг/кг). Препарат показал эффективность в выбранных дозах и режимах

введения. В дозе 20 мг/кг соединение **49** показало высокую эффективность - торможение роста опухоли составило 68 % ($V_{cp} = 610,6 \pm 116,2 \text{ мм}^3$ против $1905,3 \pm 174,7 \text{ мм}^3$ в контроле) (Таблица 4 и 5 в Приложении; Рисунок 22).

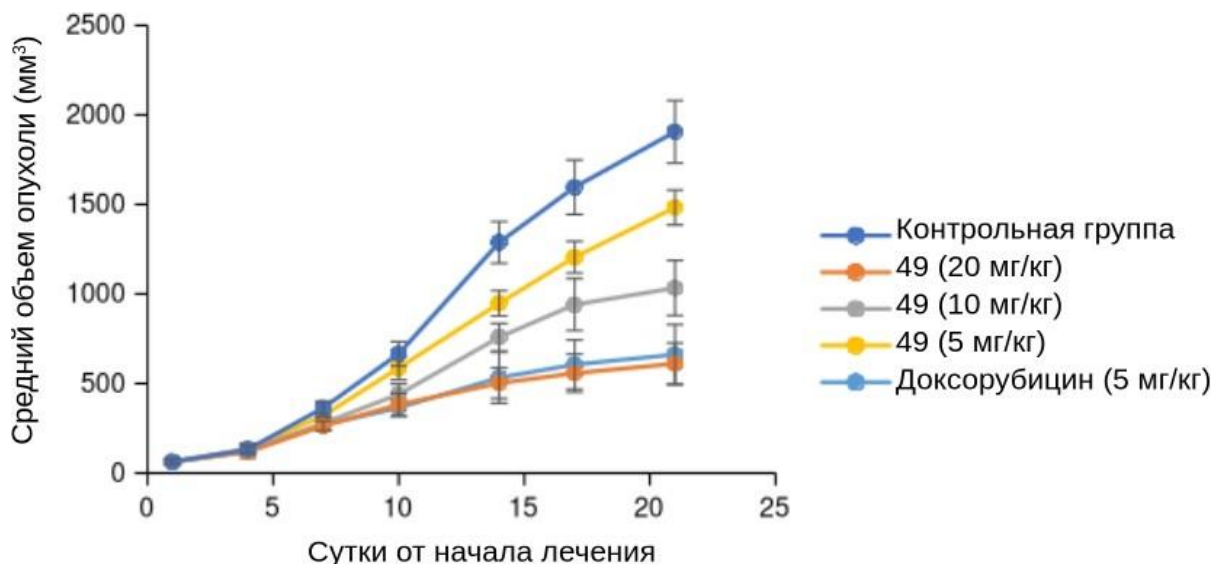


Рисунок 22. Изменение среднего объема привитой опухоли (клетки A549) при лечении соединением **49**.

Соединение **49** продемонстрировало выраженную противоопухолевую активность, сопоставимую по эффективности с препаратом сравнения доксорубицином. Несмотря на отсутствие полной регрессии новообразования и абсолютного ингибирования его роста, полученные результаты могут быть рассмотрены как положительные и перспективные для дальнейшей разработки.

3.5 Производные пирроло[1,2 α]хиноксалина

В предыдущих исследованиях нашей лаборатории было найдено соединение **48**, избирательно действующее на опухолевые клетки в низком наномолярном диапазоне [183]. В рамках данной работы были продолжены исследования противоопухолевой активности и структурной оптимизации производных данного класса соединений.

Для валидации фармакофорного фрагмента производных бензоил-пирроло[1,2- α]хиноксалина был проведен скрининг в сокультурах клеточных линий (Таблица 13); полные данные обо всех исследованных соединениях представлены в Таблице 1.1 в Приложении. Соединения, продемонстрировавшие наибольшую избирательность действия, были далее исследованы в монокультурах клеточных линий (Таблица 13). Нами были исследованы как соединения из коллекции IBScreen, так и синтезированные коллегами (группа Г.Л. Каретникова и Д.А. Гука, НИЛ элементоорганических соединений, химический факультет МГУ).

Таблица 13. Цитотоксичность производных пирроло[1,2 α]хиноксалина в монокультурах и сокультурах клеточных линий.

ID	Рейтинг селективности (SR), FCST		Цитотоксичность, IC ₅₀ (мкМ), МТТ				SAR	
	A549' EGFP VA13_Kat	MCF7' EGFP MCF10A_Kat	MCF7	A549	VA13	HEK293T	Профиль цитотоксичности схож с CA4	Цитотоксичность для линии VA13 ниже, чем для остальных
50-1	1.5	1.5	0.015±0.002	0.017±0.001	0.09±0.01	0.012±0.001	+	+
50	2.5	1	41±3	>100	>100	28±2	+	+
51	3	3.5	0.023±0.006	0.018±0.001	0.01±0.007	0.013±0.003	+	+
52	1.5	1.5	0.026±0.003	0.063±0.008	0.045±0.004	0.070±0.004	+	+
48	2	0.5	0.025±0.006	0.004±0.0005	0.01±0.001	0.019±0.003	+	+
54	2	1	1.3±0.2	3.4±0.8	2±0.2	1.5±0.1	-	-
55	1	0.5	0.95±0.047	1.21±0.05	≈1.5	0.64±0.01	+	+
56	2	0.5	0.8±0.3	8.3±1.8	16±4.4	0.5±0.2	-	+
57	1	0	9.2±1.8	6.8±0.6	12.6±1.5	5.6±0.2	-	-
58	3	0	>148	>148	>148	9.7±0.9	-	na
59	2	0	>141	>141	>143	9.8±0.8	-	na
60	1	0	>117	>117	>117	≈117	-	-
61	1	1	≈191	18.4±1.1	≈191	11.5±0.4	na	-
62	1.5	1.5	171.1±9.2	180.3±9.2	175.7±9.2	67±1.4	-	-
63	2.5	0	≈48	>100	>100	≈60	+	+
64	1.5	0	0.5±0.3	1.9±0.3	8.2±1.5	6.6±6.4	+	+
65	1	0.5	10.6±0.4	12.7±0.2	10.8±0.6	9.5±0.4	+	+
66	1.5	1	>87	>87	>87	>87	-	-

Дибромпроизводное прототипа, **51**, оказалось наиболее селективным по данным FCST и цитотоксичным по результатам МТТ-теста. Также селективность в FCST модели рака легкого

проявили соединение **50**, токсичность которого наблюдалась только при высоких концентрациях, а также **50-1** и **52**, чьи свойства схожи с прототипом. При высоких концентрациях для данных соединений наблюдалась значительная разница в жизнеспособности между медленно растущими клетками VA13 и быстро делящимися клетками (Рисунок 23). Это согласуется с селективностью, продемонстрированной при совместном культивировании клеток A549 и VA13.

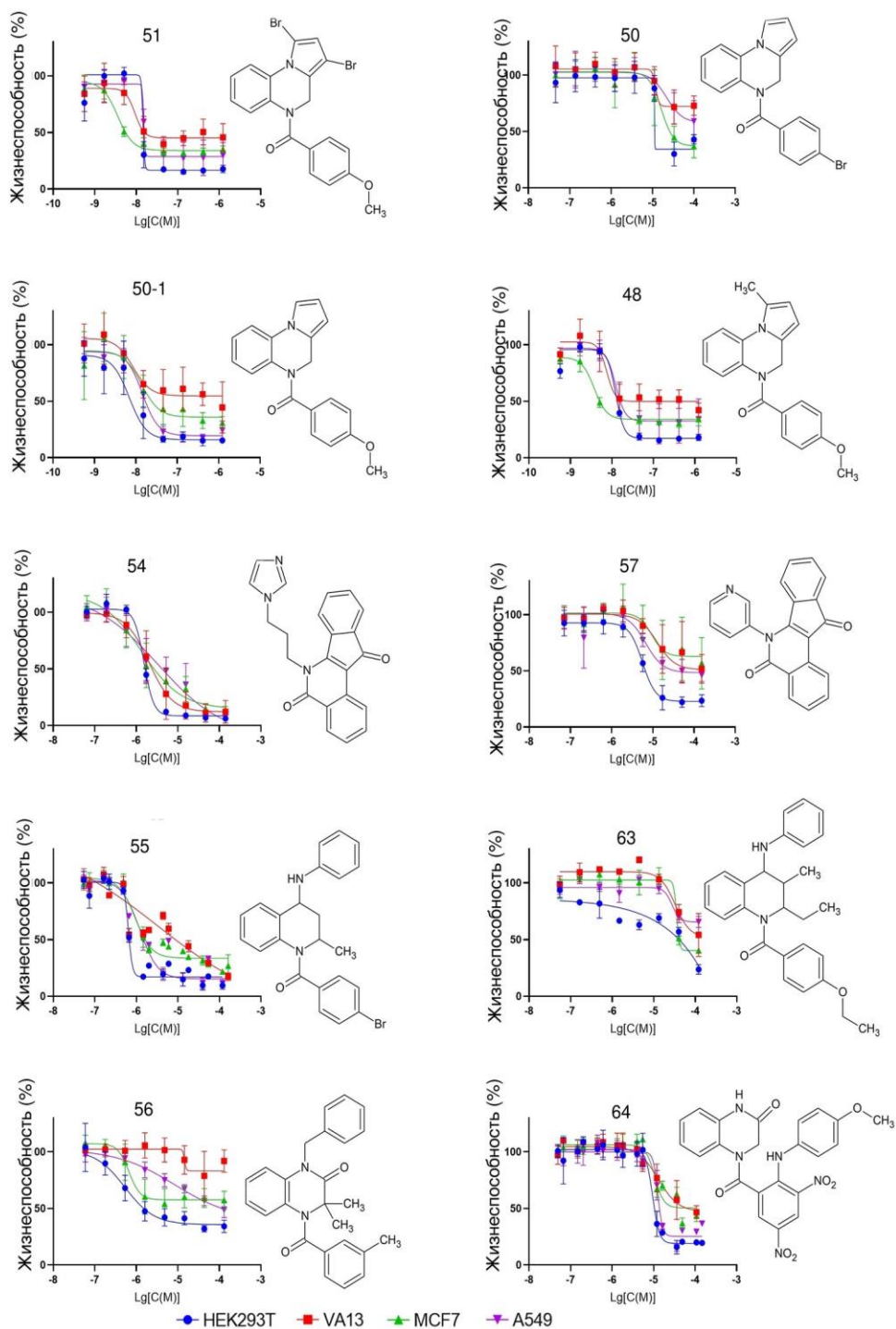


Рисунок 23. Цитотоксичность производных пирроло[1,2a]хиноксалина в МТТ тесте

По результатам проведенных скрининговых исследований нами были сделаны первичные выводы относительно структурной оптимизации данного класса. Селективно цитотоксичные

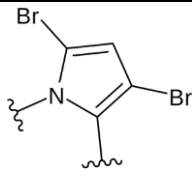
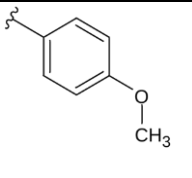
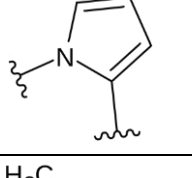
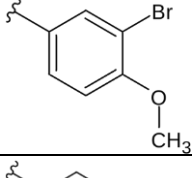
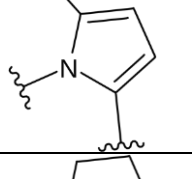
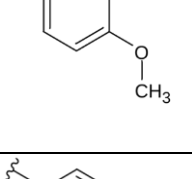
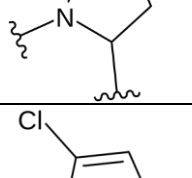
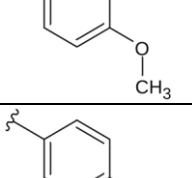
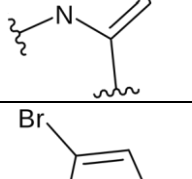
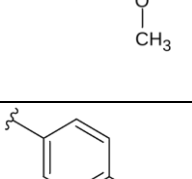
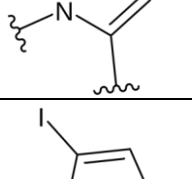
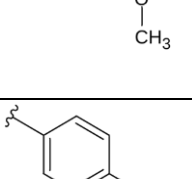
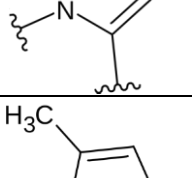
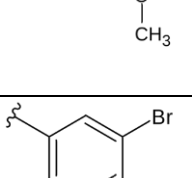
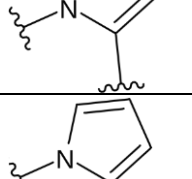
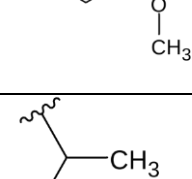
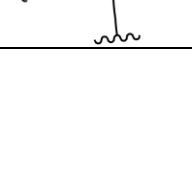
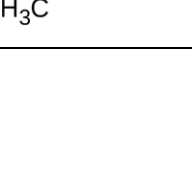
соединения содержат арильные фрагменты, соединенные амидной связью. Дальнейшие исследования были направлены на модификацию структуры именно данных соединений.


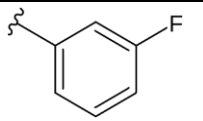
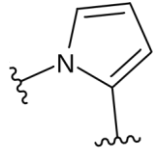
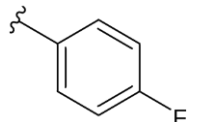
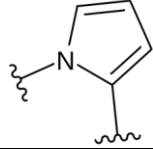
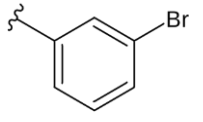
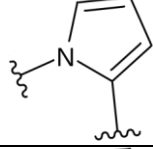
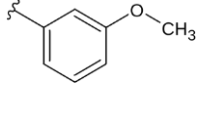
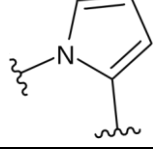
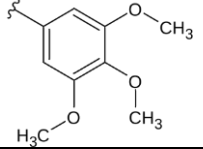
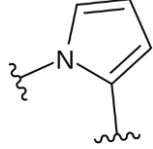
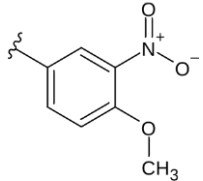

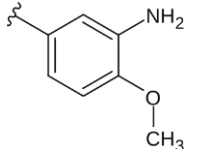

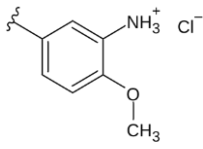
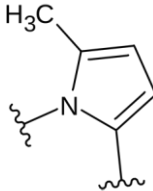
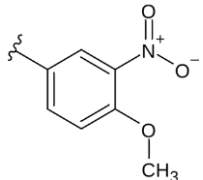
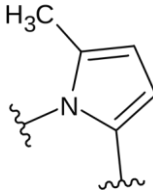
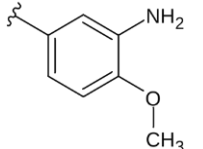
3.5.1 Анализ закономерностей структура-активность производных пирроло[1,2*α*]хиноксалина.


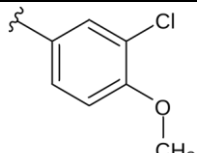
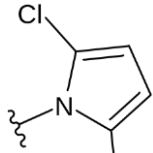
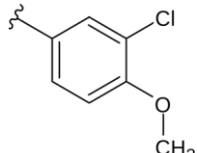
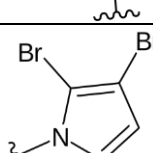
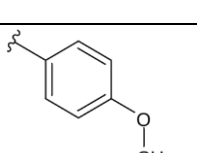
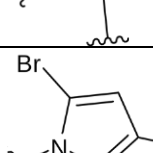
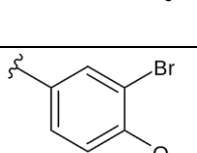
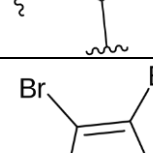
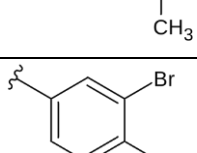
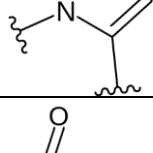
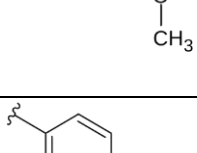
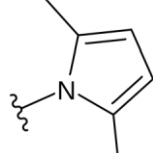
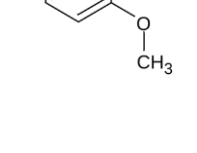
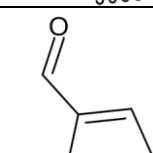
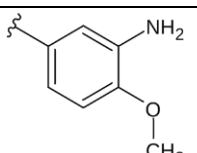
Далее была собрана новая библиотека химических соединений, которые являлись структурными производными фармакофора, выделенного в пункте 3.5. Мы варьировали функциональные группы в пиррольном и фенильном радикалах (Таблица 14), делая из полученных данных выводы о зависимости структура-активность и выбирая наиболее оптимальные заместители. Цитотоксичность исследованных соединений была оценена методом МТТ.

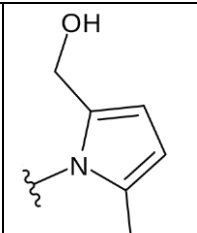
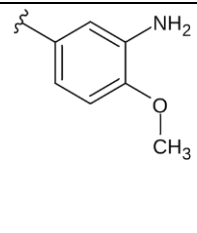
Таблица 14. Цитотоксичность структурных производных пирроло[1,2*α*]хиноксалина; структурные производные фармакофора, выделенного в пункте 3.5.

Общая структура соединений 66-96						
Цитотоксичность, IC ₅₀ (нМ)						
Соединение	Фрагмент 1	Фрагмент 2	MCF7	A549	VA13	HEK293T
66		none	>1000	>1000	>1000	>1000
49			15±2	17±1	>100	12±1
50			>1000	>1000	>1000	>1000

51			23±6	18±1	10±1	13±3
52			26±3	63±8	45±4	70±4
71			25±6	4,0±0,5	10±1	19±3
72			>1000	>1000	>1000	>1000
73			34±4	>100	46±4	51±3
74			21±3	80±10	46±4	45±3
75			32±4	>100	54±4	58±4
76			32±4	42±5	23±3	45±6
84			>1000	>1000	>1000	>1000

78			>1000	>1000	>1000	>1000
79			>1000	>1000	>1000	>1000
80			>1000	>1000	>1000	>1000
81			>1000	>1000	>1000	>1000
82			>1000	>1000	>1000	>1000
83			40±5	84±7	16±2	61±8
77			2,0±0,7	4±1	21±3	4±1
77 (гидро хлорид)			2,0±0,4	1,2±0,5	51±20	20,0±0,3
86			37±4	49±7	20±2	41±5
87			22±2	2,0±0,5	33±3	4±0,1

88			>100	>100	>100	>100
89			>100	>100	>100	>100
90			59±7	120±10	78±9	>100
91			55±6	>100	>100	>100
92			>100	>100	>100	>100
93			26±4	19±2	27±8	31±5
94			30±6	17±3	>100	20±2
95			32±4	16±4	29±3	18±2

96			13±3	14±2	>100	30,0±0,3
----	---	---	------	------	------	----------

Отсутствие метильной группы в пиррольном фрагменте в соединении **66** привело к снижению клеточной токсичности, хотя профиль цитотоксичности остался схожим с таковым у прототипа **48**. Замена этой метильной группы на галогены (-Cl в **73**, -Br в **74**, -I в **75**) также способствовала снижению цитотоксичности. Лишь одновременное введение двух атомов брома (-Br) в пиррольное кольцо позволило сохранить цитотоксичность соединения **51** и привело к повышению его селективности. Однако данное соединение оказалось нестабильным при хранении и подвергалось деградации вследствие отщепления брома. Интересно отметить, что для мета-бром- или мета-аминобензоилпирроло[1,2- α]хиноксалинов (**52** в сравнении с **76**, и **77** в сравнении с **87**) наличие метильной группы в пиррольном кольце не имело существенного значения (Таблица 14).

Наличие пара-метоксигруппы в фенильном кольце имеет критическое значение для сохранения цитотоксичности, что согласуется с ранее выявленной тенденцией [183]. Значимость фенильного фрагмента подтверждается потерей активности у соединений **84** и **66**, в которых фенильная группа была заменена на изопропильную или полностью удалена, соответственно (Таблица 14). Перемещение метоксигруппы в мета-положение в соединении **81** привело к полному исчезновению цитотоксичности. Таким образом, присутствие пара-метоксигруппы в бензоильном фрагменте является определяющим фактором для обеспечения селективности и цитотоксичности данных соединений (Таблица 14).

Замена аминогруппы на атомы хлора или брома, а также создание небольшого стерического затруднения в пиррольном кольце (за счет введения Cl, Br или I) привели к снижению цитотоксичности соединений **52**, **75**, **76**, **88**, **89**, **90**, **91** и **92** и не способствовали повышению их селективности.

Также были изучены предполагаемые метаболиты соединений, содержащих пиррольный цикл или метилпиррольную группу. Было установлено, что как альдегидные (**93**, **94**), так и гидроксильные (**95**, **96**) производные в метоксипиррольном фрагменте проявляют клеточные эффекты, аналогичные эффектам бензоил-пирроло[1,2- α]хиноксалинов, не имеющих метильной группы.

Соединения **83** и **86** (предполагаемые метаболические предшественники соединений **77** и **87** соответственно), содержащие нитрогруппу вместо аминогруппы в бензоильном фрагменте, также уступали по своим свойствам исходным аминокзамещенным молекулам **77** и **87**. Соединения **77** и **87** были выбраны как лидеры в данном структурном классе. Исследования механизма действия и противоопухолевой активности далее были проведены с производным **77**, так как он несколько меньше по своему размеру и молекулярной массе.

3.5.2 Ингибирование полимеризации тубулина *in vitro* и *in vivo* соединением-лидером **77**

На основании данных анализа цитотоксичности, полученных во втором раунде оптимизации структуры фармакофора, была выдвинута гипотеза о том, что молекулярным механизмом действия соединений является ингибирование полимеризации тубулина. Данное предположение основывалось на характерной форме зависимости (плато на большом диапазоне концентраций) на графике цитотоксичности: она указывала на выраженный цитостатический эффект, сопоставимый с действием известного ингибитора полимеризации тубулина – SA4-P. Кроме того, цитотоксичность исследуемых соединений напрямую коррелировала со скоростью пролиферации клеточных линий (Рисунок 24). Соединение **77** вызывало остановку клеточного цикла в фазе G2/M, что также согласуется с гипотезой об ингибировании полимеризации тубулина и нарушении процесса деления клеток. Для проверки этих предположений коллегами были проведены исследования *in silico* (молекулярный докинг проведен Г.Л. Каретниковым, моделирование взаимодействия с мишенью с помощью модели BOLTZ-2 проведено А.К. Глушковым). Результаты вычислений также позволяли с высокой долей вероятности предполагать, что соединение-лидер **77** действительно является ингибитором полимеризации тубулина.

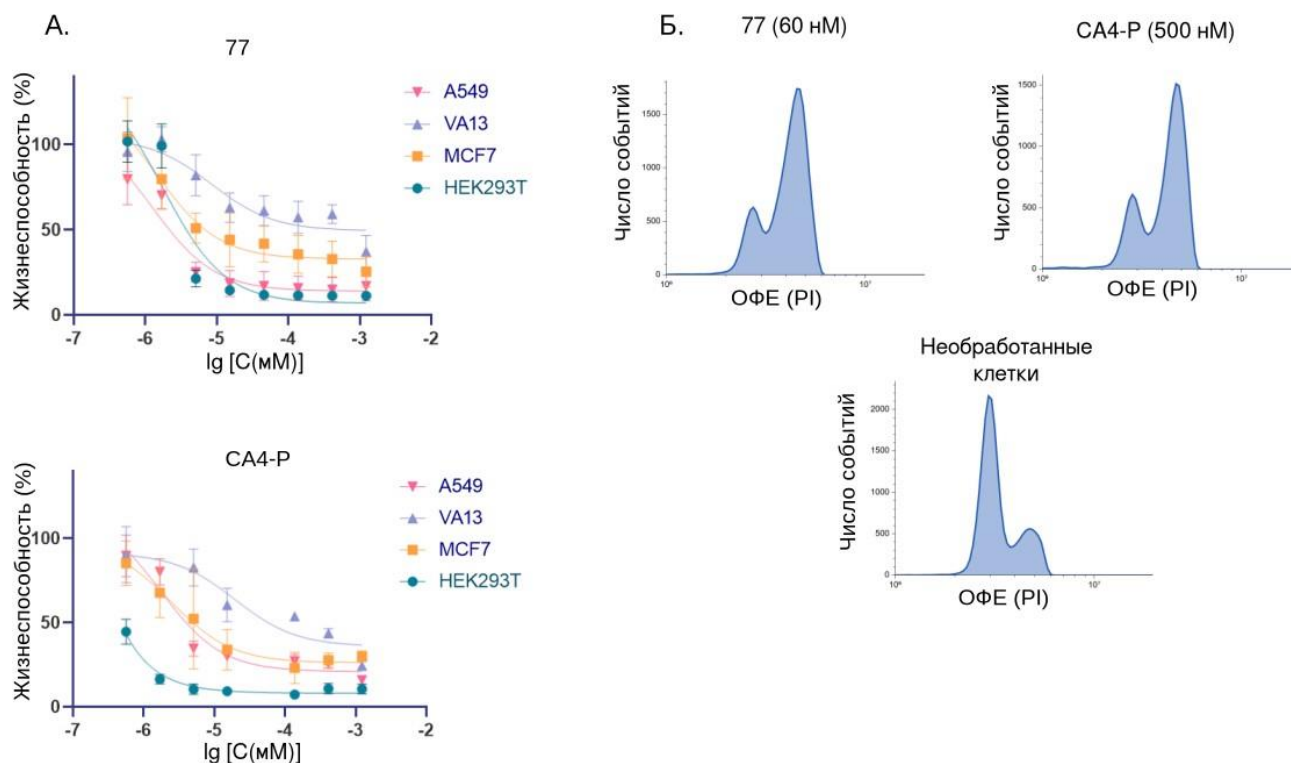


Рисунок 24. Основания для гипотезы об ингибировании полимеризации тубулина соединением 77. А. Сравнение форм кривых зависимостей жизнеспособности клеток при их обработке веществами 77 и СА4-Р. При обработке обоими соединениями наблюдается характерное плато. Б. Анализ клеточного цикла клеток А549 при обработке соединениями 77 и СА4-Р. Наблюдается накопление клеток в G2/М фазе.

Влияние соединения 77 на полимеризацию тубулина было экспериментально проверено в моделях *in vitro*. В тесте с использованием очищенного тубулина соединение 77 эффективно ингибировало его полимеризацию (данные приведены на Рисунке 2 в Приложении). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток линии А549, обработанных этим веществом, выявило деполимеризацию тубулина, характеризующуюся отсутствием четкой структуры микротрубочек (Рисунок 25). Данные структурные изменения аналогичны эффектам, наблюдаемым при воздействии

комбретастина А4 (СА4), что подтверждает идентичность их механизма действия.

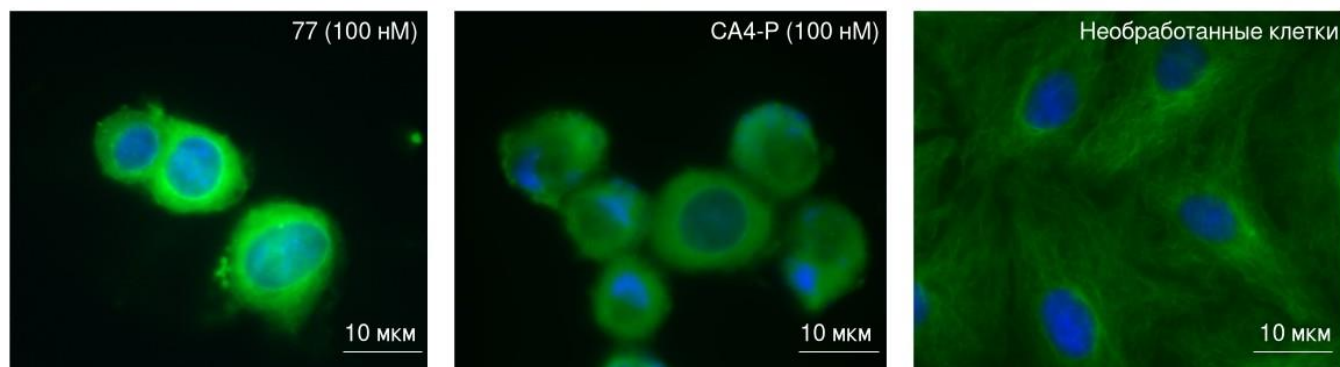


Рисунок 25: Клетки А549, обработанные соединением 77, СА4-Р и контрольная популяция. В контроле визуализируется четкая структура цитоскелета, нарушенная при обработке клеток соединениями 77 и СА4-Р.

3.5.3 Противоопухолевая активность соединения-лидера 77 в моделях мышинных лейкозов и привитых опухолей

Для приготовления раствора для внутривенного введения соединение 77 было растворено в 96% этиловом спирте. В готовой форме для парентерального введения, как вспомогательное средство для повышения растворимости, был введен коллифор (до финальной концентрации 10%). Концентрация этанола в итоговой формуляции также составляла 10%. Данные экспериментов *in vivo* были предоставлены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

Таблица 15. Увеличение продолжительности жизни мышей в модели перевиваемых лейкозов при лечении соединением 77 и СА4-Р. *Т – продолжительность жизни в группе животных, которым вводили соединение. С – продолжительность жизни в группе животных без лечения.

Модель	Группа	Условия лечения		Исследуемые параметры	
		доза (мг/кг)/интервал (часы) x количество инъекций		Средняя продолжительность жизни (дни)	T/C*
L1210	0,9% NaCl	-		8,1±0,2	-
	77	10/24 x 5		24,7±2,4	304,9
	77	5/24 x 5		13,4±1,1	165,4
	СА-4-Р	10/24 x 5		15,0±1,7	185,1
P388	0,9% NaCl	-		11,2±0,3	276,7
	77	10/24 x 5		31,0±7,3	156,2
	77	5/24 x 5		17,5±2,8	166,9
	СА-4-Р	10/24 x 5		18,7±3,1	276,7

На моделях перевиваемых лейкозов (Таблица 15) и привитых опухолях (Рисунок 26) соединение 77 показало эффекты, превосходящие контрольный препарат СА4-Р.

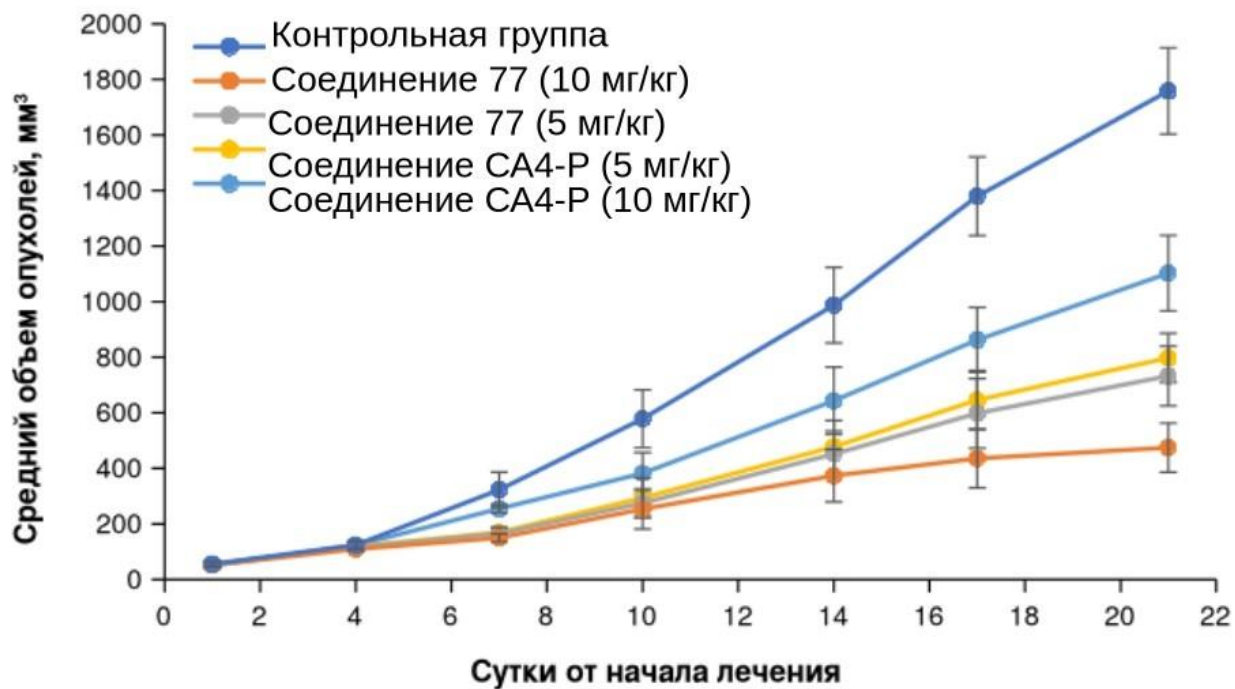


Рисунок 26. Изменение среднего объема привитой опухоли (HCT116) при лечении 77 в дозировках 5 мг/кг и 10 мг/кг.

3.6 Соединения, проявляющие цитотоксическое действие при фотораспаде

С момента внедрения цисплатина в клиническую практику препараты на основе платины стали основой многих схем противоопухолевой терапии. Разработка, синтез и изучение новых платиносодержащих соединений, способных преодолеть выраженную токсичность и лекарственную устойчивость опухолей к традиционным препаратам Pt(II), находятся в центре внимания многих исследователей. Пролекарства Pt(IV) с регулируемой активацией позволяют управлять терапевтическим воздействием селективно – как во времени, так и в пространстве (Рисунок 27).

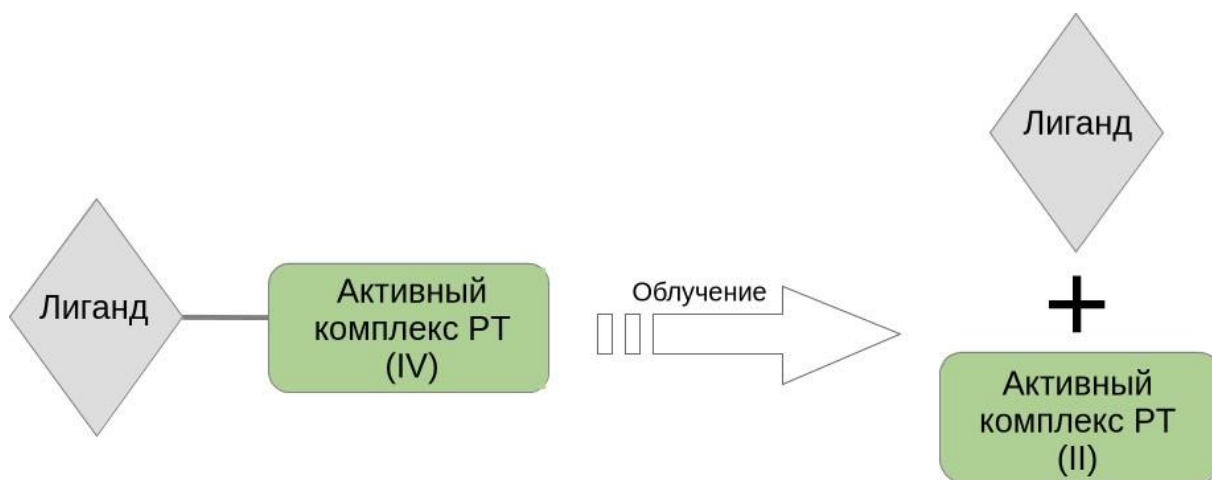


Рисунок 27. Схема действия пролекарств, применяющихся в фотодинамической терапии.

Создание фотоактивируемых пролекарств Pt(IV) представляет собой инновационный подход, основанный на конъюгации соединения Pt(II) с фотосенсибилизатором, способным возбуждаться под воздействием видимого или ближнего инфракрасного излучения и высвобождать цитотоксический агент. Это может позволить снизить системную токсичность платиновых комплексов за счет внешнего управления процессом их восстановления. К настоящему времени в качестве аксиальных лигандов для пролекарств Pt(IV) были опробованы различные фотоактивные соединения, такие как порфирин, кумарин и родамин.

В данном разделе будет рассмотрено цитотоксическое действие на клетки фотоактивных соединений платины (IV), содержащих в качестве фотосенсибилизатора рибофлавин и BODIPY. Исследуемые производные были синтезированы и предоставлены группой Красновской О.О. (НИЛ биологически активных органических соединений, химический факультет МГУ)

3.6.1 Цитотоксичность соединений, содержащих тетраацетилрибофлавин в качестве лиганда, при фотообработке

Рибофлавин (витамин В2) — это незаменимый нутриент, играющий ключевую роль в энергетическом обмене и клеточном дыхании. Поскольку во многих типах раковых опухолей наблюдается повышенное поглощение витамина В2, использование рибофлавинового фрагмента стало популярным методом адресной доставки препаратов к раковым клеткам. Сам по себе рибофлавин является мощным фотосенсибилизатором. Под воздействием ультрафиолетового или синего света он способен генерировать активные формы кислорода, что обуславливает его противоопухолевые, антибактериальные и противовирусные свойства, а также открывает широкие перспективы для его применения в фотодинамической терапии.

Был синтезирован рибоплатин (**97**) – пролекарство Pt(IV) двойного действия на основе цисплатина с тетраацетилрибофлавином (TARF) в аксиальном положении [189] (Рисунок 28А). Этот комплекс способен под действием света одновременно высвобождать цисплатин и генерировать активные формы кислорода.

Нами было экспериментально показана реализация цитотоксического действия данного новосинтезированного конъюгата только в условиях фотоактивации. При этом токсичность рибоплатина была сопоставима с цисплатином (в аналогичных условиях эксперимента), что позволяет сделать вывод о том, что токсический эффект рибоплатина обусловлен высвобождением цисплатина (Рисунок 28).

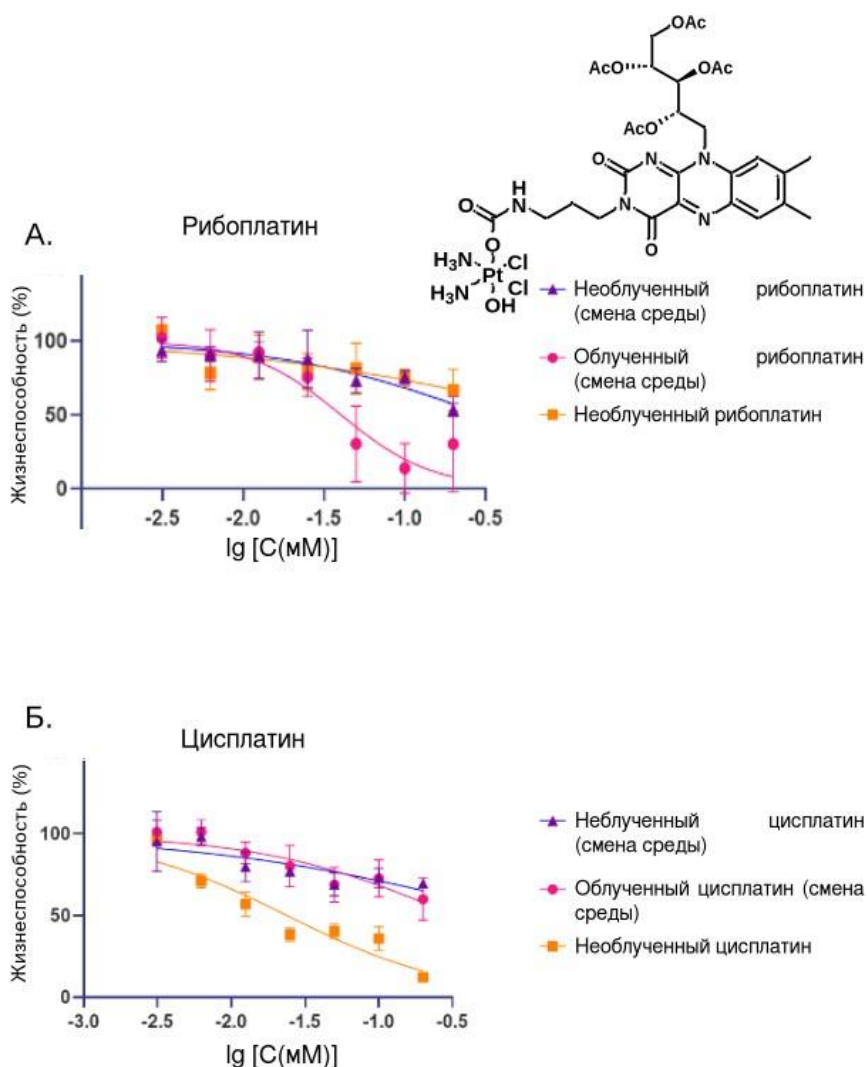


Рисунок 28. А. Анализ цитотоксического эффекта рибоплатина. Цитотоксичность рибоплатина проявляется только при облучении его светом соответствующей длины волны. Б. Анализ цитотоксического действия цисплатина.

3.6.2 Цитотоксичность соединений, содержащих BODIPY в качестве лиганда, при фотообработке

Были изучены производные бородипиррометенов как фотосенсибилизирующий фрагмент в конъюгатах с цисплатином. Производные бородипиррометена представляют собой обширный класс борорганических флуорофоров, обладающих высоким коэффициентом экстинкции и фотостабильностью. Благодаря этим свойствам красители BODIPY находят широкое применение в качестве флуоресцентных меток и агентов для биовизуализации.

Аналогично предыдущей работе с рибоплатином, были исследованы конъюгаты BODIPY и цисплатина. Были проведены работы по изучению мультикомпонентных пролекарств соединения **100** (структура приведена на Рисунке 29А), объединяющего два терапевтически активных фрагмента – цисплатин и комбретастин А4, также соединенных с флуорофором BODIPY [188].

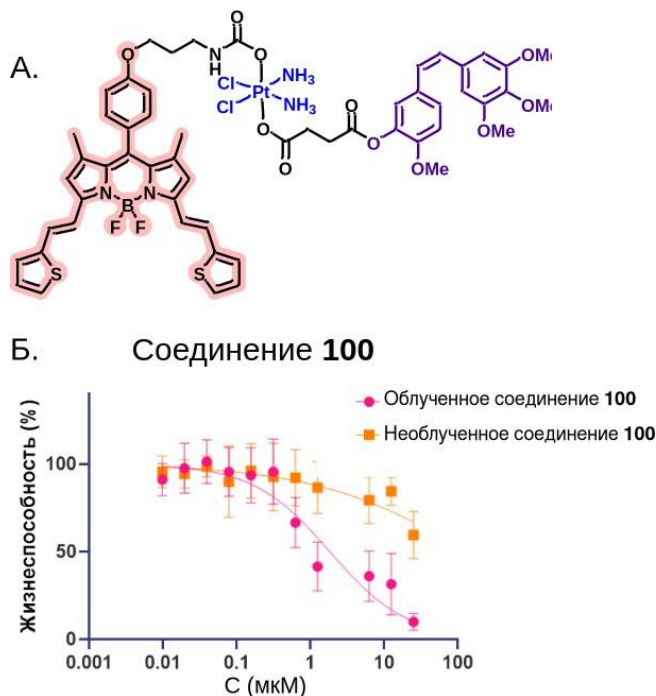


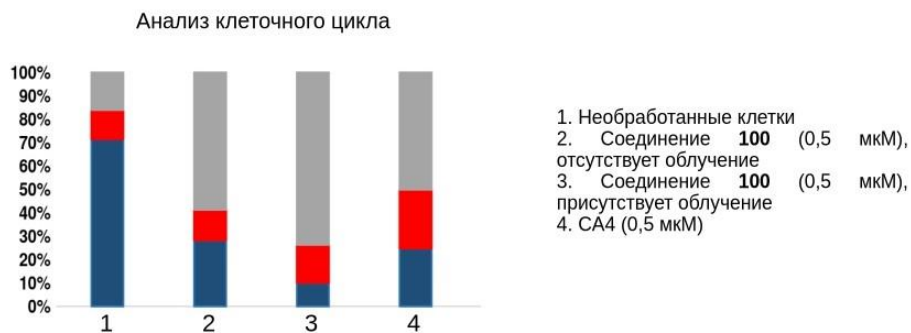
Рисунок 29: Анализ цитотоксичности конъюгата цисплатина, комбретастина А4 и BODIPY. А. Структура соединения **100**. Б. Цитотоксичность конъюгата **100**, проявляющаяся только при облучении его светом соответствующей длины волны.

Соединение, содержащее только фрагмент BODIPY-Pt (**98**) было менее цитотоксично, чем производное **100**; в то время как производное **99** (фрагмент СА4-Р с линкером) соответствовал по своей цитотоксичности СА4. Соединение **100** демонстрировало сходный с СА4 профиль цитотоксичности (Рисунок 29Б), соответственно был сделан вывод, что основной вклад в реализацию цитотоксичности вносит именно комбретастин А4, высвобождающийся при фотораспаде пролекарства.

Предположения были основаны на характерной форме графика цитотоксичности соединения **100**, в частности, из-за наличия характерного плато, проявляющегося в диапазоне 1-10 мкМ, совпадающего по форме кривой с графиком токсичности комбретастина А4 (Рисунок 29Б). Выводы также были подтверждены данными по анализу клеточного цикла, согласно

которым при обработке клеток соединением **100** идет накопление в G2/M фазе (Рисунок 30А). При флуоресцентном окрашивании тубулина четко видно дезорганизацию цитоскелета, что также характерно для комбретастина А4 (Рисунок 30Б).

А.



Б.

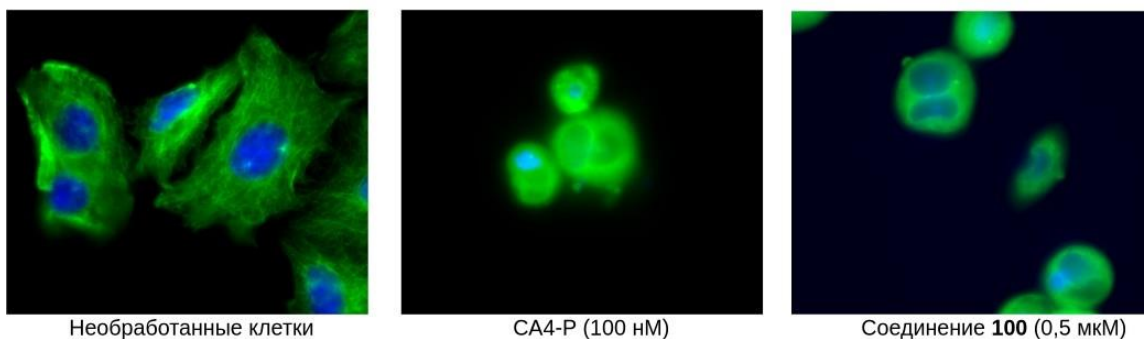


Рисунок 30: Анализ влияния на клеточный цикл и ингибирование полимеризации тубулина, проявляемое при фотораспаде исследуемого конъюгата. А. Анализ клеточного цикла клеток MCF7, обработанных соединениями **100** и СА4. Наблюдается накопление клеток в G2/M фазе. Б. Нарушение структуры цитоскелета клеток MCF7 при обработке соединениями **100** и СА4.

Заключение

В рамках представленного исследования были изучены противоопухолевые свойства нескольких групп низкомолекулярных органических соединений от первичного скрининга в клеточных моделях до анализов *in vivo*. Были изучены зависимости структура-активность четырех различных классов соединений (производные пиразолкарбоксамиды, хроман-4-она, 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 α]хиноксалина) и определены соединения-лидеры. Для производных 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 α]хиноксалина были исследованы молекулярные механизмы действия и успешно подтверждена противоопухолевая активность на мышинных моделях лейкозов и привитых опухолей *in vivo*, которая оказалась сопоставима с препаратами сравнения (доксорубицин, таксол) или превзошла их. Кроме того, разработка фотоактивируемых комплексов платины продемонстрировала перспективный подход к созданию пролекарств с управляемым пространственно-временным высвобождением токсического агента. На основании проведенного исследования можно сформулировать следующие **основные результаты работы и выводы**:

1. В каждом из исследуемых классов структурных производных (пиразолкарбоксамиды, хроман-4-она, 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 α]хиноксалина) были выделены наиболее цитотоксичные и селективные соединения-лидеры, IC_{50} которых находилась в низком микромолярном или наномолярном диапазоне.

2. Для производных пиразолкарбоксамиды значимыми элементами фармакофора являются нитрогруппа в четвертом положении в пиразольном кольце и галогены в первом фенильном радикале. Соединение-лидер **2**, содержащее данные структурные фрагменты, проявляет избирательную цитотоксичность в отношении клеток рака предстательной железы (PC3) и толстого кишечника (HCT116).

3. Для проявления избирательности действия и цитотоксичности в отношении клеток рака молочной железы MCF7 в производных хроман-4-она ключевыми заместителями являются параклорфенил, гидроксильная группа и диоксолан.

4. Хинонный фрагмент и орто-нитрофенильный заместитель в соединении-лидере **49** являются ключевыми для улучшения избирательной цитотоксичности в отношении клеток рака легкого A549. Исследованные производные 1,4-нафтохинона обладают мультитаргетным действием и индуцируют стресс ЭПР, при этом соединение-лидер **49** не является интеркалятором ДНК и не ингибирует ее репликацию.

5. Введение аминогруппы в фенильный радикал значительно улучшает цитотоксичность и селективность производных пирроло[1,2 α]хиноксалина. Молекулярный механизм действия оптимизированного соединения-лидера **77** заключается в ингибировании полимеризации тубулина.

6. Противоопухолевые эффекты *in vivo* соединений-лидеров **49** (производное 1,4-нафтохинона) и **77** (производное пирроло[1,2 α]хиноксалина) в мышинных моделях привитых опухолей и/или лейкозов являются сопоставимыми с препаратами сравнения или превосходят их.

7. Цитотоксичность исследованных фотоактивируемых производных платины реализуется при облучении их светом соответствующей длины волны. Действие рибоплатина обусловлено активностью платиносодержащего компонента фармакофора; действие производного **100** обусловлено высвобождением цитотоксического производного комбретастатина.

Список литературы

1. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
2. Choi HY, Chang JE. Targeted Therapy for Cancers: From Ongoing Clinical Trials to FDA-Approved Drugs. *Int J Mol Sci*. 2023. V. 24 № 17. P. 13618. doi:10.3390/ijms241713618
3. Roszkowska M. Multilevel Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Int J Mol Sci*. 2024. V. 25 № 22. P. 12402. doi:10.3390/ijms252212402
4. Dökümcü K, Farahani RM. Evolution of Resistance in Cancer: A Cell Cycle Perspective. *Front Oncol*. 2019. V. 9. doi:10.3389/fonc.2019.00376
5. Mushtaq A, Wu P, Naseer MM. Recent drug design strategies and identification of key heterocyclic scaffolds for promising anticancer targets. *Pharmacol Ther*. 2024 V. 254 P. 108579. doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108579
6. Wang Z, Sun X, Sun M, Wang C, Yang L. Game Changers: Blockbuster Small-Molecule Drugs Approved by the FDA in 2024. *Pharmaceuticals*. 2025 V. 18 № 5. P. 729. doi:10.3390/ph18050729
7. Tamatam R, Mohammed A. Small molecule anticancer drugs approved during 2021–2022: Synthesis and clinical applications. *Eur J Med Chem*. 2024 V. 272 P. 116441. doi:10.1016/j.ejmech.2024.116441
8. Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, et al. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*. 1988.V. 31 № 12. P. 2235–2246. doi:10.1021/jm00120a002
9. Roy R, Singh SK, Ahmad N, Misra S. Challenges and advancements in high-throughput screening strategies for cancer therapeutics. *Glob Transl Med*. 2024 V. 3 № 1. P. 2448. doi:10.36922/gtm.2448
10. Hsu KL. Shining a light on phenotypic drug discovery. *Cell Chem Biol*. 2021 Feb 18;28(2):115–7. doi:10.1016/j.chembiol.2021.01.020 PubMed PMID: 33607003; PubMed Central PMCID: PMC8121186.
11. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Aug;13(8):588–602. doi:10.1038/nrd4366

12. Moon H, Zang DY, Ryu M, Seo Y, Oh B, Hwang S, et al. FDA regulatory considerations for oncology drug development. *Pharmacol Res Perspect*. 2024 Aug;12(4):e1254. doi:10.1002/prp2.1254
13. Rahman AFMM, Alam MS, Kwon Y. Editorial: Small organic molecules with anticancer activity. *Front Chem*. 2023 Aug 23;11:1254312. doi:10.3389/fchem.2023.1254312 PubMed PMID: 37681208; PubMed Central PMCID: PMC10482230.
14. Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, et al. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem*. 2022 Apr 15;234:114239. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114239 PubMed PMID: 35290843; PubMed Central PMCID: PMC8883737.
15. Ioakeim-Skoufa I, Tobajas-Ramos N, Menditto E, Aza-Pascual-Salcedo M, Gimeno-Miguel A, Orlando V, et al. Drug Repurposing in Oncology: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. *Cancers*. 2023 May 30;15(11):2972. doi:10.3390/cancers15112972 PubMed PMID: 37296934; PubMed Central PMCID: PMC10251882.
16. Zhang Z, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang T, Cui Y, et al. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Jul 2;5:113. doi:10.1038/s41392-020-00213-8 PubMed PMID: 32616710; PubMed Central PMCID: PMC7331117.
17. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41–58. doi:10.1038/nrd.2018.168 PubMed PMID: 30310233.
18. Gonzalez-Fierro A, Dueñas-González A. Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. *Semin Cancer Biol*. 2021 Jan;68:123–31. doi:10.1016/j.semcancer.2019.12.012 PubMed PMID: 31877340.
19. Breckenridge A, Jacob R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):1–2. doi:10.1038/nrd.2018.92 PubMed PMID: 29880920.
20. Ioele G, Chieffallo M, Occhiuzzi MA, De Luca M, Garofalo A, Ragno G, et al. Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties.

- Molecules. 2022 Aug 25;27(17):5436. doi:10.3390/molecules27175436 PubMed PMID: 36080203; PubMed Central PMCID: PMC9457551.
21. Zhang S, Ye T, Liu Y, Hou G, Wang Q, Zhao F, et al. Research Advances in Clinical Applications, Anticancer Mechanism, Total Chemical Synthesis, Semi-Synthesis and Biosynthesis of Paclitaxel. *Molecules*. 2023 Jan;28(22):7517. doi:10.3390/molecules28227517
 22. Sati P, Sharma E, Dhyani P, Attri DC, Rana R, Kiyekbayeva L, et al. Paclitaxel and its semi-synthetic derivatives: comprehensive insights into chemical structure, mechanisms of action, and anticancer properties. *Eur J Med Res*. 2024 Jan 30;29:90. doi:10.1186/s40001-024-01657-2 PubMed PMID: 38291541; PubMed Central PMCID: PMC10826257.
 23. Jiang T, Cao YN, Xu JB, Gao F, Zheng LL. Molecular-docking-guided design, palladium-catalyzed synthesis and anticancer activity of paclitaxel-benzoxazoles hybrids. *Sci Rep*. 2022 Jun 15;12:10021. doi:10.1038/s41598-022-14172-3 PubMed PMID: 35705688; PubMed Central PMCID: PMC9200075.
 24. Abu-Lafi S, Falah M, Zeidan M, Rayan M, Rayan A. Expanding paclitaxel's therapeutic window: Investigating the pharmacokinetic, clinical formulation and mechanistic aspects of paclitaxel-lipoate conjugate. *Oncol Lett*. 2025 Mar 5;29(5):216. doi:10.3892/ol.2025.14962 PubMed PMID: 40093869; PubMed Central PMCID: PMC11907689.
 25. Wei Y, Zeng M, Pi C, Shen H, Yuan J, Zuo Y, et al. Novel Curcumin Derivative-Decorated Ultralong-Circulating Paclitaxel Nanoparticles: A Novel Delivery System with Superior Anticancer Efficacy and Safety. *Int J Nanomedicine*. 2022 Nov 14;17:5265–86. doi:10.2147/IJN.S369761 PubMed PMID: 36406640; PubMed Central PMCID: PMC9673813.
 26. Wang Y, Cui Y, Dai T, Yue Y. Reduction-responsive supramolecular hybridized paclitaxel nanoparticles for tumor treatment. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Sep 1;11. doi:10.3389/fbioe.2023.1257788
 27. Pei Q, Jiang B, Hao D, Xie Z. Self-assembled nanoformulations of paclitaxel for enhanced cancer theranostics. *Acta Pharm Sin B*. 2023 Aug;13(8):3252–76. doi:10.1016/j.apsb.2023.02.021 PubMed PMID: 37655323; PubMed Central PMCID: PMC10465968.

28. Haddad R, Alrabadi N, Altaani B, Li T. Paclitaxel Drug Delivery Systems: Focus on Nanocrystals' Surface Modifications. *Polymers*. 2022 Feb 9;14(4):658. doi:10.3390/polym14040658 PubMed PMID: 35215570; PubMed Central PMCID: PMC8875890.
29. Jayanetti K, Takemura K, Bendale H, Garg A, Ojima I. Recent advances in the strategic incorporation of fluorine into new-generation taxoid anticancer agents. *J Fluor Chem*. 2023 Apr;267:110106. doi:10.1016/j.jfluchem.2023.110106 PubMed PMID: 39449768; PubMed Central PMCID: PMC11500632.
30. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*. 2022 Feb 7;12(5):2115–32. doi:10.7150/thno.69424 PubMed PMID: 35265202; PubMed Central PMCID: PMC8899578.
31. Deng Z, Chen S, Liu G, Zhu G. Unlocking the potential of platinum drugs: organelle-targeted small-molecule platinum complexes for improved anticancer performance. *RSC Chem Biol*. 2023 Oct 3;4(12):1003–13. doi:10.1039/d3cb00087g PubMed PMID: 38033725; PubMed Central PMCID: PMC10685827.
32. Xie S, Sun Y, Zhao X, Xiao Y, Zhou F, Lin L, et al. An update of the molecular mechanisms underlying anthracycline induced cardiotoxicity. *Front Pharmacol*. 2024 Jun 26;15:1406247. doi:10.3389/fphar.2024.1406247
33. Chen Y, Yang W, Cui X, Zhang H, Li L, Fu J, et al. Research Progress on the Mechanism, Monitoring, and Prevention of Cardiac Injury Caused by Antineoplastic Drugs—Anthracyclines. *Biology*. 2024 Sep 3;13(9):689. doi:10.3390/biology13090689 PubMed PMID: 39336116.
34. Bayles CE, Hale DE, Konieczny A, Anderson VD, Richardson CR, Brown KV, et al. Upcycling the anthracyclines: New mechanisms of action, toxicology, and pharmacology. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2023 Jan;459:116362. doi:10.1016/j.taap.2022.116362
35. Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2018 Jun 20;11:84. doi:10.1186/s13045-018-0624-2 PubMed PMID: 29925402; PubMed Central PMCID: PMC6011351.

36. Wang Z, Jiang L, Yan H, Xu Z, Luo P. Adverse events associated with nilotinib in chronic myeloid leukemia: mechanisms and management strategies. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021 Apr;14(4):445–56. doi:10.1080/17512433.2021.1894129 PubMed PMID: 33618586.
37. Fauziya null, Gupta A, Nadaf A, Ahmad S, Hasan N, Imran M, et al. Dasatinib: a potential tyrosine kinase inhibitor to fight against multiple cancer malignancies. *Med Oncol*. 2023 May 10;40(6):173. doi:10.1007/s12032-023-02018-5 PubMed PMID: 37165283.
38. Kim TE, Chang JE. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics*. 2023 Aug 31;15(9):2257. doi:10.3390/pharmaceutics15092257 PubMed PMID: 37765226; PubMed Central PMCID: PMC10535460.
39. Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018 Sep 26;22(1):25. doi:10.1186/s40824-018-0140-z
40. Chabner BA, Gehri J, Thompson BB. Reinventing chemotherapy. *The Oncologist*. 2025 Feb 27;30(2):oyae331. doi:10.1093/oncolo/oyae331 PubMed PMID: 40036587; PubMed Central PMCID: PMC11979772.
41. Kintzing JR, Filsinger Interrante MV, Cochran JR. Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Dec;37(12):993–1008. doi:10.1016/j.tips.2016.10.005
42. Drug Approval Package: MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicin) [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/761060Orig1s000Orig1Orig2s000TOC.cfm
43. Drug Approval Package: ENHERTU [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/761139Orig1s000TOC.cfm
44. Drug Approval Package: TRODELVY [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/761115Orig1s000TOC.cfm
45. Drug Approval Package: PADCEV enfortumab vedotin-ejfv [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/761137Orig1s000TOC.cfm

46. Drug Approval Package: TIVDAK [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2021/761208Orig1s000TOC.cfm
47. De Sena Murteira Pinheiro P, Franco LS, Montagnoli TL, Fraga CAM. Molecular hybridization: a powerful tool for multitarget drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2024 Apr 2;19(4):451–70. doi:10.1080/17460441.2024.2322990
48. Doostmohammadi A, Jooya H, Ghorbanian K, Gohari S, Dadashpour M. Potentials and future perspectives of multi-target drugs in cancer treatment: the next generation anti-cancer agents. *Cell Commun Signal.* 2024 Apr 15;22(1):228. doi:10.1186/s12964-024-01607-9
49. Jaffee EM, Dang CV, Agus DB, Alexander BM, Anderson KC, Ashworth A, et al. Future cancer research priorities in the USA: a Lancet Oncology Commission. *Lancet Oncol.* 2017 Oct 31;18(11):e653. doi:10.1016/S1470-2045(17)30698-8 PubMed PMID: 29208398.
50. Skvortsov DA, Kalinina MA, Zhirkina IV, Vasilyeva LA, Ivanenkov YA, Sergiev PV, et al. From Toxicity to Selectivity: Coculture of the Fluorescent Tumor and Non-Tumor Lung Cells and High-Throughput Screening of Anticancer Compounds. *Front Pharmacol.* 2021 Oct 11;12:713103. doi:10.3389/fphar.2021.713103 PubMed PMID: 34707495; PubMed Central PMCID: PMC8542663.
51. Stuart DD, Guzman-Perez A, Brooijmans N, Jackson EL, Kryukov GV, Friedman AA, et al. Precision Oncology Comes of Age: Designing Best-in-Class Small Molecules by Integrating Two Decades of Advances in Chemistry, Target Biology, and Data Science. *Cancer Discov.* 2023 Oct 5;13(10):2131–49. doi:10.1158/2159-8290.CD-23-0280 PubMed PMID: 37712571; PubMed Central PMCID: PMC10551669.
52. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr Top Med Chem.* 2014 Aug;14(16):1923–38. doi:10.2174/1568026614666140929124445 PubMed PMID: 25262799; PubMed Central PMCID: PMC4443793.
53. Tariq A, Rehman HM, Mateen RM, Ali M, Mutahir Z, Afzal MS, et al. A computer aided drug discovery based discovery of lead-like compounds against KDM5A for cancers using pharmacophore

- modeling and high-throughput virtual screening. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2022;90(3):645–57. doi:10.1002/prot.26262
54. Baldi S, Long N, Ma S, Liu L, Al-Danakh A, Yang Q, et al. Advancements in Protein Kinase Inhibitors: From Discovery to Clinical Applications. *Research.* 8:0747. doi:10.34133/research.0747 PubMed PMID: 40547482; PubMed Central PMCID: PMC12180671.
55. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018 Dec;18(12):1249–70. doi:10.1080/14737140.2018.1527688 PubMed PMID: 30259761; PubMed Central PMCID: PMC6322661.
56. Ayala-Aguilera CC, Valero T, Lorente-Macías Á, Baillache DJ, Croke S, Unciti-Broceta A. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *J Med Chem.* 2022 Jan 27;65(2):1047–131. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00963
57. Bennati C, Paglialunga L, Ricciuti B, Metro G, Marcomigni L, Gili A, et al. Targeting EGFR and ALK in NSCLC: current evidence and future perspective. *Lung Cancer Manag.* 2016 Jun;5(2):79–90. doi:10.2217/lmt-2016-0005 PubMed PMID: 30643552; PubMed Central PMCID: PMC6310340.
58. Wang R, Chen Y, Li L, Zhang L, Zhang S. Osimertinib acquired resistance among patients with EGFR-mutated NSCLC: from molecular mechanisms to clinical therapeutic strategies. *Cancer Drug Resist.* 2025 Dec 2;8:N/A-N/A. doi:10.20517/cdr.2025.140
59. Pophali PA, Patnaik MM. The Role of New Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer J Sudbury Mass.* 2016;22(1):40–50. doi:10.1097/PPO.000000000000165 PubMed PMID: 26841016; PubMed Central PMCID: PMC4742366.
60. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers.* 2020 Mar 20;12(3):731. doi:10.3390/cancers12030731 PubMed PMID: 32244867; PubMed Central PMCID: PMC7140093.
61. Hillyar C, Rallis KS, Varghese J, Hillyar CR, Rallis KS, Varghese J. Advances in Epigenetic Cancer Therapeutics. *Cureus.* 2020 Nov 27;12(11). doi:10.7759/cureus.11725
62. Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Epigenetic drugs in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2025 Feb 26;44(1):37. doi:10.1007/s10555-025-10253-7

63. Mabe NW, Perry JA, Malone CF, Stegmaier K. Pharmacologic Targeting of the Cancer Epigenome. *Nat Cancer*. 2024 Jun;5(6):844–65. doi:10.1038/s43018-024-00777-2 PubMed PMID: 38937652; PubMed Central PMCID: PMC11936478.
64. Drug Approval Package [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021991s000_ZolinzaTOC.cfm
65. Drug Approval Package: ROMIDEPSIN INJECTION [Internet]. [cited 2026 Jan 21]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/208574Orig1s000,Orig2s000TOC.cfm
66. Research C for DE and. FDA approves tazemetostat for advanced epithelioid sarcoma. FDA [Internet]. 2024 Aug 9 [cited 2026 Feb 10]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tazemetostat-advanced-epithelioid-sarcoma>
67. Muddassir M, Soni K, Sangani CB, Alarifi A, Afzal M, Abduh NAY, et al. Bromodomain and BET family proteins as epigenetic targets in cancer therapy: their degradation, present drugs, and possible PROTACs. *RSC Adv*. 2020 Dec 24;11(2):612–36. doi:10.1039/D0RA07971E
68. Wang ZQ, Zhang ZC, Wu YY, Pi YN, Lou SH, Liu TB, et al. Bromodomain and extraterminal (BET) proteins: biological functions, diseases and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Nov 6;8:420. doi:10.1038/s41392-023-01647-6 PubMed PMID: 37926722; PubMed Central PMCID: PMC10625992.
69. Shorstova T, Foulkes WD, Witcher M. Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *Br J Cancer*. 2021 Apr 27;124(9):1478–90. doi:10.1038/s41416-021-01321-0 PubMed PMID: 33723398; PubMed Central PMCID: PMC8076232.
70. Mathur V, Jha M, Zai I, Mahajan M, Nazar S, Ali S, et al. Design and development of PROTACs: A new paradigm in anticancer drug discovery. *Med Drug Discov*. 2025 Sep 1;27:100221. doi:10.1016/j.medidd.2025.100221
71. Qi SM, Dong J, Xu ZY, Cheng XD, Zhang WD, Qin JJ. PROTAC: An Effective Targeted Protein Degradation Strategy for Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2021 May 7;12. doi:10.3389/fphar.2021.692574

72. Hamilton EP, Ma C, De Laurentiis M, Iwata H, Hurvitz SA, Wander SA, et al. VERITAC-2: a Phase III study of vepdegestrant, a PROTAC ER degrader, versus fulvestrant in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Future Oncol.* 2024 Oct 10;20(32):2447–55. doi:10.1080/14796694.2024.2377530 PubMed PMID: 39072356.
73. Gao X, Burris III HA, Vuky J, Dreicer R, Sartor AO, Sternberg CN, et al. Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J Clin Oncol.* 2022 Feb 20;40(6_suppl):17–17. doi:10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.017
74. Arribas AJ, Civanelli E, Scalise C, Cascione L, Rinaldi A, Rossi D, et al. Abstract 410: The BTK degrader BGB-16673 shows anti-tumor activity in marginal zone lymphoma models. *Cancer Res.* 2025 Apr 21;85(8_Supplement_1):410. doi:10.1158/1538-7445.AM2025-410
75. Phenotypic Screening. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2017 [cited 2026 Jan 17]. p. 263–99. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/bookseries/abs/pii/S0065774317300015> doi:10.1016/bs.armc.2017.07.001
76. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *J Appl Toxicol JAT.* 2019 Jan;39(1):38–71. doi:10.1002/jat.3658 PubMed PMID: 30073673.
77. Cagan R. Drug screening using model systems: some basics. *Dis Model Mech.* 2016 Nov 1;9(11):1241–4. doi:10.1242/dmm.028159 PubMed PMID: 27821602; PubMed Central PMCID: PMC5117237.
78. Goodspeed A, Heiser LM, Gray JW, Costello JC. Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Mol Cancer Res MCR.* 2015 Aug 6;14(1):3. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0189 PubMed PMID: 26248648.
79. Coussens NP, Braisted JC, Peryea T, Sittampalam GS, Simeonov A, Hall MD. *Small-Molecule Screens: A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration*

- Approved Drugs. *Pharmacol Rev.* 2017 Oct;69(4):479–96. doi:10.1124/pr.117.013755 PubMed PMID: 28931623; PubMed Central PMCID: PMC5612261.
80. Morris J, Kunkel MW, White SL, Wishka DG, Lopez OD, Bowles L, et al. Targeted Investigational Oncology Agents in the NCI-60: A Phenotypic Systems-based Resource. *Mol Cancer Ther.* 2023 Nov 1;22(11):1270–9. doi:10.1158/1535-7163.MCT-23-0267 PubMed PMID: 37550087; PubMed Central PMCID: PMC10618733.
81. Workman P. The NCI-60 Human Tumor Cell Line Screen: A Catalyst for Progressive Evolution of Models for Discovery and Development of Cancer Drugs. *Cancer Res.* 2023 Oct 1;83(19):3170–3. doi:10.1158/0008-5472.CAN-23-2612
82. Spink BC, Cole RW, Katz BH, Gierthy JF, Bradley LM, Spink DC. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by MCF-10A breast epithelial cells in coculture. *Cell Biol Int.* 2006 Mar;30(3):227–38. doi:10.1016/j.cellbi.2005.11.006 PubMed PMID: 16427788.
83. Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, Vogel GF, et al. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE.* 2014 Mar 24;9(3):e92511. doi:10.1371/journal.pone.0092511 PubMed PMID: 24663399; PubMed Central PMCID: PMC3963897.
84. Müller-Quernheim UC, Potthast L, Müller-Quernheim J, Zissel G. Tumor-Cell Co-Culture Induced Alternative Activation of Macrophages Is Modulated by Interferons In Vitro. *J Interferon Cytokine Res.* 2012 Apr;32(4):169. doi:10.1089/jir.2011.0020 PubMed PMID: 22280057.
85. Selvin T, Berglund M, Lenhammar L, Jarvius M, Nygren P, Fryknäs M, et al. Phenotypic screening platform identifies statins as enhancers of immune cell-induced cancer cell death. *BMC Cancer.* 2023 Feb 17;23:164. doi:10.1186/s12885-023-10645-4 PubMed PMID: 36803614; PubMed Central PMCID: PMC9938546.
86. Skvortsov DA, Zhirkina IV, Ipatova DA, Vasilyeva LA, Ivanenkov YA, Rubtsova MP, et al. Coculture-Based Screening Revealed Selective Cytostatic Effects of Pyrazol-Azepinoindoles. *ChemMedChem.* 2025;20(12):e202500052. doi:10.1002/cmdc.202500052

87. Kabiljo J, Theophil A, Homola J, Renner AF, Stürzenbecher N, Ammon D, et al. Cancer-associated fibroblasts shape early myeloid cell response to chemotherapy-induced immunogenic signals in next generation tumor organoid cultures. *J Immunother Cancer*. 2024 Nov;12(11):e009494. doi:10.1136/jitc-2024-009494
88. Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Apr 9;8:322. doi:10.3389/fbioe.2020.00322 PubMed PMID: 32328489; PubMed Central PMCID: PMC7160228.
89. Jo Y, Choi N, Kim K, Koo HJ, Choi J, Kim HN. Chemoresistance of Cancer Cells: Requirements of Tumor Microenvironment-mimicking In Vitro Models in Anti-Cancer Drug Development. *Theranostics*. 2018 Oct 22;8(19):5259. doi:10.7150/thno.29098 PubMed PMID: 30555545.
90. Sirenko O, Mitlo T, Hesley J, Luke S, Owens W, Cromwell EF. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. *Assay Drug Dev Technol*. 2015 Sep 1;13(7):402–14. doi:10.1089/adt.2015.655 PubMed PMID: 26317884; PubMed Central PMCID: PMC4556086.
91. Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res*. 2014 Apr 15;323(1):131–43. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.017
92. Mi-Hyeon Jeong, Inhee Kim, Kyunghyun Park, Bosung Ku, Dong Woo Lee, Kyoung Ryeol Park, et al. An Automated High-Throughput Screening (HTS) Spotter for 3D Tumor Spheroid Formation. 2023 Mar 1.
93. Abolhassani H, Zaer M, Shojaosadati SA, Hashemi-Najafabadi S. Rapid generation of homogenous tumor spheroid microtissues in a scaffold-free platform for high-throughput screening of a novel combination nanomedicine. *PLOS ONE*. 2023;18(2):e0282064. doi:10.1371/journal.pone.0282064
94. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 6;12(12):1186. doi:10.3390/pharmaceutics12121186 PubMed PMID: 33291351; PubMed Central PMCID: PMC7762220.

95. Wang X, Li L, Shen X, Lu X. Rational Design Strategies in DNA-Encoded Libraries for Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed.* 2025;64(34):e202511839. doi:10.1002/anie.202511839
96. Bon M, Bilslund A, Bower J, McAulay K. Fragment-based drug discovery—the importance of high-quality molecule libraries. *Mol Oncol.* 2022;16(21):3761–77. doi:10.1002/1878-0261.13277
97. Wang L, Li R, Song C, Chen Y, Long H, Yang L. Small-Molecule Anti-Cancer Drugs From 2016 to 2020: Synthesis and Clinical Application. *Nat Prod Commun.* 2021 Sep 1;16(9):1934578X211040326. doi:10.1177/1934578X211040326
98. Zhang Y, Wu C, Zhang N, Fan R, Ye Y, Xu J. Recent Advances in the Development of Pyrazole Derivatives as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 12;24(16):12724. doi:10.3390/ijms241612724 PubMed PMID: 37628906; PubMed Central PMCID: PMC10454718.
99. Alam MdJ, Alam O, Naim MohdJ, Nawaz F, Manaitiya A, Imran M, et al. Recent Advancement in Drug Design and Discovery of Pyrazole Biomolecules as Cancer and Inflammation Therapeutics. *Molecules.* 2022 Dec 8;27(24):8708. doi:10.3390/molecules27248708 PubMed PMID: 36557840; PubMed Central PMCID: PMC9780894.
100. Nehra B, Kumar M, Chawla PA. Recent updates in medicinal chemistry and SAR profile of therapeutically important pyrazole hybrid analogues (2022–2025). *Future Med Chem.* 2026 Mar 4;18(5):563–83. doi:10.1080/17568919.2026.2620361 PubMed PMID: 41618885.
101. Nitulescu GM, Stancov G, Seremet OC, Nitulescu G, Mihai DP, Duta-Bratu CG, et al. The Importance of the Pyrazole Scaffold in the Design of Protein Kinases Inhibitors as Targeted Anticancer Therapies. *Molecules.* 2023 Jul 12;28(14):5359. doi:10.3390/molecules28145359 PubMed PMID: 37513232; PubMed Central PMCID: PMC10385367.
102. Hargunani P, Tadge N, Ceruso M, Leitans J, Kazaks A, Tars K, et al. Aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxamide Derivatives Bearing a Sulfonamide Moiety Show Single-digit Nanomolar-to-Subnanomolar Inhibition Constants against the Tumor-associated Human Carbonic Anhydrases IX and XII. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 9;21(7):2621. doi:10.3390/ijms21072621 PubMed PMID: 32283813; PubMed Central PMCID: PMC7177888.

103. El-Gamal MI, Choi HS, Yoo KH, Baek D, Oh CH. Antiproliferative diarylpyrazole derivatives as dual inhibitors of the ERK pathway and COX-2. *Chem Biol Drug Des.* 2013 Sep;82(3):336–47. doi:10.1111/cbdd.12186 PubMed PMID: 23834707.
104. Cheng C, Yun F, Ullah S, Yuan Q. Discovery of novel cyclin-dependent kinase (CDK) and histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors with potent *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. *Eur J Med Chem.* 2020 Mar 1;189:112073. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112073
105. Yasuda Y, Arakawa T, Nawata Y, Shimada S, Oishi S, Fujii N, et al. Design, synthesis, and structure–activity relationships of 1-ethylpyrazole-3-carboxamide compounds as novel hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2015 Apr 15;23(8):1776–87. doi:10.1016/j.bmc.2015.02.038
106. Lu Y, Ran T, Lin G, Jin Q, Jin J, Li H, et al. Novel 1H-pyrazole-3-carboxamide derivatives: synthesis, anticancer evaluation and identification of their DNA-binding interaction. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2014;62(3):238–46. doi:10.1248/cpb.c13-00676 PubMed PMID: 24365978.
107. Deng W, Chen X, Liang H, Song X, Xiang S, Guo J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 5-amino-1H-pyrazole-4-carboxamide derivatives as pan-FGFR covalent inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2024 Sep 5;275:116558. doi:10.1016/j.ejmech.2024.116558 PubMed PMID: 38870833.
108. Kamboj S, Singh R. Chromanone-A Prerogative Therapeutic Scaffold: An Overview. *Arab J Sci Eng.* 2021. doi:10.1007/s13369-021-05858-3
109. Emami S, Ghanbarimasir Z. Recent advances of chroman-4-one derivatives: Synthetic approaches and bioactivities. *Eur J Med Chem.* 2015 Mar 26;93:539–63. doi:10.1016/j.ejmech.2015.02.048
110. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Roecker AJ, Cao GQ, Et. A. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans. *J Am Chem Soc.* 2000. doi:10.1021/ja002033k
111. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Mitchell HJ, Roecker AJ, Et. A. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 2. Construction of a 10 000-Membered Benzopyran Library by Directed Split-and-Pool Chemistry Using NanoKans and Optical Encoding. *J Am Chem Soc.* 2000. doi:10.1021/ja002034c

112. El Malah T, Shamroukh AH, Kotb ER, Soliman HA, Mahmoud K, Hegab MI. Chemical and anticancer activity studies for some 3-chloro-3-chlorosulfonyl-4'-methylspiro[chroman-2,1'-cyclohexane]-4-ones. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 2021 Nov 2;196(11):970–7. doi:10.1080/10426507.2021.1947275
113. SHAHRANI MA, RAJAGOPALAN P, ABOHASSAN M, ALSHAHRANI M, ALRAEY Y, GAHTANI RM, et al. Anticancer efficacy of 3-(4-isopropyl) benzylidene-8-ethoxy, 6-methyl, chroman-4-one (SBL-060), a novel, dual, estrogen receptor-Akt kinase inhibitor in acute myeloid leukemia cells. *Oncol Res.* 29(3):149–57. doi:10.32604/or.2022.03539 PubMed PMID: 37304671; PubMed Central PMCID: PMC10207952.
114. Adamus-Grabicka AA, Markowicz-Piasecka M, Cieślak M, Królewska-Golińska K, Hikisz P, Kusz J, et al. Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues. *Molecules.* 2020 Apr 1;25(7):1613. doi:10.3390/molecules25071613 PubMed PMID: 32244705; PubMed Central PMCID: PMC7180617.
115. Feng L, Maddox MM, Alam MdZ, Tsutsumi LS, Narula G, Bruhn DF, et al. Synthesis, Structure–Activity Relationship Studies, and Antibacterial Evaluation of 4-Chromanones and Chalcones, as Well as Olympicin A and Derivatives. *J Med Chem.* 2014 Oct 23;57(20):8398–420. doi:10.1021/jm500853v
116. Hikisz P, Wawrzyniak P, Adamus-Grabicka AA, Jacenik D, Budzisz E. Evaluation of In Vitro Biological Activity of Flavanone/Chromanone Derivatives: Molecular Analysis of Anticancer Mechanisms in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024 Dec 3;25(23):12985. doi:10.3390/ijms252312985 PubMed PMID: 39684693; PubMed Central PMCID: PMC11641365.
117. Shaimaa A. Abdelatef, Mohammed T. El-Saadi, Noha H. Amin, Ahmed H. Abdelazeem, Khaled R.A. Abdellatif. Synthesis And Anticancer Screening Of Novel Spiro[Chroman-2,4'- Piperidin]-4-One Derivatives With Apoptosis-Inducing Activity. *J Appl Pharm Sci.* 2018. doi:10.7324/JAPS.2018.8102
118. Zaman GS, Kamli H, Radhakrishnan S, Ahmad I, Otifi H, Alshahrani MY, et al. Structure activity evaluation and computational analysis identify potent, novel 3-benzylidene chroman-4-one analogs with anti-fungal, anti-oxidant, and anti-cancer activities. *Drug Dev Ind Pharm.* 2021 Sep;47(9):1459–68. doi:10.1080/03639045.2021.2001489 PubMed PMID: 34726982.

119. Roy R, Nandikolla A, Ghosh Dastidar D, Chatterji U, Sekhar KVG, Chakrabarti G. Spirochromanone Cst-17 as a potent microtubule destabilizing agent showing anticancer effects in HeLa cells by binding to tubulin. *Future Med Chem.* 2026 Feb 17;0(0):1–18. doi:10.1080/17568919.2026.2628554 PubMed PMID: 41700121.
120. Thaler F, Moretti L, Amici R, Abate A, Colombo A, Carenzi G, et al. Synthesis, biological characterization and molecular modeling insights of spirochromanes as potent HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2016 Jan 27;108:53–67. doi:10.1016/j.ejmech.2015.11.010
121. Alipour E, Mousavi Z, Safaei Z, Pordeli M, Safavi M, Firoozpour L, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of some new [1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one derivatives. *DARU J Pharm Sci.* 2014 May 2;22(1):41. doi:10.1186/2008-2231-22-41
122. Safavi M, Esmati N, Ardestani SK, Emami S, Ajdari S, Davoodi J, et al. Halogenated flavanones as potential apoptosis-inducing agents: Synthesis and biological activity evaluation. *Eur J Med Chem.* 2012 Dec 1;58:573–80. doi:10.1016/j.ejmech.2012.10.043
123. Demirayak S, Yurttas L, Gundogdu-Karaburun N, Karaburun AC, Kayagil I. New chroman-4-one/thiochroman-4-one derivatives as potential anticancer agents. *Saudi Pharm J.* 2017 Nov 1;25(7):1063–72. doi:10.1016/j.jsps.2017.04.040
124. Chitti S, Pulya S, Nandikolla A, Patel TK, Karan Kumar B, Murugesan S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 7-(5-((substituted – amino)-methyl)-thiophen-2-yl)-spiro-[chroman-2,4'-piperidin]-4-one hydrochloride analogues as anticancer agents. *Bioorganic Chem.* 2021 Jul 1;112:104865. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104865
125. Nakka S, Sengar S, Sai Chaitanya K, Swati, Chandu A, Sankaranarayanan M, et al. Design and Synthesis of Novel Spiro [Chromane-2,4'-Piperidin]-4-One Derivatives: Anti-Proliferative Investigation and Molecular Docking Studies. *Asian J Org Chem.* 2025;14(2):e202400604. doi:10.1002/ajoc.202400604
126. Navarro-Tovar G, Vega-Rodríguez S, Leyva E, Loredo-Carrillo S, de Loera D, López-López LI. The Relevance and Insights on 1,4-Naphthoquinones as Antimicrobial and Antitumoral Molecules: A

- Systematic Review. *Pharmaceuticals*. 2023 Mar 27;16(4):496. doi:10.3390/ph16040496 PubMed PMID: 37111253; PubMed Central PMCID: PMC10144089.
127. Shen X, Liang X, He C, Yin L, Xu F, Li H, et al. Structural and pharmacological diversity of 1,4-naphthoquinone glycosides in recent 20 years. *Bioorganic Chem*. 2023 Sep 1;138:106643. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106643
128. Qiu HY, Wang PF, Lin HY, Tang CY, Zhu HL, Yang YH. Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chem Biol Drug Des*. 2018;91(3):681–90. doi:10.1111/cbdd.13141
129. Angulo-Elizari E, Henriquez-Figueroa A, Morán-Serradilla C, Plano D, Sanmartín C. Unlocking the potential of 1,4-naphthoquinones: A comprehensive review of their anticancer properties. *Eur J Med Chem*. 2024 Mar 15;268:116249. doi:10.1016/j.ejmech.2024.116249
130. Lee MH, Lapidus RG, Ferraris D, Emadi A. Analysis of the Mechanisms of Action of Naphthoquinone-Based Anti-Acute Myeloid Leukemia Chemotherapeutics. *Molecules*. 2019 Aug 28;24(17):3121. doi:10.3390/molecules24173121 PubMed PMID: 31466259; PubMed Central PMCID: PMC6749238.
131. Rahman MM, Islam MR, Akash S, Shohag S, Ahmed L, Supti FA, et al. Naphthoquinones and derivatives as potential anticancer agents: An updated review. *Chem Biol Interact*. 2022 Dec 1;368:110198. doi:10.1016/j.cbi.2022.110198
132. Mumu AS, Reyda RN, Qais N. 1,4 -Naphthoquinone Derivatives with Anticancer Potential: A Comprehensive Review. *Eur J Med Chem Rep*. 2026 Feb 5;100326. doi:10.1016/j.ejmcr.2026.100326
133. Baell J, Walters MA. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*. 2014. doi:10.1038/513481a
134. Shen X bao, Wang Y, Han X zhen, Sheng L quan, Wu F fang, Liu X. Design, synthesis and anticancer activity of naphthoquinone derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 35(1):773–85. doi:10.1080/14756366.2020.1740693 PubMed PMID: 32200656; PubMed Central PMCID: PMC7144209.

135. Shao Z, Wang H, Ren H, Sun Y, Chen X. The Anticancer Effect of Napabucasin (BBI608), a Natural Naphthoquinone. *Molecules*. 2023 Jul 27;28(15):5678. doi:10.3390/molecules28155678 PubMed PMID: 37570646; PubMed Central PMCID: PMC10420168.
136. Use of the Naphthoquinone YM155 (Sepantronium Bromide) in the Treatment of Cancer: A Systematic Review and Meta-Synthesis. *Oncologie*. 2022 Jun 28;24(2):195–225. doi:10.32604/oncologie.2022.022299
137. Chen NT, Wu CY, Chung CY, Hwu Y, Cheng SH, Mou CY, et al. Probing the Dynamics of Doxorubicin-DNA Intercalation during the Initial Activation of Apoptosis by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *PLoS ONE*. 2012 Sep 18;7(9):e44947. doi:10.1371/journal.pone.0044947 PubMed PMID: 23028696; PubMed Central PMCID: PMC3445590.
138. Lemos BC, Westphal R, Filho EV, Fiorot RG, Carneiro JWM, Gomes ACC, et al. Synthetic enamine naphthoquinone derived from lawsone as cytotoxic agents assessed by in vitro and in silico evaluations. *Bioorg Med Chem Lett*. 2021 Dec 1;53:128419. doi:10.1016/j.bmcl.2021.128419 PubMed PMID: 34715305.
139. Kumar BS, Ravi K, Verma AK, Fatima K, Hasanain M, Singh A, et al. Synthesis of pharmacologically important naphthoquinones and anticancer activity of 2-benzyllawsone through DNA topoisomerase-II inhibition. *Bioorg Med Chem*. 2017 Feb 15;25(4):1364–73. doi:10.1016/j.bmc.2016.12.043 PubMed PMID: 28094224.
140. Mohamady S, Gibriel AA, Ahmed MS, Hendy MS, Naguib BH. Design and novel synthetic approach supported with molecular docking and biological evidence for naphthoquinone-hydrazinotriazolothiadiazine analogs as potential anticancer inhibiting topoisomerase-II. *Bioorganic Chem*. 2020 Mar;96:103641. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103641 PubMed PMID: 32032844.
141. Wang SB, Tao Z, Li P. Lawsone suppresses azoxymethane mediated colon cancer in rats and reduces proliferation of DLD-1 cells via NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother*. 2017 May 1;89:152–61. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.169

142. Kadela-Tomanek M, Jastrzębska M, Marciniak K, Chrobak E, Bębenek E, Latocha M, et al. Design, synthesis and biological activity of 1,4-quinone moiety attached to betulin derivatives as potent DT-diaphorase substrate. *Bioorganic Chem.* 2021 Jan;106:104478. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104478 PubMed PMID: 33272711.
143. Tsao YC, Chang YJ, Wang CH, Chen L. Discovery of Isoplumbagin as a Novel NQO1 Substrate and Anti-Cancer Quinone. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 19;21(12). doi:10.3390/ijms21124378
144. Wang P, Gao C, Wang W, Yao LP, Zhang J, Zhang SD, et al. Juglone induces apoptosis and autophagy via modulation of mitogen-activated protein kinase pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2018 Jun;116(Pt B):40–50. doi:10.1016/j.fct.2018.04.004 PubMed PMID: 29627502.
145. Huang H, Xie H, Pan Y, Zheng K, Xia Y, Chen W. Plumbagin Triggers ER Stress-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Induction of ROS. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;45(1):267–80. doi:10.1159/000486773 PubMed PMID: 29357323.
146. Golovina EL, Serebryakova VA, Vaizova OE. Antitumor activity of synthetic naphthoquinone derivatives (review). *Drug Dev Regist.* 2025 Feb 14;14(1):103–11. doi:10.33380/2305-2066-2025-14-1-1852
147. Goleva TN, Lyamzaev KG, Rogov AG, Khailova LS, Epremyan KK, Shumakovich GP, et al. Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2020 Aug 1;1861(8):148210. doi:10.1016/j.bbabi.2020.148210
148. Patwardhan RS, Sharma D, Sandur SK. Thioredoxin reductase: An emerging pharmacologic target for radiosensitization of cancer. *Transl Oncol.* 2022 Mar 1;17:101341. doi:10.1016/j.tranon.2022.101341
149. Tang Q, Xie Y, Liu Y, Zheng L. Synthesis of mitochondria-targeted menadione cation derivatives: Inhibiting mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) and inducing apoptosis in MGC-803 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2022 Mar 15;60:128586. doi:10.1016/j.bmcl.2022.128586 PubMed PMID: 35085721.

150. Ma F, Li Y, Cai M, Yang W, Wu Z, Dong J, et al. ML162 derivatives incorporating a naphthoquinone unit as ferroptosis/apoptosis inducers: Design, synthesis, anti-cancer activity, and drug-resistance reversal evaluation. *Eur J Med Chem.* 2024 Apr;270:116387. doi:10.1016/j.ejmech.2024.116387
151. Yang H, Wu X, Li M, Wang Y, Guo M, Chen L, et al. Scaffold-leaping optimization of naphthoquinone derivatives as ferroptosis inducer against non-small lung cancer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2025 Dec;129:130360. doi:10.1016/j.bmcl.2025.130360
152. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med.* 2020 Feb 14;52(2):192–203. doi:10.1038/s12276-020-0384-2 PubMed PMID: 32060354; PubMed Central PMCID: PMC7062874.
153. De Souza AS, Dias DS, Ribeiro RCB, Costa DCS, De Moraes MG, Pinho DR, et al. Novel naphthoquinone-1H-1,2,3-triazole hybrids: Design, synthesis and evaluation as inductors of ROS-mediated apoptosis in the MCF-7 cells. *Bioorg Med Chem.* 2024 Mar;102:117671. doi:10.1016/j.bmc.2024.117671
154. Xu Z, Feng T, Wen Z, Li Q, Chen B, Liu P, et al. New Naphthalene Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Daldinia eschscholzii* MCZ-18. *Mar Drugs.* 2024 May 27;22(6):242. doi:10.3390/md22060242 PubMed PMID: 38921554; PubMed Central PMCID: PMC11204397.
155. Liu C, Shen GN, Luo YH, Piao XJ, Jiang XY, Meng LQ, et al. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Mar;96:9–19. doi:10.1016/j.biocel.2018.01.004 PubMed PMID: 29326072.
156. Li K, Wang B, Zheng L, Yang K, Li Y, Hu M, et al. Target ROS to induce apoptosis and cell cycle arrest by 5,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivative. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018 Feb 1;28(3):273–7. doi:10.1016/j.bmcl.2017.12.059 PubMed PMID: 29305189.
157. Qin YG, Mao ZC, Chen L, Ma XL, Wei JH, Huang RZ, et al. Discovery of a novel diphenyl piperidinone-naphthoquinone STAT3 inhibitor as chemoimmunotherapeutic agent. *Bioorganic Chem.* 2025 Dec;167:109274. doi:10.1016/j.bioorg.2025.109274

158. Novel 2-Amino-1,4-Naphthoquinone Derivatives Induce A549 Cell Death through Autophagy [Internet]. [cited 2026 Apr 16]. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/8/3289>
159. admin. DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF 1,4-NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES AS POTENTIAL EPITHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR INHIBITORS | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH [Internet]. 2019 Nov 30 [cited 2026 Apr 16]. Available from: <https://ijpsr.com/bft-article/design-synthesis-and-evaluation-of-14-naphthoquinone-derivatives-as-potential-epithelial-growth-factor-receptor-inhibitors/>
160. Dawood M, Hegazy MEF, Elbadawi M, Fleischer E, Klinger A, Bringmann G, et al. Vitamin K3 chloro derivative (VKT-2) inhibits HDAC6, activates autophagy and apoptosis, and inhibits aggresome formation in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2020 Oct;180:114176. doi:10.1016/j.bcp.2020.114176 PubMed PMID: 32721508.
161. Xi Q, Wang M, Jia W, Yang M, Hu J, Jin J, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Amidobenzimidazole Derivatives as Stimulator of Interferon Genes (STING) Receptor Agonists. *J Med Chem.* 2020 Jan 9;63(1):260–82. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01567 PubMed PMID: 31820985.
162. Sunassee SN, Veale CGL, Shunmoogam-Gounden N, Osoniyi O, Hendricks DT, Cairra MR, et al. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. *Eur J Med Chem.* 2013 Apr;62:98–110. doi:10.1016/j.ejmech.2012.12.048 PubMed PMID: 23353747.
163. Li G, Li Q, Sun H, Li W. Novel diosgenin-1,4-quinone hybrids: Synthesis, antitumor evaluation, and mechanism studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021 Nov;214:105993. doi:10.1016/j.jsbmb.2021.105993 PubMed PMID: 34478831.
164. Shao YY, Yin Y, Lian BP, Leng JF, Xia YZ, Kong LY. Synthesis and biological evaluation of novel shikonin-benzo[b]furan derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site. *Eur J Med Chem.* 2020 Mar 15;190:112105. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112105 PubMed PMID: 32035399.

165. Carullo G, Mazzotta S, Giordano F, Aiello F. Green Synthesis of New Pyrrolo [1,2-*a*] quinoxalines as Antiproliferative Agents in GPER-expressing Breast Cancer Cells. *J Chem.* 2021;2021(1):5596816. doi:10.1155/2021/5596816
166. Canovai A, Williams PA. Pyrroloquinoline quinone: a potential neuroprotective compound for neurodegenerative diseases targeting metabolism. *Neural Regen Res.* 2024 Apr 3;20(1):41–53. doi:10.4103/NRR.NRR-D-23-01921 PubMed PMID: 38767475; PubMed Central PMCID: PMC11246121.
167. Waseem AM, Elmagzoub RM, Abdelgadir MMM, Bahir AA, EL-Gawaad NSA, Abdel-Samea AS, et al. An insight into the therapeutic impact of quinoxaline derivatives: Recent advances in biological activities (2020–2024). *Results Chem.* 2025 Jan 1;13:101989. doi:10.1016/j.rechem.2024.101989
168. Parrino B, Carbone A, Ciancimino C, Spanò V, Montalbano A, Barraja P, et al. Water-soluble isoindolo[2,1-*a*]quinoxalin-6-imines: *In vitro* antiproliferative activity and molecular mechanism(s) of action. *Eur J Med Chem.* 2015 Apr 13;94:149–62. doi:10.1016/j.ejmech.2015.03.005
169. Zelina EY, Nevolina TA, Sorotskaja LN, Skvortsov DA, Trushkov IV, Uchuskin MG. Route to pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines *via* a furan ring opening-pyrrole ring closure sequence. *Tetrahedron Lett.* 2020 Feb 27;61(9):151532. doi:10.1016/j.tetlet.2019.151532
170. Perri M, Aiello F, Cione E, Carullo G, Amendola L, Mazzotta S, et al. Investigation of TNBC in vitro Antiproliferative Effects of Versatile Pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline Compounds. *Front Mol Biosci.* 2019 Mar 12;6. doi:10.3389/fmolb.2019.00012
171. Desplat V, Vincenzi M, Lucas R, Moreau S, Savrimoutou S, Rubio S, et al. Synthesis and Antiproliferative Effect of Ethyl 4-[4-(4-Substituted Piperidin-1-yl)]benzylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalinecarboxylate Derivatives on Human Leukemia Cells. *ChemMedChem.* 2017;12(12):940–53. doi:10.1002/cmdc.201700049
172. Aiello F, Carullo G, Giordano F, Spina E, Nigro A, Garofalo A, et al. Identification of Breast Cancer Inhibitors Specific for G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)-Expressing Cells. *ChemMedChem.* 2017 Aug 22;12(16):1279–85. doi:10.1002/cmdc.201700145

173. Desplat V, Geneste A, Begorre MA, Fabre SB, Brajot S, Massip S, et al. Synthesis of New Pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline Derivatives as Potential Inhibitors of Akt Kinase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008 Jan 1;23(5):648–58. doi:10.1080/14756360802205448 PubMed PMID: 18821254.
174. Guillon J, Le Borgne M, Rimbault C, Moreau S, Savrimoutou S, Pinaud N, et al. Synthesis and biological evaluation of novel substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives as inhibitors of the human protein kinase CK2. *Eur J Med Chem*. 2013 Jul 1;65:205–22. doi:10.1016/j.ejmech.2013.04.051
175. Guzmán C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D. ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PloS One*. 2014;9(3):e92444. doi:10.1371/journal.pone.0092444 PubMed PMID: 24647355; PubMed Central PMCID: PMC3960247.
176. Chen S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*. 2023 May;2(2):e107. doi:10.1002/imt2.107 PubMed PMID: 38868435; PubMed Central PMCID: PMC10989850.
177. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635 PubMed PMID: 23104886; PubMed Central PMCID: PMC3530905.
178. Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Shirley Liu X, Zhang Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*. 2012 Nov 1;28(21):2782–8. doi:10.1093/bioinformatics/bts515 PubMed PMID: 22923299.
179. Hiesinger K, Dar'in D, Proschak E, Krasavin M. Spirocyclic Scaffolds in Medicinal Chemistry. *J Med Chem*. 2020. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01473
180. Varela MT, Dias GG, de Oliveira LFN, de Oliveira RG, Aguiar FD, Nogueira JP, et al. Spirocyclic compounds as innovative tools in drug discovery for medicinal chemists. *Eur J Med Chem*. 2025 Apr 5;287:117368. doi:10.1016/j.ejmech.2025.117368

181. Skvortsov DA, Emashova SK, Kalinina MA, Dontsova OA. Cyanine mitochondrial dye with slightly selective cytotoxicity against A549 cancerous cells. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2021;354(3):2000281. doi:10.1002/ardp.202000281
182. Kolchanova AY, Lyamzaev KG, Valutsa N, Gladkova ED, Luzina OA, Ipatova DA, et al. Berberine C9-Derivatives Selective Cytotoxicity Depends on Balance Between Mitochondrial Damage and DNA Intercalation. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2026;359(2):e70199. doi:10.1002/ardp.70199
183. Green DR. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*. 2005 Jun 3;121(5):671–4. doi:10.1016/j.cell.2005.05.019 PubMed PMID: 15935754.
184. Zelina EY, Nevolina TA, Sorotskaja LN, Skvortsov DA, Et. A. Route to pyrrolo[1,2-a]quinoxalines via a furan ring opening-pyrrole ring closure sequence. *Tetrahedron Lett*. 2020. doi:10.1016/j.tetlet.2019.151532).
185. Kolchanova, A. Yu. *et al.* Berberine C9-Derivatives Selective Cytotoxicity Depends on Balance Between Mitochondrial Damage and DNA Intercalation. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **359**, e70199 (2026).
186. Green, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell* **121**, 671–674 (2005).
187. Zelina, E. Y., Nevolina, T. A., Sorotskaja, L. N., Skvortsov, D. A. & Et., A. Route to pyrrolo[1,2-a]quinoxalines via a furan ring opening-pyrrole ring closure sequence. *Tetrahedron Lett*. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151532> (2020) doi:10.1016/j.tetlet.2019.151532.
188. Spector D.V., Karetnikov G., Bublely A., Akasov R.A., Isaeva Yu.A., Egorova T.V., Martynov A.G., Bunin D., Skvortsov D.A., **Ipatova D.A.**, Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Mamed-Nabizade V., Kolmogorov V.S., Vaneev A.N., Rodin I.A., Vokuev M.F., Grishin Yu.K., Roznyatovsky V.A., Nikitina V.N., Beloglazkina E.K., Krasnovskaya O.O. Photoactivatable cisplatin-combretastatin-bodipy pt(iv) prodrug for dual-action light-controlled chemotherapy // *American Chemical Society Pharmacology and Translational Science*. — 2025. — V. 8. — №9. — P. 3296-3313. Импакт фактор 3,7 (JIF). EDN: AMRVSS. 0.9 п.л.
189. Krasnovskaya O.O., Akasov R.A., Spector D.V., Pavlov K.G., Bublely A.A., Kuzmin V.A., Kostyukov A.A., Khaydukov E.V., Lopatukhina E.V., Semkina A.S., Vlasova K.Yu., Sypalov S.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Vaneev A.N., Nikitina V.N., Skvortsov D.A., **Ipatova D.A.**, Mazur D.M., Zyk N.V., Sakharov D.A., Majouga A.G., Beloglazkina E.K. Photoinduced reduction of novel dual-action riboplatin pt(iv) prodrug // *American Chemical Society applied materials & interfaces*. — 2023. — V. — 15. — №10. — P. 12882-12894.

1-17	<chem>Cc1cccc1NC(=O)c1nn(c(c1[N+](=O)[O-])C(=O)Nc1cccc1C)C</chem>	0	0
1-18	<chem>CCOc1ccc(cc1)NC(=O)c1nn(c(c1[N+](=O)[O-])C(=O)Nc1ccc(cc1)OCC)C</chem>	0	0
1-19	<chem>COc1cccc(c1)NC(=O)c1nn(c(c1[N+](=O)[O-])C(=O)Nc1cccc(c1)OC)C</chem>	0	0
1-20	<chem>COc1ccc(cc1)NC(=O)c1nn(c(c1[N+](=O)[O-])C(=O)Nc1ccc(cc1)OC)C</chem>	0	0
1-21	<chem>COc1cc2c(cc1NC(=O)c1nn(cc1[N+](=O)[O-])C)oc1c2cccc1</chem>	0	0
Производные хроман-4-она			
15	<chem>O=C(Nc1ccncc1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	2
15-2	<chem>O=C(N1CCN(CC1)c1ccccn1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
15-3	<chem>O=C(NCc1ccncc1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
15-4	<chem>O=C(N1CCC(CC1)c1nc2c([nH]1)cccc2)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
15-5	<chem>O=C(Nc1ccc2c(c1)cc[nH]2)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
15-6	<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCc1c[nH]c2c1cccc2</chem>	0	0,5
15-7	<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCc1ccc(cc1)F</chem>	0	0,5
15-8	<chem>O=C(Nc1ncccc1C)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
15-9	<chem>COc1ccc2c(c1)[nH]c2CCNC(=O)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0
15-10	<chem>O=C(Nc1nc2c([nH]1)cccc2)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0
15-11	<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCCN1CCOCC1</chem>	0	0
15-12	<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCCN1cncc1</chem>	0	0
15-13	<chem>O=C(N1CCc2c1cccc2)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0
15-14	<chem>O=C(Nc1n[nH]cn1)COc1ccc2c(c1)O[C@]1(CC2=O)CCC(CC1)C(C)(C)C</chem>	0	0
15-15	<chem>COc1cc(OC)ccc1NC(=O)COc1ccc2c(c1)OC1(C</chem>	0	0

		<chem>C2=O)CCCCC1</chem>		
15-16		<chem>O=C(NCc1ccc1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0
15-17		<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCC(c1cccc1)O</chem>	0	0
16		<chem>Clc1ccc(cc1)C1(O)CCN(CC1)C(=O)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	1,5
17		<chem>O=C(Nc1ccc(cc1)O)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	1,5
18		<chem>O=C(Nc1nccs1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	1
19		<chem>O=C(Nc1ccc(cn1)C)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	1
20		<chem>COc1ccc2c(c1)c(CCNC(=O)COc1ccc3c(c1)OC1(CC3=O)CCCCC1)c[nH]2</chem>	0	0,5
15-1		<chem>O=C(N1C[C@@H]2C[C@H](C1)c1n(C2)c(=O)ccc1)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0,5
21		<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCN1CCOCC1</chem>	0	0,5
22		<chem>CC(NC(=O)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)CCc1ccc1</chem>	0	0,5
23		<chem>COC(=O)CNC(=O)COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1</chem>	0	0
39		<chem>O=C(Nc1ccncc1)COc1ccc2c(c1)occc(=O)c1ccc1</chem>	0	0
24		<chem>O=C(COc1ccc2c(c1)OC1(CC2=O)CCCCC1)NCCCN1CCCC1=O</chem>	0	0
40		Производные 1,4-нафтохинона		
40-1		<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)c2c1n1NC3(c4ccccc4)N(C)C(=O)N(C3(N=c1s2)c1cccc1)C</chem>	2	3
40-2		<chem>O=C1/C(=c/2\sc3=NC4(C(Nn3c2=O)(c2ccccc2)N(C(=O)N4C)C)c2ccccc2)/c2c(N1C)cccc2</chem>	1,5	0
40-3		<chem>COc1ccc(cc1O)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	1	0,5
40-4		<chem>CCN1c2ccccc2/C(=c\2/sc3=NC4(C(Nn3c2=O)(c2ccccc2)N(C(=O)N4C)C)c2ccccc2)/C1=O</chem>	1	0,5
40-5		<chem>[O-][N+](=O)c1ccc(cc1)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	1	0
40-6		<chem>O=c1/c(=C\c2ccco2)/sc2=NC3(C(Nn12)(c1cccc1)N(C)C(=O)N3C)c1cccc1</chem>	0,5	0
		<chem>COc1cc(ccc1O)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	0,5	0

45		<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)c2c1n1c(=NN=C(C1c1ccc1)c1ccccc1)s2</chem>	2	0
Производные пирроло[1,2a]хиноксалина				
48		<chem>O=C(N1Cc2ccc(C)n2c2ccccc12)c1ccc(OC)cc1</chem>	2	2
48-1		<chem>CC(=O)N(C1CC(C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1cc(cc1)[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-]c1ccccc1</chem>	0	0
48-2		<chem>COc1cc(cc(c1OC)OC)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1</chem>	0	0
48-3		<chem>COc1cccc(c1)NC1CC(C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1ccccc1</chem>	0	0.5
48-4		<chem>CC(=O)N[C@H]1C[C@@H](C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1ccccc1</chem>	1	0
48-5		<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1</chem>	0	0
48-6		<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccc(c(c1)[N+](=O)[O-])C)cccc2</chem>	1	0
48-7		<chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1ccccc2)Nc1ccccc1</chem>	0	0
48-8		<chem>COc1ccc(cc1)C1(C)CC(C)(C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1ccccc1</chem>	0	0
48-9		<chem>COc1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1</chem>	0	0
48-10		<chem>CCCCC(=O)N([C@H]1C[C@@H](C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1ccccc1)c1ccccc1</chem>	0	0
48-11		<chem>CC1CC(Nc2ccc(cc2)[N+](=O)[O-])c2c(N1C(=O)c1ccccc1)cccc2</chem>	0	0
48-12		<chem>CCCCCCC(=O)N([C@H]1C[C@@H](C)N(c2c1ccccc2)C(=O)c1ccccc1)c1ccccc1</chem>	0	0
48-13		<chem>COc1cccc(c1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1ccccc2)Nc1ccccc1</chem>	0.5	0
48-14		<chem>CCOc1ccc(cc1)C(=O)N1C(CC)C(C)C(c2c1ccccc2)Nc1ccccc1</chem>	1	0
48-15		<chem>Cc1ccc2c(c1)C(Nc1ccc(cc1)C)CC(N2C(=O)c1cc(cc1)[N+](=O)[O-])C</chem>	1	0
48-16		<chem>CCc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1c(C)ccc2)</chem>	0.5	0

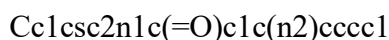
	<chem>Nc1cccc1C</chem>		
48-17	<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccc(c(c1)[N+](=O)[O-])Cl)cccc2</chem>	0	0
48-18	<chem>Br1cccc(c1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1</chem>	0	0
48-19	<chem>Cc1ccc2c(c1)C(C)(CC(N2C(=O)c1ccc(cc1)F)(C)C)c1cccc1</chem>	0.5	0
48-20	<chem>Ic1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1</chem>	0	0.5
48-21	<chem>Br1ccc(cc1)C1(C)CC(C)(C)N(c2c1cc(cc2)[N+](=O)[O-])C(=O)c1cccc1</chem>	0	0
48-22	<chem>Cl1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1cccc1</chem>	0	0
48-23	<chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1cccc1</chem>	0	0
48-24	<chem>Fc1cccc(c1)NC1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1cccc1</chem>	0	0
48-25	<chem>Cl1ccc(cc1)C(=O)N1CCC(=O)c2c1cccc2</chem>	0	0
48-26	<chem>Cl1ccc(c(c1)Cl)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1</chem>	1	0
48-27	<chem>Cl1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1</chem>	0.5	0
48-28	<chem>Br1ccc(cc1)C1(C)CC(C)(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1cccc1</chem>	0.5	0
48-29	<chem>Fc1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1cccc1</chem>	0	0
48-30	<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1cccc1F)cccc2</chem>	0	0.5
48-31	<chem>Br1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1cccc1</chem>	1.5	0
48-32	<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1cccc1I)cccc2</chem>	0	0
48-33	<chem>Fc1ccc(cc1)NC1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1cccc1</chem>	0	0
48-34	<chem>COc1ccc2c(c1)/C(=C\1/SC(=C(S1)C(=O)OC)C(=O)OC)/C(=S)C(N2C(=O)c1cccc1)(C)C</chem>	0	0
48-35	<chem>COC(=O)C1=C(S/C(=C\2/c3ccccc3N(C(C2=S)(C)C)C(=O)c2cccc(c2)F)/S1)C(=O)OC</chem>	0	0
48-36	<chem>COC(=O)C1=C(S/C(=C\2/c3ccc(cc3N(C(C2=S)(C)C)C(=O)c2cccc2)OC)/S1)C(=O)OC</chem>	0	0
48-37	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1</chem>	0	0
48-38	<chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1ccc(cc1)F)c1cccc1</chem>	0.5	0
48-39	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1ccc(cc1)OC)c1cccc1</chem>	0	0

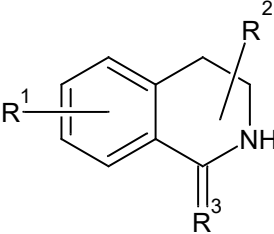
48-40	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N(C1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1ccc(cc1)Cl)c1ccccc1</chem>	1	0
48-41	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1cccs1)c1ccccc1</chem>	0	0
48-42	<chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccc(cc1)Cl</chem>	0	0
48-43	<chem>O=C(N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1)c1ccc2c(c1)OCO2</chem>	0	0
48-44	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(c1ccccc1)C(=O)/C=C/c1ccccc1</chem>	0	0
48-45	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1ccc(cc1)OC)c1ccccc1</chem>	0	0
48-46	<chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)N(C1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1ccc(cc1)Cl)c1ccccc1</chem>	0	0
48-47	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccc(cc1)Cl</chem>	1	0
48-48	<chem>Clc1cccc(c1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(c1ccccc1)C(=O)C</chem>	1	0
48-49	<chem>Cc1ccc2c(c1)C(C)(CC(N2C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-])(C)C)c1ccccc1</chem>	0	0
48-50	<chem>Cc1ccc2c(c1)C(C)(CC(N2C(=O)c1ccc(cc1)Cl)Cl)(C)C)c1ccccc1</chem>	1	0
48-51	<chem>Cc1ccc2c(c1)N(C(CC2Nc1cccc(c1)C)C)C(=O)c1ccc(cc1)F</chem>	0	0.5
48-52	<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccc(c(c1)Cl)Cl)cccc2</chem>	0	0
48-53	<chem>O=C(N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1)c1ccc(c(c1)Cl)Cl</chem>	0	0
48-54	<chem>CCC1C(C)C(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccccc1)cccc2</chem>	0	0
48-55	<chem>O=C(N1c2ccccc2C2(C(C1(C)C)C2(Cl)Cl)C)c1ccccc1</chem>	0	0
48-56	<chem>ClC1C(Cl)c2cc(C)ccc2N(C1C)C(=O)c1ccccc1</chem>	0	0
48-57	<chem>C[C@@@H]1C[C@@@H](Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-])cccc2</chem>	0	0
48-58	<chem>O=C(N1CCc2c1cccc2)c1ccc(cc1)S(=O)(=O)N1CCCC1</chem>	0	0
48-59	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	1	0
48-60	<chem>CC1CC(Nc2ccccc2)c2c(N1C(=O)c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)C)cccc2</chem>	0	0
48-61	<chem>CCCCC(=O)N(C1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1ccc(cc1)OC)c1ccccc1</chem>	0	0
48-62	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(c1ccccc1)C(=O)C</chem>	0	0
48-63	<chem>COc1ccccc1C(=O)N1c2ccccc2C(CC1(C)C)(C)c1ccccc1</chem>	0	0

	(C)c1ccc(cc1)Cl		
48-64	COc1cccc1C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)C)c1cccc1	0	0
48-65	COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1cccc1)c1cccc1	0	0
48-66	Clc1cccc1C(=O)N(C1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1cccc1Cl)c1cccc1	0	0
48-67	CCC(=O)N(C1CC(C)N(c2c1cccc2)C(=O)c1ccc(cc1)OC)c1cccc1	0.5	0.5
48-68	O=C(N1CCCc2c1cccc2)c1ccc(cc1)n1nccc1C	0	0.5
48-69	Clc1cc(ccc1C(=O)N1CCCc2c1cccc2)N1CCCCS1(=O)=O	0	0
48-70	O=C(N1CCCc2c1cccc2)c1cccc(c1)N1CCCCS1(=O)=O	0	0
48-71	O=C(N1CCCc2c1cccc2)c1ccc(cc1)S(=O)(=O)C1CCS(=O)(=O)C1	0	0
48-72	Brc1ccc(cc1)C(=O)N1[C@H](C)C[C@@H](c2c1ccc(c2)C)O	0.5	0.5
48-73	Brc1ccc(cc1)C(=O)N1[C@H](C)C[C@H](c2c1cccc2)Nc1cccc1	1	1
48-74	Brc1ccc(cc1)C(=O)N1[C@H](C)C[C@@H](c2c1cccc2)Nc1cccc1	1.5	0.5
48-75	COC(=O)C1=C(S/C(=C\2/c3cccc3N(C(C2=S)(C)C)C(=O)c2cccc(c2)[N+](=O)[O-])/S1)C(=O)OC	1.5	0
48-76	CCOc1ccc2c(c1)/C(=C/1\SC(=C(S1)C(=O)OC)C(=O)OC)/C(=S)C(N2C(=O)c1ccc(c(c1)[N+](=O)[O-])Cl)(C)C	1.5	0
48-77	CCOc1cccc2c1N(C(=O)c1ccc(cc1)F)C(C(=S)/C/2=C\1/SC(=C(S1)C(=O)OC)C(=O)OC)(C)C	1.5	0
48-78	CCOC(=O)C1=C(S/C(=C/2\c3cccc3N(C(C2=S)(C)C)C(=O)c2cccc3c2cccc3)/S1)c1cccc1	0.5	0
48-79	COc1cccc(c1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(c1cccc1)C(=O)CN1C(=O)c2c(C1=O)cccc2	0	0
48-80	Clc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)N(C(=O)c1ccc(cc1)Br)c1cccc1	0	0
48-81	O=C1Oc2cccc2C(=O)/C/1=C/Nc1cccc(c1)C(=O)N1CCCc2c1cccc2	0	0
48-82	O=C(c1cccc1)Nc1ccc2c(c1)CCCN2C(=O)c1ccc1	0	0
48-83	Brc1ccc(cc1)C(=O)Nc1ccc2c(c1)CCCN2C(=O)c1cccc1	0	0.5
48-84	COc1ccc(cc1)C(=O)N1C(C)CC(c2c1cccc2)Nc1cccc1	0	0
48-85	Brc1ccc2c(c1)C1C=CCC1C(N2C(=O)c1ccc(cc1	0	0

48-86)C)c1ccc(cc1)Br O=C1c2ccccc2N2[C@H]3N1c1ccccc1C(=O)C3 CC2	0	0
48-87		Fc1ccc2c(c1)C(C)CC1N2C(=O)c2c1cccc2C(=O))O	0	0
48-88		CC1C[C@@H]2c3cccc(c3C(=O)N2c2c1cccc2C)C(=O)O	0	0
48-89				
48-90		OCCCN(C(=O)c1ccc2n(c1)c(=O)c1c(n2)cc(c(c1) Br)c1ccc2c(c1)nc1n(c2=O)cccc1)OC)OC	1 0	0.5 0
48-91		COc1cc2c(cc1OC)nc1n(c2=O)cc(cc1)C(=O)O	0	0
48-92		O=C(N1c2ccccc2NC(C1c1c[nH]c2c1cccc2)c1c[nH]c2c1cccc2)c1cccc1	0	0
48-93		COc1ccc(cc1)Nc1c(cc(cc1[N+](=O)[O-])[N+] (=O)[O-])C(=O)N1CC(=O)Nc2c1cccc2	1	0
48-94		O=C1Nc2ccccc2N(C1)C(=O)c1cc(cc(c1Cl)[N+] (=O)[O-])[N+](=O)[O-]	0	0
48-95		Clc1cc(ccc1Cl)CN1c2ccccc2N(C(C1=O) (C)C)C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]	0	0
48-96		Clc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1cccc1	0.5	0
48-97		O=C1Nc2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c1cccc(c1) [N+](=O)[O-]	0.5	0
48-98		O=C1N(Cc2ccccc2)c2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c 1cccc(c1)[N+](=O)[O-]	0	0
48-99		Fc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C Cc1ccc(cc1)C	0	0
48-100		O=C1Nc2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c1ccc(cc1) [N+](=O)[O-] [O-][N+]	0	0
48-101		(=O)c1ccc(cc1)CN1c2ccccc2N(C(C1=O) (C)C)C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]	0	0
48-102		Clc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(c(c1)Cl)Cl	0	0
48-103		C=CCN1c2ccccc2N(C(C1=O) (C)C)C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]	0	0.5
48-104		COc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C) C)Cc1cccc1	0	1.5

48-105	<chem>O=C1N(C)c2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-106	<chem>Cc1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1cccc1</chem>	2	0
48-107	<chem>Br1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1cccc1</chem>	0	0
48-108	<chem>Br1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	1	0
48-109	<chem>Cc1ccc(c(c1)C)CN1c2ccccc2N(C(C1=O)(C)C)C(=O)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-110	<chem>Br1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(c(c1)Cl)Cl</chem>	0	0
48-111	<chem>Cc1ccc(c(c1)C)CN1c2ccccc2N(C(C1=O)(C)C)C(=O)c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-112	<chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1cccc1</chem>	0	0
48-113	<chem>O=C1N(Cc2ccc(c(c2)Cl)Cl)c2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-114	<chem>Clc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-115	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0.5	0
48-116	<chem>O=C1N(Cc2ccccc2)c2ccccc2N(C1(C)C)C(=O)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	0
48-117	<chem>Br1ccc(cc1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(cc1)C</chem>	0	0.5
48-118	<chem>Cc1cccc(c1)C(=O)N1c2ccccc2N(C(=O)C1(C)C)Cc1ccc(c(c1)Cl)Cl</chem>	0	0.5
48-119	<chem>Cc1cccc(c1)c1c2c(c3n1c1cccc1N[C@H]3c1ccc(c(c1)O)O)n(C)c(=O)n(c2=O)C</chem>	0	0
48-120	<chem>Oc1ccc(c(c1)O)[C@@H]1Nc2ccccc2n2c1c1n(C)c(=O)n(c(=O)c1c2c1cccc(c1)C)C</chem>	1.5	0
48-121	<chem>Cc1cccc(c1)c1n2c3ccccc3N[C@@H](c2c2c1c(=O)n(C)c(=O)n2C)c1cccc(c1)O</chem>	1	0
48-122	<chem>CC(=O)c1c(c2ccccc2)c2n(c1C)c1cccc1[nH]c2=O</chem>	0	0.5
48-123	<chem>CCOc1n2c(c(c1C(=O)C)c1cccc1)c(=O)[nH]c1c2cccc1</chem>	0	0.5
48-124	<chem>CCOc1n2c(c(c1C(=O)N)c1cccc1)c(=O)</chem>	0	0.5
48-125	<chem>[nH]c1c2cccc1</chem> <chem>O=c1[nH]c2ccccc2n2c1c(c1cccc1)c(c2c1cccc1)C(=O)c1cccc1</chem>	1	0



48-126		1.5	1.5
48-127		1	0
48-128		0	0
48-129		0	0
48-130		0	0
48-131		0	0
48-132		0	0
48-133		0	0
48-134		3	0
48-135		0	1
48-136		0	0
48-137		0	0
48-138		0.5	1
48-139		1.5	0
48-140		0	0
48-141		2	9
48-142		0	0
48-143		0	0
48-144		0.5	1
48-145		0	0
48-146		1	0
48-147		0	0
48-148		0	0

48-149	<chem>)Cc1cccn1 COc1c(OC)ccc2c1c(=O)n(CCNc1ncccn1)c1c2C (=O)c2c1cccc2</chem>	0	0
48-150	<chem>CCOc1cc(ccc1OC(F)F)C(=O)N1CCc2c(C1=C) cc1c(c2)OCCCO1</chem>	1.5	0
48-151	<chem>COc1cc2c(cc1OC)CCN(C2=C)C(=O)c1ccc(cc1)S(=O)(=O)N1CCCCC1</chem>	0	0

Таблица 1.2. Структуры в виде строчной записи (SMILES) производных исследуемых классов, для которых не были выделены высокоселективные соединения-хиты при FCCT скрининге.

	Smiles
na-1	<chem>CN(CCc1c2)[C@H](Cc(cc3)cc(Oc4ccc(C[C@@H] (c5c6O7)N(C)CCc5cc5c6OCO5)cc4)c3OC)c1cc7c2OC</chem>
na-2	<chem>CC(C)(C)c1ccc(C(C(C(c(cc2)ccc2Cl)=O)=C(C2=O)O)N2c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)cc1</chem>
na-3	<chem>CC(C)(C)c1ccc(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C(C2=O)O)N2c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)cc1</chem>
na-4	<chem>CC(C)c1ccc(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C(C2=O)O)N2c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)cc1</chem>
na-5	<chem>Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1OC)N(C1=O)c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)C1O)=O</chem>
na-6	<chem>CC(C)(C)c1ccc(C(C(C(c2ccc2)=O)=C(C2=O)O)N2c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)cc1</chem>
na-7	<chem>Cc(ccc(-c(c1cccc11)mnc1Nc(cc1)cc(C(NC)=O)c1OC)c1)c1S(NCc1cccc1)(=O)=O</chem>
na-8	<chem>CCC(C)[C@@H](C(NCCc1cccc(F)c1)=O)NC([C@H](Cc1c(C2c3c4cccc3) [nH]c3c1cccc3)N2C4=O)=O</chem>
na-9	<chem>CCC(C)[C@@H](C(NCc(cc1)ccc1OC)=O)NC([C@H](Cc1c(C2c3c4cccc3) [nH]c3c1cccc3)N2C4=O)=O</chem>
na-10	<chem>COc(ccc(CCNc1c(c(-c2cccc2)c(-c2cccc2)n2Cc3ccc3)c2nen1)c1)c1OC</chem>
na-11	<chem>Cc1ccc(C(C(C(c(cc2)ccc2Cl)=O)=C(C2=O)O)N2c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)cc1</chem>
na-12	<chem>Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1Cl)N(C1=O)c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)C1O)=O</chem>
na-13	<chem>Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc(Cl)c1)N(C1=O)c(s2)ncc2S(c(cc2)ccc2[N+] ([O-])=O)(=O)=O)C1O)=O</chem>
na-14	<chem>[O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(N(C(C(C(c(cc2)ccc2Cl)=O)=C2O)c3cccc(Cl)c3)C2=O)s1) (=O)=O)=O</chem>
na-15	<chem>CC(C)c1ccc(C(Cc2c3cnc(N(C(c(ccc4)c4Cl)=O)C(c(ccc4)c4Cl)=O)n2)CC3=O)cc1</chem>
na-16	<chem>COCCNC([C@H](Cc1cccc1)NC([C@H](Cc1c(C2c3c4cccc3) [nH]c3c1cccc3)N2C4=O)=O)=O</chem>
na-17	<chem>Cc1ccc(C2N(C(c3cccc3)=O)c(ccc3)c3NC(CC(C3)c(ccc4)c4F)=C2C3=O)cc1</chem>
na-18	<chem>[O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(N(C(C(C(c2ccc2)=O)=C2O)c(cc3)ccc3F)C2=O)s1) (=O)=O)=O</chem>
na-19	<chem>[O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(N(C(C(C(c2ccc2)=O)=C2O)c3cccc(Br)c3)C2=O)s1)</chem>

(=O)=O)=O

na-20 O=C(c1cccc(C(N(Cc2ccccc2)c2ncccc2)=O)c1)N(Cc1ccccc1)c1ncccc1

na-21 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(C(F)(F)F)(C(F)(F)F)NC(c(cc2)ccc2Cl)=O)s1)=(=O)=O)=O

na-22 CC(N(C)N(C1=O)c2ccccc2)=C1N(C(C(C(c1ccc(C)cc1)=O)=C1O)c(cccc2)c2F)C1=O

na-23 CCCOc(cc1)ccc1C(C(C(c(cccc1)c1F)N(C1=O)c2nc(C)c(C(OCC)=O)s2)=C1O)=O

na-24 COc1cc(C(C(C(c2cc(cccc3)c3o2)=O)=C(C2=O)O)N2c2nccs2)cc(OC)c1OC

na-25 Cc1cc(N(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)c3cc(Oc4ccccc4)ccc3)C2=O)no1

na-26 CCC(C)NC([C@H](C(C)C)NC([C@H](Cc1c(C2c3c4ccccc3)[nH]c3c1ccccc3)N2C4=O)=O)=O

na-27 COc1ccc(C(C2)CC(Nc3none3NC3c(cc(c(OC)c4)OC)c4OC)=C3C2=O)cc1

na-28 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(C(F)(F)F)(C(F)(F)F)NC(c2ccco2)=O)s1)=(=O)=O)=O

na-29 CCOC(c1cnc(-n2nc(C)cc2C)nc1Nc(cccc1)c1C(Nc(cc1)ccc1Br)=O)=O
CC(C1=NC(N(CCO)/C2=N/C(c(cccc3)c3[N+]

na-30 ([O-]=O)=O)=C3C=C2C#N)=CC=CN1C3=O

na-31 CCOC(c1c(C)nc(N(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)c3ccc(C)cc3)C2=O)s1)=O

na-32 CCN(CC)c1ccc(C2Nc(cccc3)c3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)cc1

na-33 CC(N(C1c(cc2)ccc2C#N)c(cccc2)c2NC(CC(C2)c(cc3)ccc3F)=C1C2=O)=O

na-34 CC(C)(C)c1ccc(C(C2)CC(Nc(cccc3)c3N(C3c4ccco4)C(C)=O)=C3C2=O)cc1

na-35 COc(ccc(C(C1)CC(Nc2nc(C(F)(F)F)mn2C2c3ccccc3)=C2C1=O)c1)c1OC

na-36 COc(cc1OC)c(C2Nc3none3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)cc1OC

na-37 COC(c1cc(C(Nc(s2)nc2S(c(cc2)ccc2[N+])([O-]=O)=(=O)=O)=O)cc([N+])([O-]=O)c1)=O

na-38 Cc(cc1)ccc1N(C(/C(/C(N1)=O)=C\c2cn(Cc3ccccc3)c3c2ccccc3)=O)C1=O

na-39 Cc1ncc(CN2CCOCC2)c2c1oc(C(c1cccc(NC(c3ccco3)=O)c1)=O)c2

na-40 O=C(c(cc1)ccc1-c1ccccc1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O

na-41 CC(C)(C)c1ccc(C(C2=C3Oc(cc(C)c(C)c4)c4C2=O)N(CC2OCCC2)C3=O)cc1

na-42 CCc(cc1)cc2c1nc(N(C(C(C(c1ccc(C)cc1)=O)=C1O)c3ccccc3)C1=O)s2

na-43 CC(C)(C)c1ccc(C(C2=C(C3=O)Oc(ccc(C)c4)c4C2=O)N3c2nc(C)c(C)s2)cc1

na-44 COc1cc(C(Cc2c3cnc(NC(c(cc4)ccc4F)=O)n2)CC3=O)cc(OC)c1OC

na-45 COc1cc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4F)c2C3=O)=O)cc(OC)c1OC

na-46 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c(cccc2)c2Oe2ccccc2)=O)s1)=(=O)=O)=O

na-47 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1N(C)C)N(CCN1CCOCC1)C1=O)=C1O)=O

na-48 CC(C)(Cc1c2C#N)OCc1c(C)nc2N1CCN(CC(Nc2cc(OC)ccc2)=O)CC1

na-49 COc1cccc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(ccc(OC)c4)c4OC)c2C3=O)=O)c1

na-50 COc1cc(C(Cc2c3cnc(NC(c4ccccc4)=O)n2)CC3=O)cc(OC)c1OC

na-51 COc(ccc(/C=C/C(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-]=O)=(=O)=O)=O)c1)c1OC

na-52 CC(C)(C)c1ccc(C(C2=C(C3=O)Oc(ccc(C)c4)c4C2=O)N3c2nc(C)cs2)cc1

na-53 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1ccccc1)N(C1=O)c2nc(ccc(F)c3)c3s2)=C1O)=O

na-54 CC(C)Oc1cccc(C(C2=C(C3=O)Oc(cc(cc4)OC)c4C2=O)N3c2nccs2)c1

na-55 Cc1noc2c1C(c(cc(cc1)OC)c1OC)C(C(CC(C1)c(cc3)ccc3O)=O)=C1N2

na-56 COc1cccc(C2Nc3none3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)c1OC

na-57 COc1cc(OC)c(C2Nc3nonc3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)cc1

na-58 OC(C(N(C1c(cc2)ccc2Cl)c2nccs2)=O)=C1C(c(cc1)cc2c1OCCO2)=O

na-59 Cc1cc(N(C(C2=C3Oc(cc(C)c(C)c4)c4C2=O)c2cc(OC)ccc2)C3=O)no1

na-60 Cc1noc2c1C(c1ccccc1)C(C(CC(C1)c(cc(cc3)OC)c3OC)=O)=C1N2

na-61 Cc1noc2c1C(c(cc1)ccc1C(OC)=O)C(C(CC(C1)c3ccccc3)=O)=C1N2

na-62 COc1cc(OC)c(C2n3nenc3NC(CC(C3)c(cccc4)c4O)=C2C3=O)cc1

na-63 COc1ccc(C(C2)CC(Nc3nenn3C3c(cc4)cc(O)c4OC)=C3C2=O)cc1

na-64 COc1ccc(C(C2)CC(Nc3nenn3C3c(cc4)cc(OC)c4O)=C3C2=O)cc1

na-65 COc1nccnc1NS(c(cc1)ccc1NC(NC(c(cc1)ccc1F)=O)=S)(=O)=O
na-66 CC(C)(C)c1ccc(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)N(CCCOC)C2=O)cc1
na-67 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1enc(NC(/C=C/c(cc2)cc3c2OCO3)=O)s1)(=O)=O)=O
na-68 Cc1cc(N(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)c3cccc([N+])([O-])=O)c3)C2=O)no1
na-69 COc1cc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4F)c2C3=O)=O)cc(OC)c1
na-70 COc1cc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c4cccc(Cl)c4)c2C3=O)=O)cc(OC)c1
na-71 COc1cc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4Cl)c2C3=O)=O)cc(OC)c1
na-72 CC(C)C(Nc1cccc(C(c2cc(c(CN3CCOCC3)enc3C)c3o2)=O)c1)=O
na-73 CCOc1ccc(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)N(Cc3ccco3)C2=O)cc1
na-74 COc(cc1)ccc1N(CC1)CCN1C(C=C1)=NN(CC(Nc2cnc2)=O)C1=O
na-75 CC(C)c1ccc(C(C(C(c2cccc2)=O)=C(C2=O)O)N2c2nc(C)c(C)s2)cc1
na-76 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2Cl)C2=C1Nc1nc(cccc3)c3n1C2c1ncccc1
na-77 Cc1ccc(C(C2)CC(Nc3nc(cccc4)c4n3C3c4cccs4)=C3C2=O)cc1
na-78 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc1nc(cccc3)c3n1C2c1cccc1
na-79 O=C(C(Cc1c(C2c3c4cccc3)[nH]c3c1cccc3)N2C4=O)NCc1cccs1
na-80 O=C(CC(c1cn2C3cccc3)c3c4ncccn4nc3)Nc3c1c2ccc3
na-81 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1enc(NC(C2Oc(cccc3)c3OC2)=O)s1)(=O)=O)=O
na-82 CC(C)c1ccc(C(Cc2c3enc(NC(c4cccc(F)c4)=O)n2)CC3=O)cc1
na-83 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cc(OC)ccc1)N(Cc1ccco1)C1=O)=C1O)=O
na-84 CCOC(c1c(C)nc(N(C(c2ccco2)C(C(c2ccco2)=O)=C2O)C2=O)s1)=O
na-85 CC(C)c(cc1)ccc1NC(C(C1)C(C(CC(C2)c3cccc3)=O)=C2NC1=O)=O
na-86 Cc1cc(N(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)c(cc3)ccc3OC)C2=O)no1
na-87 Cc1c(C)n(Cc2ccco2)c(N=CN2CCc(cc3)cc(OC)c3OC)c1C2=N
na-88 [O-][N+](c(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c3cccc(Cl)c3)c1C2=O)=O)=O
na-89 [O-][N+](c(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3Cl)c1C2=O)=O)=O
na-90 COc1cc2ccenc2c(NC(c(cc2)cc2)[N+])([O-])=O)c2N2CCCC2=O)c1
na-91 CC(N(C1c2ccco2)c(cccc2)c2NC(CC(C2)c3cccc3)=C1C2=O)=O
na-92 Cc1cc(N(C(C2=C3Oc(cc(C)c(C)c4)c4C2=O)c(cccc2)c2F)C3=O)no1
na-93 COc1cccc(C2Nc3none3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)c1
na-94 COc1cccc(C2Nc3none3NC(CC(C3)c4ccco4)=C2C3=O)c1OC
na-95 Cc1nn(C(c2cc(F)cc(F)c2)C(C(CC(C2)c(cc3)ccc3F)=O)=C2N2)c2n1
na-96 CC(C)(C)c(cc1)ccc1C(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O)=O
na-97 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1enc(NC(COc(cc2)Cl)c2Cl)=O)s1)(=O)=O)=O
na-98 [O-][N+](c1ccc(CC(Nc(s2)nc2S(c(cc2)ccc2[N+])([O-])=O)(=O)=O)=O)cc1)=O
na-99 CC(C)c1ccc(C(C2)CC(Nc3ncnn3C3c4cnc4)=C3C2=O)cc1
na-100 Oc1cccc(C2Nc(cccc3)c3NC(CC(C3)c4cccc4)=C2C3=O)c1
na-101 Cc1cc(N(C(C(C(c2c3)=O)=C4Oc2cc(C)c3Cl)c2cccc2)C4=O)no1
na-102 Oc1cccc(C2Nc3none3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4Cl)=C2C3=O)c1
na-103 COc1ccc(C(C2)CC(Nc3ncnn3C3c(ccc4)c4F)=C3C2=O)cc1
na-104 COc(ccc(C(C1)CC(Nc2ncnn2C2c3ccco3)=C2C1=O)c1)c1OC
na-105 COc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3Cl)c1C2=O)=O
na-106 COc1cccc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4F)c2C3=O)=O)c1
na-107 COc1cccc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4Cl)c2C3=O)=O)c1
na-108 COc(cccc1)c1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O)=O
na-109 Cc1ccc(C(Cc2c3enc(NC(c(ccc4)c4OC)=O)n2)CC3=O)cc1
na-110 O=C(c(ccc(Cl)c1)c1Cl)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3Cl)c1C2=O
na-111 COCCn1c2cccc(NC(c3cc(Nc4nccn4)ccc3)=O)c2cc1

na-112 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(ccc1)c1Cl)N(Cc1ccc1)C1=O)=C1O)=O
na-113 Cc1c(C)sc(N(C(C(C(c2ccccc2)=O)=C2O)c3ccc(C)cc3)C2=O)n1
na-114 Cc1ccc(C2C(C#N)=C(N)OC(CC(C3)c(cc4)ccc4OC)=C2C3=O)cc1
na-115 Cc1ccc(C(C2)CC(OC(N)=C(C3c(cc4)ccc4OC)C#N)=C3C2=O)cc1
na-116 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1ccccc1)N(Cc1cnc1)C1=O)=C1O)=O
na-117 COc(cc1)ccc1NC(C(C1)C(C(CC(C2)c3ccccc3)=O)=C2NC1=O)=O
na-118 O=C(N=C1Nc2cc(OC(F)(F)F)ccc2)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-119 Cc1ccc(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C(C2=O)O)N2c2nncs2)cc1
na-120 COc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c3ccccc3)c1C2=O)=O
na-121 Cc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O)=O
na-122 Cc1cccc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4F)c2C3=O)=O)c1
na-123 Cc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c3cccc(Cl)c3)c1C2=O)=O
na-124 Cc1cccc(C(Nc(nc2)nc(CC(C3)c(cc4)ccc4Cl)c2C3=O)=O)c1
na-125 Cc1ccc(C(Cc2c3cnc(NC(c(ccc4)c4Cl)=O)n2)CC3=O)cc1
na-126 O=C(c(ccc1)c1N(C=Nc1c2ccccc1)C2=O)NCc(cc1)ccc1F
na-127 O=C(c(cc1)ccc1F)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-128 O=C(c1cccc(F)c1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-129 O=C(c(cc1)ccc1Cl)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-130 O=C(c1cccc(Cl)c1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-131 O=C(c(cc1)ccc1Cl)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3Cl)c1C2=O
na-132 O=C(c1cccc(Cl)c1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3Cl)c1C2=O
na-133 O=C(c(ccc1)c1Cl)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-134 Cc(c(C)c1)cc2c1OC(C(N(CCOC)C1c3cc(O)ccc3)=O)=C1C2=O
na-135 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1ccccc1)N(Cc1ccc1)C1=O)=C1O)=O
na-136 CC(Nc1nc(SC)nn1C1c2cnc12)=C1C(Nc(cc1)ccc1F)=O
na-137 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1F)N(C1=O)c2nccs2)=C1O)=O
na-138 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1ccccc1)N(C1=O)c2ncccc2)=C1O)=O
na-139 Cc1ccc(C(C2)CC(OC(N)=C(C3c(cc4)ccc4F)C#N)=C3C2=O)cc1
na-140 Cc1cc(N(C(C(C(c2ccc(C)cc2)=O)=C2O)c3ccccc3)C2=O)no1
na-141 O=C(N=C1Nc2cc(C(F)(F)F)ccc2)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-142 O=C(CCN(C=Nc1c2ccccc1)C2=O)NCCn(cc1)c2c1ccc(Br)c2
na-143 CN(C)C(CNC(C(Nc(cc1)ccc1C(O)=O)=O)=O)c(cc1)ccc1OC
na-144 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c(ccc(Cl)c2)c2Cl)=O)s1)(=O)=O)=O
na-145 COc(ccc1)c1C(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O
na-146 COc(cc1)ccc1C(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O
na-147 O=C(c1cc(n(Cc2ccccc2)cc2)c2cc1)Nc(cc1)cc2c1[nH]cc2
na-148 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2Cl)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cccc1
na-149 Cc(cc1)cc2c1OC(C(N(C1c3cc(F)ccc3)c3nccs3)=O)=C1C2=O
na-150 Cc1c(C2n3nnc3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)ccc1
na-151 Cc1ccc(C2n3nnc3NC(CC(C3)c(cc4)ccc4F)=C2C3=O)cc1
na-152 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc1ncnn1C2c(cc1)ccc1Cl
na-153 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cccc1
na-154 COc1cccc(C2Nc3nonc3NC(CC(C3)c4ccco4)=C2C3=O)c1
na-155 COc1ccc(C2Nc3nonc3NC(CC(C3)c4ccco4)=C2C3=O)cc1
na-156 Cc1noc2c1C(c1cnc1)C(C(CC(C1)c3ccccc3)=O)=C1N2
na-157 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc1ncnn1C2c1cnc1
na-158 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3ccccc4ncnc34)=C2C1=O

na-159 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3cc4nccnc4cc3)=C2C1=O
na-160 Cc1ccc(C(C2=C(C3=O)O)c(ccc4)c4C2=O)N3c2nccs2)cc1
na-161 O=C(CC(C1)c2ccco2)C2=C1Nc1nonc1NC2c(ccc1)c1F
na-162 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc1ncnm1C2c1cccc1
na-163 Cn1ccc(C(CC(N2)=O)c3cn(Cc4cccc4)c4cccc2c34)c1
na-164 O=C(CC(C1)c2cccs2)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cc(F)ccc1
na-165 Oc1ccc(C2n3nenc3NC(CC(C3)c4cccc4)=C2C3=O)cc1
na-166 Cc(ccc1)c1NC(C(C1)SC(NCc(cc2)ccc2OC)=NC1=O)=O
na-167 CC(C)CN(C=Nc(cc1)c2cc1NC(Cc(cc1)ccc1OC)=O)C2=O
na-168 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c2cccc(Br)c2)=O)s1)(=O)=O)=O
na-169 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c2cccc(Cl)c2)=O)s1)(=O)=O)=O
na-170 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c(cc2)ccc2F)=O)s1)(=O)=O)=O
na-171 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc1)N(CCN(C)C)C1=O)=C1O)=O
na-172 Cc(cc1)ccc1S(NNC(CC(C1)c(cc2)ccc2OC)=CC1=O)(=O)=O
na-173 O=C(c(cc1)ccc1F)Nc(nc1)nc(CC(C2)c3cccc3)c1C2=O
na-174 O=C(c1cccc1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c(cc3)ccc3F)c1C2=O
na-175 Cc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c3cccc3)c1C2=O)=O
na-176 Cc(ccc1)c1Nc1nc(-c2cccc(OC)c2O)nc2cccc12
na-177 Cc1cc(C)nn1-c1cccc(C(Nc2nc(-c3ncccc3)cs2)=O)c1
na-178 Cc(c(C)c1)cc2c1OC(C(NC1c(cc3)ccc3C(OC)=O)=O)=C1C2=O
na-179 NC(OC(CC(C1)c2cccc2)=C(C2c(ccc3)c3F)C1=O)=C2C#N
na-180 NC(OC(CC(C1)c2cccc2)=C(C2c3cccc(F)c3)C1=O)=C2C#N
na-181 O=C(N=C1Nc(cc2F)cc(F)c2F)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-182 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c(cc3)ccc3C(OC)=O)=C2C1=O
na-183 O=C(c1cccc(Cl)c1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c3ccco3)c1C2=O
na-184 O=C(c(ccc1)c1Cl)Nc(nc1)nc(CC(C2)c3ccco3)c1C2=O
na-185 Cc(cc1)ccc1C(Nc(nc1)nc(CC(C2)c3ccco3)c1C2=O)=O
na-186 O=C(c(cc1)ccc1Cl)Nc1nc2cccc2c(-c2cccc2)n1
na-187 COc1ccc(C(C2)CC(NCc(cc3)cc4c3OCO4)=CC2=O)cc1
na-188 CC(C)C1C(C(CC(C2)c(cc3)ccc3OC)=O)=C2Nc2c1c(C)no2
na-189 O=C(C(Oc1e2cccc1)=C(C1c3cnccc3)C2=O)N1c1nccs1
na-190 O=C(CC(C1)c2ccco2)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cccc1
na-191 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2Cl)C2=C1Nc1ncnm1C2c1cccs1
na-192 Cc1ccc(C(C2)CC(Nc3ncnm3C3c4ccco4)=C3C2=O)cc1
na-193 Cc(cc1)cc(O)c1-c1n[nH]c(C(Nc2c(C(F)(F)F)ccc2)=O)c1
na-194 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1F)N(CC=C)C1=O)=C1O)=O
na-195 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc1)N(CCO)C1=O)=C1O)=O
na-196 CCN(Cc1en(CC)nc1C)C(C(Nc1cccc2nonc12)=O)=O
na-197 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc([N+])([O-])=O)c1)N(C)C1=O)=C1O)=O
na-198 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c2cnccc2)=O)s1)(=O)=O)=O
na-199 Cc1ccc(C(C2)CC(O)=C(/C=N/Ne3nc(C)cc(C)n3)C2=O)cc1
na-200 [O-][N+](c(cc1)ccc1S(c1cnc(NC(c2ccco2)=O)s1)(=O)=O)=O
na-201 O=C(N=C1Nc2cc(OC(F)(F)F)ccc2)S/C1=C\c1cnccc1
na-202 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc1)N(CCO)C1=O)=C1O)=O
na-203 [O-][N+](c1cc(-c2n[nH]c(CC(NCc3cnccc3)=O)n2)ccc1)=O
na-204 CCn1nc(C)c(CNC(C(Nc2cccc3nonc23)=O)=O)c1C
na-205 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc([N+])([O-])=O)c1)NC1=O)=C1O)=O

na-206 Cc1nc(N/N=C/C(C(CC(C2)c3ccccc3)=O)=C2O)nc(C)c1
na-207 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c(cc3)ccc3[N+])([O-])=O)=O)n1)CC2=O
na-208 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c1ccnc2ccccc12
na-209 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cc2ccnc2cc1
na-210 O=C(C(Oc1c2ccccc1)=C(C1c3ccccc3)C2=O)N1c1nccs1
na-211 O=C(CC(C1)c2ccccc2)C2=C1Nc1ncnn1C2c1cccc1
na-212 CCOC(C(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O)=O
na-213 CC(C)(C)CC(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O
na-214 O=C(c1ccccc1)Nc(nc1)nc(CC(C2)c3ccccc3)c1C2=O
na-215 Oc(cc1)ccc1N(C(/C/S1)=C/c2ccccc3ncnc23)=O)C1=S
na-216 Cc1nc(Nc2noc(CSc3nc(cccc4)c4s3)n2)nc(C)c1
na-217 O=C(C1=CC(C(CC(C2)c3ccccc3)=O)=C2NC1=O)N1CCCC1
na-218 C=CCOc1ccc(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)cc1
na-219 O=C(c1c(-c2ccccc2)nc(-n2ccccc2)s1)Nc1ccnc1
na-220 O=C(N=C1Nc2cccc(Br)c2)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-221 O=C(N=C1Nc2cc(F)ccc2)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-222 O=C1N=C(Nc2cnc2)S/C1=C\c1cccc2ncnc12
na-223 O=C(CC(C1)c2ccccc2)C(C(C2)c3ccccc3)=C1NC2=O
na-224 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c(cccc3)c3F)=C2C1=O
na-225 CC(C)CC(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)(=O)=O
na-226 CC(C)COc1cccc(C(NC(NCc2cnc2)=S)=O)c1
na-227 CN(C)c1ccc(C(C2)CC(Nc(cccc3)c3N)=CC2=O)cc1
na-228 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(ccc1)c1F)N(C)C1=O)=C1O)=O
na-229 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cc(OC)ccc1)NC1=O)=C1O)=O
na-230 Cc1c(CNC(C(Nc2ccccc3nonc23)=O)=O)c(C)nn1C
na-231 Cc1cc(C)nn1CCNC(C(Nc1cccc2nonc12)=O)=O
na-232 CC(C(C(c(cc1)cc(OC)c1O)N(C1=O)c2nccs2)=C1O)=O
na-233 O=C(CC(C1)c2ccccc2)C(C2)=C1NCN2C1CCCCC1.C1
na-234 CCOC(c1c(C)c(C(Nc2ccccc3nonc23)=O)c(C)[nH]1)=O
na-235 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c(cc3)ccc3F)=O)n1)CC2=O
na-236 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c3ccccc(Cl)c3)=O)n1)CC2=O
na-237 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c(cc3)ccc3Cl)=O)n1)CC2=O
na-238 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c(cccc3)c3F)=O)n1)CC2=O
na-239 CC(C)(Cc1c2cnc(NC(c3cc(C)ccc3)=O)n1)CC2=O
na-240 Cc1noc(C)c1CNC(C(Nc1cccc2nonc12)=O)=O
na-241 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c(cc1)ccc1F)NC1=O)=C1O)=O
na-242 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc(F)c1)NC1=O)=C1O)=O
na-243 COc1ccc(C(C2)CC(NC(C(C(O)=O)=C3)=O)=C3C2=O)cc1
na-244 CCOC(C1=CC(C(CC(C2)c3ccccc3)=O)=C2NC1=O)=O
na-245 Cc1nn(C)cc1CNC(C(Nc1cccc2nonc12)=O)=O
na-246 COc1c(/C=C2\SC(Nc(cc3)ccc3O)=NC2=O)cccc1
na-247 CC(C)c1ccc(C(C2)CC(Nc3nonc3N)=CC2=O)cc1
na-248 O=C(c1cc(Nc2ncccn2)ccc1)NCCc1cccc1
na-249 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3ccncc3)=C2C1=O
na-250 O=C(c1cc(-c2cnc2)n[nH]1)Nc1cccc2nonc12
na-251 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2F)C2=C1Nc(cccc1)c1N=C2
na-252 COc1ccc(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)cc1

na-253 COc1cccc(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)c1
 na-254 COc1c(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)cccc1
 na-255 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c(ccc(F)c1)c1F
 na-256 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2C3CC=CCC3)=C2C1=O
 na-257 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3cccc3)=C2C1=O
 na-258 N#C/C(/c1nc(cccc2)e2s1)=C\c1cccc2ncnc12
 na-259 CC(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3cnccc3)=C2C1=O
 na-260 O=C(c1n[nH]c2c1CCCC2)Nc1cccc2nonc12
 na-261 Oc1ccc(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)cc1
 na-262 Oc1cccc(C2Nc3nonc3NC(CCC3)=C2C3=O)c1
 na-263 CC(C)(C1)CC(Nc2nonc2NC2c3ccco3)=C2C1=O
 na-264 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c(cccc1)c1F
 na-265 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c(cc1)ccc1F
 na-266 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c(cccc1)c1Cl
 na-267 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cccc(Cl)c1
 na-268 O=C(C(Nc1cccc2nonc12)=O)NCc1ncccc1
 na-269 OC(c1ncnc1C(Nc1nonc11)ccc1Cl)=O)=O
 na-270 COc1ccc(C(C2)CC(NCC3OCCC3)=CC2=O)cc1
 na-271 Cc(cc1)ccc1C(C(C(c1cccc1)NC1=O)=C1O)=O
 na-272 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2Cl)C=C1NCCc1cccc1
 na-273 O=C(CC(C1)c2cccc2)C=C1NCCc1cccc1
 na-274 OC(c1ncnc1C(Nc1cccc2nonc12)=O)=O
 na-275 O=C(CC(C1)c2cccc(Cl)c2)C=C1Nc1cccc1
 na-276 COc1ccc(C(C2)CC(NC3CCCC3)=CC2=O)cc1
 na-277 NC(C1=CC(C(C2)c3cccc3)=O)=C2NC1=O)=O
 na-278 Cc1noc(C)c1CCC(Nc1cccc2nonc12)=O
 na-279 Cc1nc(NC(c(cc2)cc(OC)c2OC)=O)nc(C)c1
 na-280 CC(Nc(s1)nc1S(c(cc1)ccc1[N+])([O-])=O)=O)=O
 na-281 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cnccc1
 na-282 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2C1CC=CCC1
 na-283 O=C(CCC1)C2=C1Nc1nonc1NC2c1cccc1
 na-284 Cc1nc(NC(c(cc(cc2)Cl)c2OC)=O)nc(C)c1
 na-285 Cc1noc(C)c1CC(Nc1cccc2nonc12)=O
 na-286 O=C(CC(C1)c(cc2)ccc2Cl)C=C1Nc1ncn[nH]1
 na-287 Cc1ccc(C(C2)CC(Nc3nnc[nH]3)=CC2=O)cc1
 na-288 Nc1nonc1NC(CC(C1)c2cccc2)=CC1=O
 na-289 CC1=C(C)OC(CC(CC2=O)c3cccc3)=C2C1=O
 na-290 CC(c(cccc1)c1C1=O)=NN1c(nc1)nc1Br
 na-291 O=C(CC(C1)c2cccc2)C=C1Nc1nnc[nH]1
 na-292 Cc1nc(NC(c(c(Cl)ccc2)c2Cl)=O)nc(C)c1
 na-293 Cc1nc(NC(c(cc(cc2)Cl)c2Cl)=O)nc(C)c1
 na-294 Cc1nc(NC(c(ccc(Cl)c2)c2Cl)=O)nc(C)c1
 na-295 [O-][N+](c(cc1)cc(Cl)c1C(Nc1ncccn1)=O)=O
 na-296 [O-][N+](c(cc1)ccc1C(Nc1ncccn1)=O)=O
 na-297 O=C(c1ncccc1)Nc1cccc2nonc12
 na-298 O=C(c(cccc1)c1C1=O)N1c1ncccn1
 na-299 Nc1nonc1-c1noc(N2CCCCC2)n1

na-300	<chem>OC(CC(C1)c(cc2)cc(Cl)c2Cl)=CC1=O</chem>
na-301	<chem>CC(CC(C1)c(cc2)ccc2OC)=CC1=O</chem>
na-302	<chem>NC(CC(C1)c2ccccc2)=CC1=O</chem>
na-303	<chem>OCCN(c1nonc1C(N1)=O)C1=O</chem>
na-304	<chem>Nc1nc(-c(cc2)ccc2F)no1</chem>
na-305	<chem>CC(C1)=Nc2nonc2NC1=O</chem>
na-306	<chem>CC(Nc1nonc1N1)=CC1=O</chem>

Таблица 2. Цитотоксичность и селективность действия производных соединения 45 (нафтотиазолотриазоновые производные) в FCCT. Приведены рейтинги селективности в моделях рака легкого и рака молочной железы.

ID	SMILES	Модель рака легкого	Модель рака молочной железы
46	<chem>O=C(c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-])Oc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1ccc2</chem>	0	3
47	<chem>O=C(c1cccc(c1)[N+](=O)[O-])Oc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1ccc2</chem>	1	3
49	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)OC(=O)c1cccc1[N+](=O)[O-])n1nnc2c1cccc2</chem>	2.5	2
49-1	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1ccc(cc1)OC(=O)c1cccc1[N+](=O)[O-])n1nnc2c1cccc2</chem>	2.5	2
49-2	<chem>COc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	2.5	1.5
49-3	<chem>O=C1C(=C(/N=C/c2cc(ccc2O)[N+](=O)[O-])C(=O)c2c1cccc2)/N=C/c1cc(ccc1O)[N+](=O)[O-]</chem>	2.5	1.5
49-4	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)c2c1n1NC3(c4ccccc4)N(C)C(=O)N(C3N=c1s2)c1cccc1)C</chem>	2	3
49-5	<chem>[N-]=[N+]=NC1=C(N(c2ccccc2)C(=O)C)C(=O)c2c(C1=O)ccc2</chem>	2	2
49-6	<chem>COc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	2	1.5
49-7	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)OS(=O)(=O)c1cccc1)n1nnc2c1cccc2</chem>	2	1
49-8	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)c2c1n1c(=NN=C(C1c1cccc1)c1cccc1)s2</chem>	2	0
49-9	<chem>O=C(c1cccc1)Oc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	1.5	1.5
49-10	<chem>O=C1/C(=c/2\sc3=NC4(C(Nn3c2=O)(c2ccccc2)N(C(=O)N4C)C)c2ccccc2)/c2c(N1C)cccc2</chem>	1.5	0
49-11	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1ccc(cc1)N(C)C)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	2.5
49-12	<chem>Clc1ccc(cc1)C(=O)Oc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	2.5

49-13	<chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)Oc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	2
49-14	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)OC(=O)c1cccc1Cl)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	2
49-15	<chem>Cc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	1.5
49-16	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)[N+](=O)[O-])n1nnc2c1cccc2</chem>	1	1.5
49-17	<chem>COc1ccc(cc1O)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	1	0.5
49-18	<chem>CCN1c2ccccc2/C(=c\2/sc3=NC4(C(Nn3c2=O)(c2cccc2)N(C(=O)N4C)C)c2cccc2)/C1=O</chem>	1	0.5
49-19	<chem>[O-][N+](=O)c1ccc(cc1)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	1	0
49-20	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1ccc(cc1)C(=O)C)n1nnc2c1cccc2</chem>	1	0
49-21	<chem>O=C(c1cccc1)Oc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0.5	2
49-22	<chem>O=C(c1ccc(cc1)NC1=C(N2CCCCC2)C(=O)c2c(C1=O)cccc2)/C=C/c1cccc(c1)[N+](=O)[O-]</chem>	0.5	1.5
49-23	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1ccc(cc1)OC(=O)c1cccc1Cl)n1nnc2c1cccc2</chem>	0.5	1
49-24	<chem>O=C1C(=C(N2CCN(CC2)Cc2ccc3c(c2)OCO3)C(=O)c2c1cccc2)NS(=O)(=O)c1cccc1</chem>	0.5	1
49-25	<chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)Oc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-26	<chem>O=c1/c(=C\c2ccco2)/sc2=NC3(C(Nn12)(c1cccc1)N(C)C(=O)N3C)c1cccc1</chem>	0.5	0
49-27	<chem>COc1cc(ccc1O)/C=c\1/sc2=NC3(C(Nn2c1=O)(c1cccc1)N(C(=O)N3C)C)c1cccc1</chem>	0.5	0
49-28	<chem>Clc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0.5	0
49-29	<chem>CCN(c1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2)CC</chem>	0	2.5
49-30	<chem>CCCCOC(=O)c1ccc(cc1)NC1=C(N2CCCCC2)C(=O)c2c(C1=O)cccc2</chem>	0	2.5
49-31	<chem>COc1cccc1NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1.5
49-32	<chem>COc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1.5
49-33	<chem>Cc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1.5
49-34	<chem>CCN(C1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2)CC</chem>	0	1.5
49-35	<chem>Oc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1.5
49-36	<chem>OC(=O)CCCCCCCCCN1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-37	<chem>CNC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-38	<chem>Oc1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-39	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)C(F)(F)F)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-40	<chem>Br1ccc(cc1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-41	<chem>Clc1cccc(c1)NC1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1

49-42	<chem>O=C1C(=C(N2CCCCC2)C(=O)c2c1ccc(c2)S(=O)(=O)N1CCCCC1)N1CCCCC1</chem>	0	1
49-43	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1NC(C)(C)C)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-44	<chem>CCN(C1=C(C(=O)c2c(C1=O)cccc2)n1nnc2c1cccc2)CC</chem>	0	1
49-45	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1cccc(c1)C(F)(F)F)n1nnc2c1cccc2</chem>	0	1
49-46	<chem>O=C1c2ccccc2C(=O)C(=C1Nc1ccc(cc1)C(=O)O)n1nnc2c1ccc2</chem>	0	1

Таблица 3. Цитотоксичность производных соединения **45** (нафтотиазолотриазоновых производных) согласно анализу МТТ.

ID	IC ₅₀ для клеточной линии (мкМ)			
	HEK293T	MCF7	VA13	A549
47	1,2±0,5	2,1±0,1	2,4±0,1	0,56±0,08
49-1	0,94±0,02	0,075±0,006	0,28±0,02	0,16±0,02
49-2	2,1±0,1	2,2±0,2	0,51±0,08	1,2±0,1
49-5	9.6±0,2	6.6±0,3	4.9±0,1	1,12±0,06
49-6	3.2±0,3	11±1	17±2	13.2±1
49-8	1,2±0,3	3,4±0,2	1,5±0,2	1,1±0,1
49-10	1,8±0,1	2,2±0,3	0,52±0,04	2.2±0,16
49-14	0,13±0,08	2,6±0,2	1.2±0,04	2,3±0,2
49-19	0,71±0,07	0,7±0,1	0,31±0,02	1,4±0,4
49-22	1,9±0,1	0,9±0,2	1±0,4	2,3±0,1
49-27	1,7±0,2	1,5±0,2	1,15±0,08	3,7±0,2
49-28	6,4±0,3	2,9±0,2	2,5±0,2	9,6±0,4
49-29	9±1	0,43±0,04	6±1	23±4
49-30	2.7±0,4	2,3±0,2	1,0±0,1	0,81±0,09
49-31	1,69±0,08	1,8±0,1	0,75±0,03	1,6±0,6
49-32	3,4±0,3	2,8±0,2	1,07±0,04	1,9±0,2
49-35	63±4	59±5	46±2	94±8
49-36	8,5±0,3	5,9±0,2	5,3±0,1	8,5±0,3
49-37	1,85±0,09	1,28±0,08	0,96±0,03	1,6±0,1
49-39	5,84±0,09	1,7±0,4	0,62±0,03	1,5±0,07
49-41	15±2	12±2	0,65±0,04	2.7±0,2

Таблица 4: Значения торможения роста в моделях ксенографтов у мышей с привитой опухолью (A549)

Группа	Сутки от начала лечения
--------	-------------------------

		4	7	10	14	17	21
1	49 20 мг/кг	10,6	27,5	42,5	61,0	65,0	67,9
2	49 10 мг/кг	2,4	23,4	34,0	41,0	41,0	45,7
3	49 5 мг/кг	2,4	11,9	11,8	26,3	24,4	22,1
4	Доксорубицин 5 мг/кг	9,0	26,0	45,2	58,6	62,0	65,2

Таблица 5: Объемы опухолей (мм³) у мышей в моделях ксенографтов у мышей с привитой опухолью (A549), среднее и стандартная ошибка (M±SEM), мм³

Группа		Сутки от начала лечения						
		1	4	7	10	14	17	21
1	Контроль	63,4±13,2	132,6±18,3	363,8±37,2	665,7±67,7	1287,5±116,4	1595,8±151,8	1905,3±174,7
2	49 20 мг/кг	62,8±14,1	118,5±14,7	263,6±27,4	382,4±63,5	501,7±85,8	557,3±106,2	610,6±116,2
3	49 10 мг/кг	60,5±12,7	129,4±19,4	278,5±32,6	439,2±58,3	758,4±77,2	940,6±145,2	1033,4±153,8
4	49 5 мг/кг	63,1±9,7	135,3±32,4	320,5±28,4	586,9±66,3	947,7±70,2	1205,4±88,5	1482,4±97,3
5	Доксорубицин 5 мг/кг	62,4±14,6	120,6±37,2	268,9±27,5	364,4±46,3	532,4±142,4	605,8±136,9	661,9±166,8

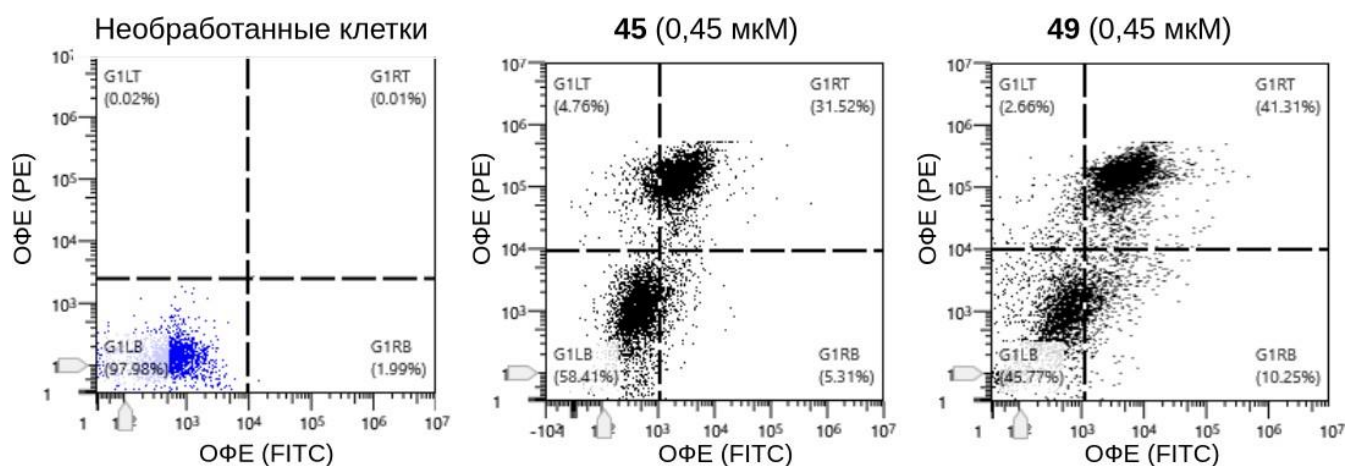


Рисунок 1. Анализ клеточной гибели клеток A549, обработанные соединениями **45** и **49**, PE — интенсивность флуоресценции пропидия иодида, FITC — интенсивность связанного аннексина, конъюгированного с AlexaFluorofor488

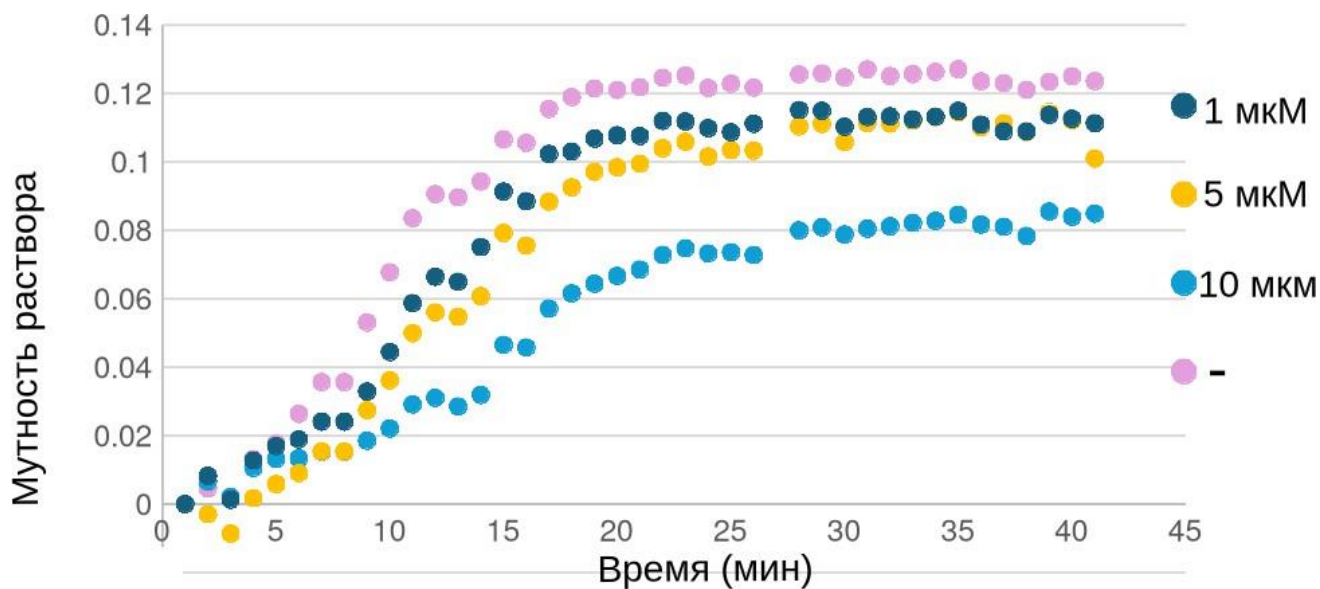


Рисунок 2. Турбидиметрическое измерение полимеризации тубулина. Измерялась полимеризация тубулина без препарата или с 1 мкМ/5 мкМ/10 мкМ соединения-лидера **77** (производное пирроло[1,2α]хиноксалина). Замедление нарастания мутности раствора свидетельствует об ингибировании полимеризации тубулина соединением **77**.