

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*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- $\alpha$ ]хиноксалина и фотоактивируемых  
соединений Pt**

Специальность 1.4.9. Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Диссертация подготовлена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель Скворцов Дмитрий Александрович,**

кандидат химических наук

**Официальные оппоненты**

**Шахпаронов Михаил Иванович,**

доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории мембранных и биоэнергетических систем, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

**Иванов Александр Владимирович,**

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

**Шутков Илья Александрович,**

кандидат химических наук, ассистент кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «23» июня 2026 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3949>

Автореферат разослан « » мая 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук



Ю.Ю. Агапкина

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

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

Согласно отчету CDER "*Advancing Health Through Innovation*" за 2025 год, около половины одобренных FDA противоопухолевых препаратов являются малыми органическими молекулами. Большинство новых малых молекул 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 смещен на селективность и персонализацию терапии. Особое внимание в биоорганической и медицинской химии при поиске новых терапевтически активных малых органических молекул уделяется привилегированным структурным фрагментам. Привилегированные структурные фрагменты легко поддаются химическим модификациям и входят в структуру многих соединений с уже известной биологической активностью. Методологически поиск новых лекарственных средств продолжает во многом опираться на фенотипические тесты. Значительную долю в перечне недавно одобренных FDA препаратов составляют молекулы, выявленные в ходе фенотипических скринингов, не требующих предварительного знания молекулярной мишени. Такая стратегия ценна для открытия «первых в классе» лекарственных средств и выявления новых биологических мишеней. 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 являются малые органические молекулы, в частности, относящиеся к структурным производным 1,4-нафтохинона, пирроло[1,2 $\alpha$ ]хиноксалина, пиразолкарбоксамиды, хроман-4-она, а также фотоактивируемые соединения платины, конъюгированные с фотосенсибилизаторами. Предметами исследования являются избирательность действия и цитотоксичность исследуемых 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 $\alpha$ ]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**

Исследование проводилось на клеточных линиях человека различной этиологии. 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 совместно 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 определялся рейтинг селективности (SR), соответствующий числу последовательных разведений, при которых наблюдалась двукратная и более селективность в FCST тесте.

Цитотоксичность исследуемых производных в монокультурах клеточных линий определяли МТТ тестом. Селективность соединений в МТТ тесте определялась как соотношение IC<sub>50</sub> для клеток 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  $IC_{50}$  находилась в наномолярном или низком микромолярном диапазоне.

Влияние на клеточный цикл и клеточную гибель определяли методом проточной цитометрии, окрашивая клетки растворами пропидия йодида 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 иммуоцитохимии и турбидиметрическим методом на выделенном тубулине.

Для оценки стресса ЭПР измеряли экспрессию генов ATF4 и количество сплайсированной формы XBP1s методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени; а также изменение уровня фосфорилированной формы белка eIF2 $\alpha$  с помощью вестерн-блоттинга.

При создании физиологически приемлемой водорастворимой формы соединений-лидеров 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 $\alpha$ ]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 $\alpha$ ]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 $\alpha$ ]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 диссертации докладывались на пяти конференциях, 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**

Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

## **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 данные о цитотоксичности и селективности исследуемых соединений, выполнен анализ связи структура-активность для 4 структурных классов (работы [1-3]). Дизайн направленной модификации соединений проводился 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 $\alpha$ ]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). Эксперименты *in vivo* проведены Покровским В.С. и Бабаевой Г.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Автором выполнены эксперименты, на основании результатов которых возможно предположить механизмы действия соединений-лидеров, включая анализ клеточного цикла и клеточной гибели, анализ индукции стресса ЭПР через оценку изменения уровня фосфорилированной формы eIF2 $\alpha$ , 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 и проведен анализ цитотоксичности новых фотоактивируемых соединений Pt (работы [4-5]).

## **Структура и объём 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 сборки коллекции соединений. Выбор производных проводился по принципу структурного подобия (соединения были получены из коллекции химических соединений IBScreen).

Для оценки цитотоксичности и селективности соединений был проведен скрининг с использованием флуоресцентных сокультур клеточных линий (FCCT). Клетки опухолевой и неопухолевой этиологии культивировались совместно, что позволяет отчасти смоделировать опухолевое микроокружение.

По результатам проведенного скрининга были выделены соединения-хиты, рейтинг селективности (SR) которых был равным или превышал 2 по крайней мере в одной из используемых моделей.

Дальнейшая работа была сосредоточена на четырех классах соединений:

1. производные пиразолкарбоксамида,
2. производные хроман-4-она,
3. производные 1,4-нафтохинона,
4. производные пирроло[1,2 $\alpha$ ]хиноксалина

Для каждого из четырех выделенных классов были подобраны коммерчески доступные и/или синтезированы коллегами отдельные коллекции соединений. При их создании были определены ключевые точки для рациональных модификации и оптимизации структуры фармакофоров. Номера обсуждаемых в тексте соединений соответствуют номерам веществ в используемых в работе коллекциях. Далее будет приведено описание исследований каждого из классов соединений, включая новые фотоактивируемые производные платины.

### Производные пиразолкарбоксамида

Соединением-лидером в классе производных пиразолкарбоксамида стало вещество **2**, SR которого составил 3,0 в модели рака легкого и 2,0 в модели рака молочной железы (Рисунок 1).

Ввиду высокой селективности в обеих моделях FCCT, соединение **2** было исследовано на 13 клеточных линиях различной этиологии методом МТТ. Максимальная токсичность зафиксирована для линий клеток рака толстого кишечника HCT116 и

предстательной железы PC3 ( $IC_{50} \sim 0,7 \text{ мкМ}$ ) (Рисунок 1), которые характеризуются высокой скоростью пролиферации. Однако для быстро пролиферирующей неопухолевой линии HEK293T значение  $IC_{50}$  составило  $\sim 17 \text{ мкМ}$ , что в 24 раза превышает показатели для линий PC3 и HCT116. Отсутствие выраженной токсичности для HEK293T при сопоставимой скорости деления клеток позволяет предположить, 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.

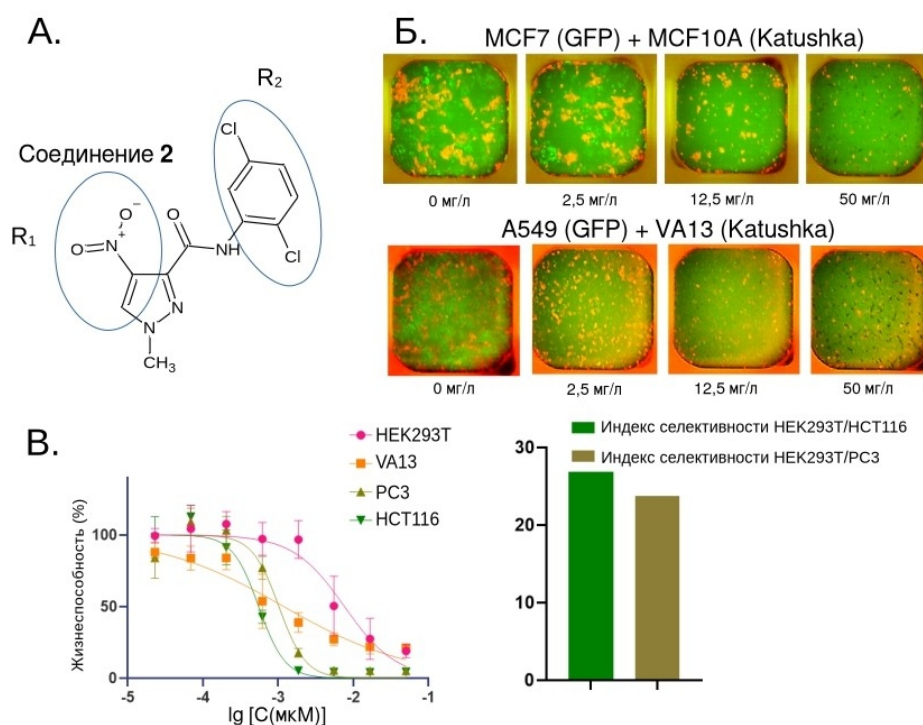


Рисунок 1. А. Структура соединения-лидера **2**,  $R_1$  и  $R_2$  выделены как значимые структурные элементы фармакофора. Б. Избирательность действия соединения-лидера в сокультурах клеток. Вплоть до концентрации 2,5 мкг/мл наблюдается преобладание красной флуоресценции (клетки неопухолевой этиологии). В. Цитотоксичность соединения-лидера в монокультурах клеточных линий. Представлены зависимости жизнеспособности клеток от концентрации соединения и индексы селективности

Нами была также изучена цитотоксичность и селективность 12 структурных производных соединения **2** (замены были введены по положениям  $R_1$  и  $R_2$ ; Рисунок 1), но все проведенные модификации не приводили к улучшению свойств соединений по сравнению с исходным. Вещество **2** осталось соединением-лидером и для него была разработана инъекционная форма для исследований *in vivo*. 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. При однократном введении препарата в хвостовую вену мышей в дозе 5 мг/кг признаков токсичности соединения зафиксировано не было. Исследование противоопухолевого действия проводилось на мышинной модели перевиваемого лимфолейкоза Р388. При дозе 5 мг/кг соединение **2** проявляет умеренный противоопухолевый эффект, обеспечивая увеличение продолжительности жизни 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 соединение успешным в его нынешнем виде.

### Производные хроман-4-она

Структурный фрагмент хроман-4-она относится к числу привилегированных структур в медицинской химии. В ходе анализа библиотеки соединений особое внимание было уделено его спироциклическим производным, интерес с которым обусловлен их объёмной и жёсткой структурой, которая может обеспечивать избирательное взаимодействие с мишенями. В FCST были проанализированы 28 соединений, содержащих спироциклогексан, соединённый с хроман-4-оном (Рисунок 2).

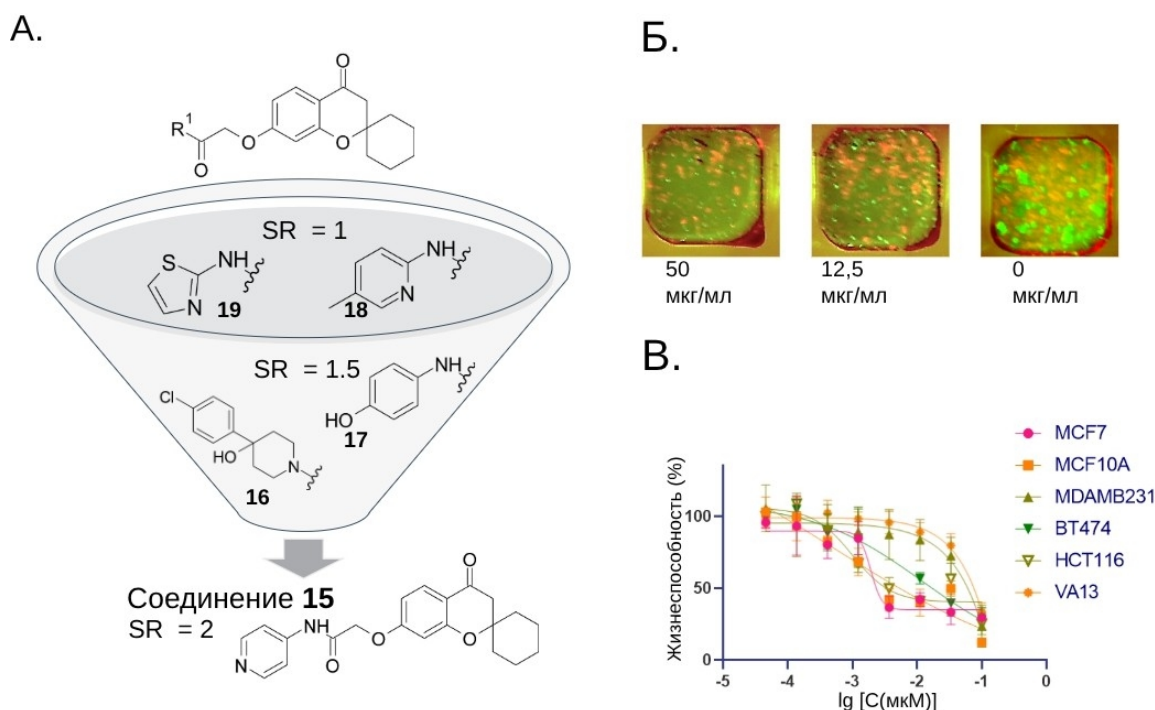


Рисунок 2. А. Последовательная фильтрация и анализ структура-активность производных хроман-4-она. Б. Цитотоксичность соединения **15** в модели рака молочной железы (FCST) В. Цитотоксичность соединения **15** в монокультурах клеточных линий (MTT)

Соединение **15** в FCCT показало наибольшую селективность: SR в модели рака молочной железы составил 2; в монокультурах соединение проявило наиболее выраженную цитотоксичность в низком микромолярном диапазоне в отношении клеточных линий MCF7 и MCF10A (Рисунок 2).

Соединение **15** было выбрано в качестве базового для дальнейшей оптимизации структуры. Нами были найдены заместители, введение которых в структуру сопровождалось увеличением селективности и/или токсичности относительно исходного соединения (**15**): 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**). Было принято решение объединить все наиболее эффективные модификации в структуре соединения **38** для получения соединения-лидера (Рисунок 3А).

Соединение **38** проявило более высокую токсичность в отношении клеток рака молочной железы MCF7 по сравнению с прототипом **15**, и улучшенную селективность к неопухолевым клеткам линий MCF10A и VA13 (Рисунок 3Б). Согласно результатам анализа клеточного цикла, вещество **38** индуцирует остановку в G1-фазе (в клетках MCF7). При оценке механизма гибели клеток была зафиксирована индукция апоптоза (Рисунок 3В).

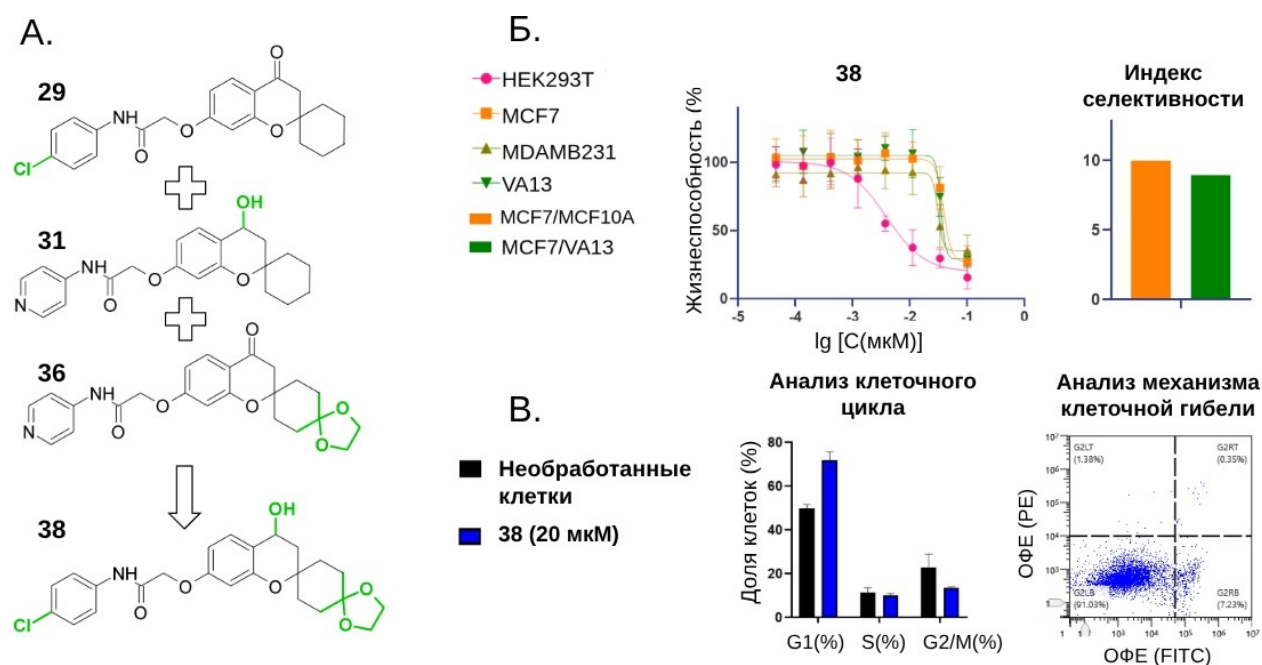


Рисунок 3. А. Объединение всех оптимальных заместителей в одной структуре Б. Исследование цитотоксичности соединения-лидера в монокультурах клеточных линий (методом МТТ) В. Анализ клеточного цикла и клеточной гибели клеток MCF7, обработанных соединением-лидером

Таким образом, для производных спироциклогексанхроман-4-она были проведены

последовательная оптимизация структуры и анализ связи структура-активность. Сочетание трех наиболее перспективных структурных замен в одном соединении (**38**) привело к получению соединения-лидера данного класса. Соединение **38** демонстрирует более высокую, 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).

### Производные 1,4-нафтохинона

Найденное ранее нашей исследовательской группой соединение **40** (Рисунок 4А) обладало избирательной цитотоксичностью как в модели рака легкого (SR = 2), так и в модели рака молочной железы (SR = 3). В структуре данной молекулы нами были выделены два ключевых фрагмента: гетероциклический триазолотриазиновый 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 (Рисунок 4Б).

Для соединения **45** была собрана коллекция из 60 структурных производных. В библиотеке IBScreen не представлены близкие структурные аналоги **45**, содержащие нафтотриазолотриазиновые фрагменты. Поиск по подобию подструктур привел к выбору бензотриазолов, соединенных с 1,4-нафтохиноновым фрагментом (Рисунок 4Г). В данном каркасе воспроизводится структурно похожее пространственное расположение трех атомов азота с хинонным фрагментом. По результатам проведенного скрининга единственным соединением, оказавшимся активным и избирательно цитотоксичным как в сокультурах (SR в модели рака легкого = 2,5), так и в монокультурах клеток, стало соединение **49**.

Соединение **49** показало сопоставимую с исходным веществом **45** избирательность действия и токсичность в наномолярном диапазоне ( $IC_{50}$  для линии рака легкого A549 составляют порядка 50 нМ), при этом профиль цитотоксичности этих веществ в МТТ практически совпадает (Рисунок 4В, Г). Индекс селективности выбранных соединений **45** и **49** для линий A549/VA13 и A549/HEK293T составляет ~12 и ~111 соответственно.

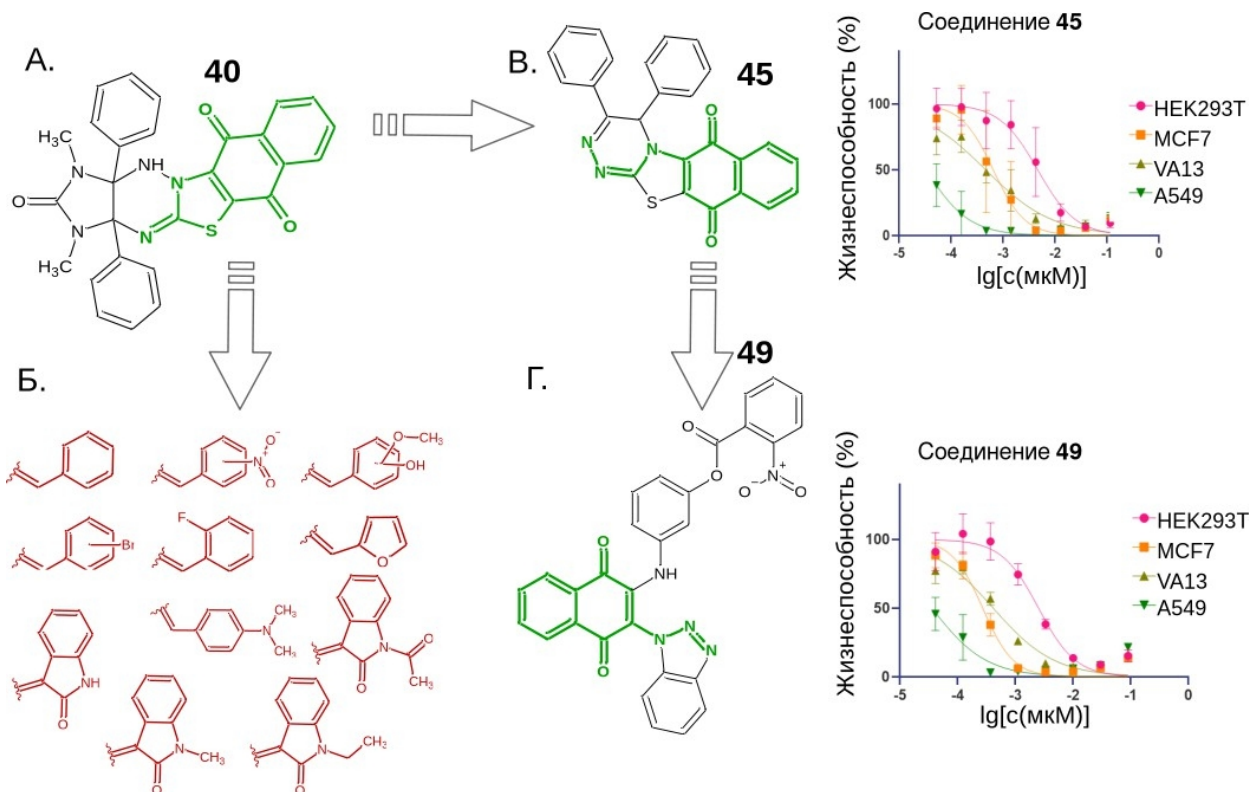


Рисунок 4. А. Анализ структура-активность соединения **40**. Зеленым выделен фармакофорный фрагмент, сохраненный в соединении-лидере **45**, обладавшем избирательной цитотоксичностью в FCCT. Б. Заместители, присутствовавшие в производных данного класса, которые не показали цитотоксичность и селективность действия в FCCT. В. Структура соединения-лидера **45** и оценка его цитотоксичности соединений **45** методом МТТ. Г. Структура соединения-лидера **49** и оценка его цитотоксичности соединений **45** методом МТТ. Наибольшая цитотоксичность для соединений **45** и **49** проявляется для линии рака легкого — A549 и составляет порядка 50 нМ

Далее были исследованы механизмы действия соединений **49** и **45**. Также был проведен транскриптомный анализ клеток A549 после инкубации с соединениями-лидерами. По данным транскриптомного анализа одним из основных индуцируемых ответов является стресс ЭПР. Краткие результаты проведенных исследований приведены в Таблице 1.

Таблица 1. 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		<b>45</b>	<b>49</b>
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-eIF2α (за 20 минут)	±	±
	p-eIF2α (за 2 часа)	±	±
	p-eIF2α (за 24 часа)	+	+
Индукция АФК		±	-

Несмотря на сходство цитотоксического профиля и практически идентичные значения  $IC_{50}$  для клеток A549, соединения **45** и **49** отличаются по механизму действия. Наша основная гипотеза предполагает наличие общей мишени, идентификация которой затруднена из-за вероятной мультитаргетности обоих агентов. Для соединения-лидера **49** не наблюдается интеркаляция в ДНК и подавление её синтеза *in vitro*. Кроме того, по сравнению с соединением **45**, данное вещество оказывает менее выраженное влияние на мембранный потенциал митохондрий и в меньшей степени вызывает генерацию АФК.

Соединение **49** было выбрано для дальнейших исследований противоопухолевой активности *in vivo*. Изначально была исследована разовая переносимость соединения **49**. 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. Далее

была исследована противоопухолевая активность вещества **49** при многократном внутривенном введении на модели подкожных ксенографтов. Использовались привитые клетки рака легких человека A549; соединение **49** вводили в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг. При дозировке 20 мг/кг соединение **49** обладало высокой эффективностью, вызывая торможение роста опухоли на 68% (Рисунок 5).

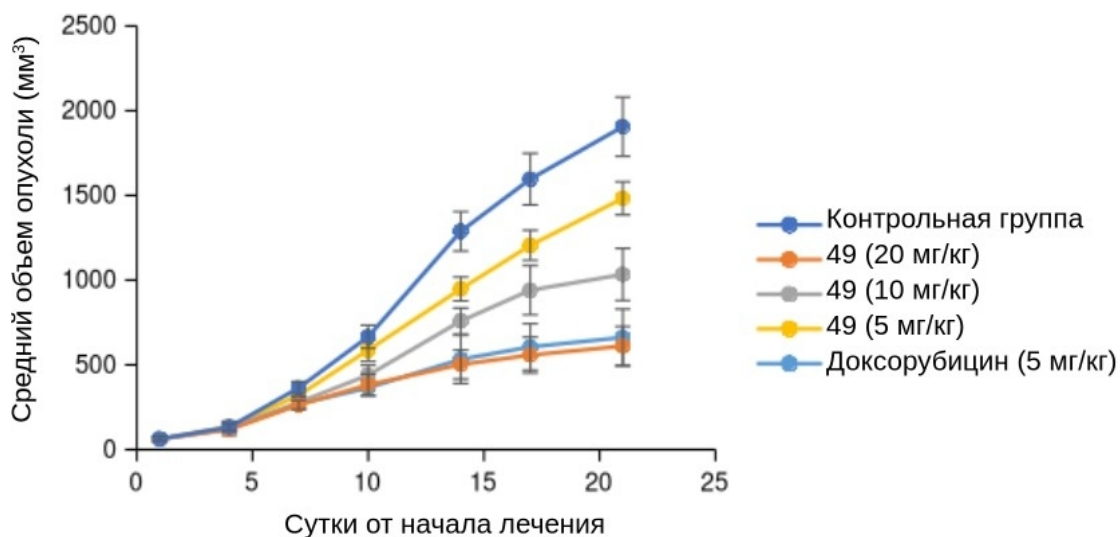


Рисунок 5. Торможение роста привитой опухоли рака легкого (клетки линии A549) при внутривенном введении соединения **49**

Соединение **49** продемонстрировало выраженную противоопухолевую активность, сопоставимую по эффективности с препаратом сравнения доксорубицином, хотя и в больших концентрациях. Таким образом для данного класса соединений был произведен успешный переход от первичного скрининга *in vitro* к ранним доклиническим испытаниям *in vivo*.

### Производные пирроло[1,2 $\alpha$ ]хиноксалина

В предыдущих исследованиях было найдено соединение **48**, избирательно действующее на опухолевые клетки в низком наномолярном диапазоне. В рамках данной работы была исследована противоопухолевая активность его производных и проведена структурная оптимизация данного класса соединений (Рисунок 6).

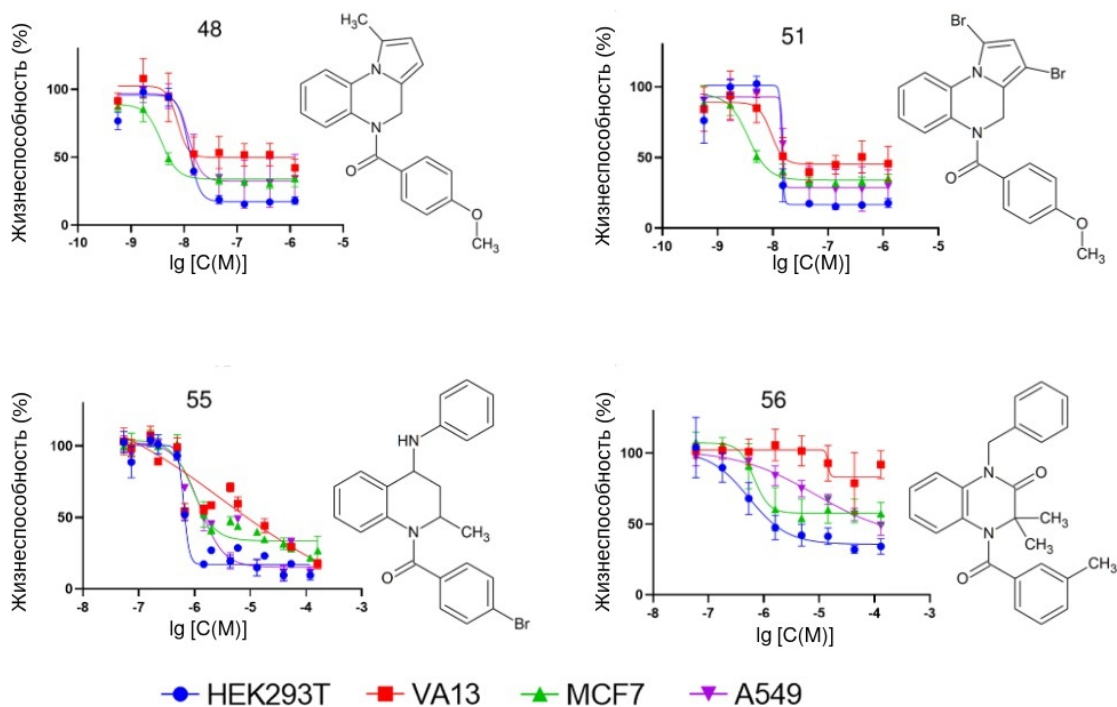


Рисунок 6. Цитотоксичность производных пирроло[1,2α]хиноксалина в МТТ тесте. Селективно цитотоксичные соединения содержат арильные фрагменты, соединенные амидной связью (48, 51, 55, 56).

Селективно цитотоксичные соединения содержали арильные фрагменты, соединенные амидной связью.

Была собрана новая библиотека химических соединений, которые являлись структурными производными выделенного фармакофора. Мы варьировали функциональные группы в пиррольном и бензольном радикале. Исходя из полученных данных были построены зависимости структура-активность и выбраны наиболее оптимальные заместители. Соединением-лидером стало вещество 77, отличающееся от прототипа наличием нитрогруппы в фенильном радикале и отсутствием метильной группы в пиррольном фрагменте. Соединение 77 превосходит прототип, и значение  $IC_{50}$  для клеток рака легкого A549 составляет  $4 \pm 1$  нМ (Рисунок 7).

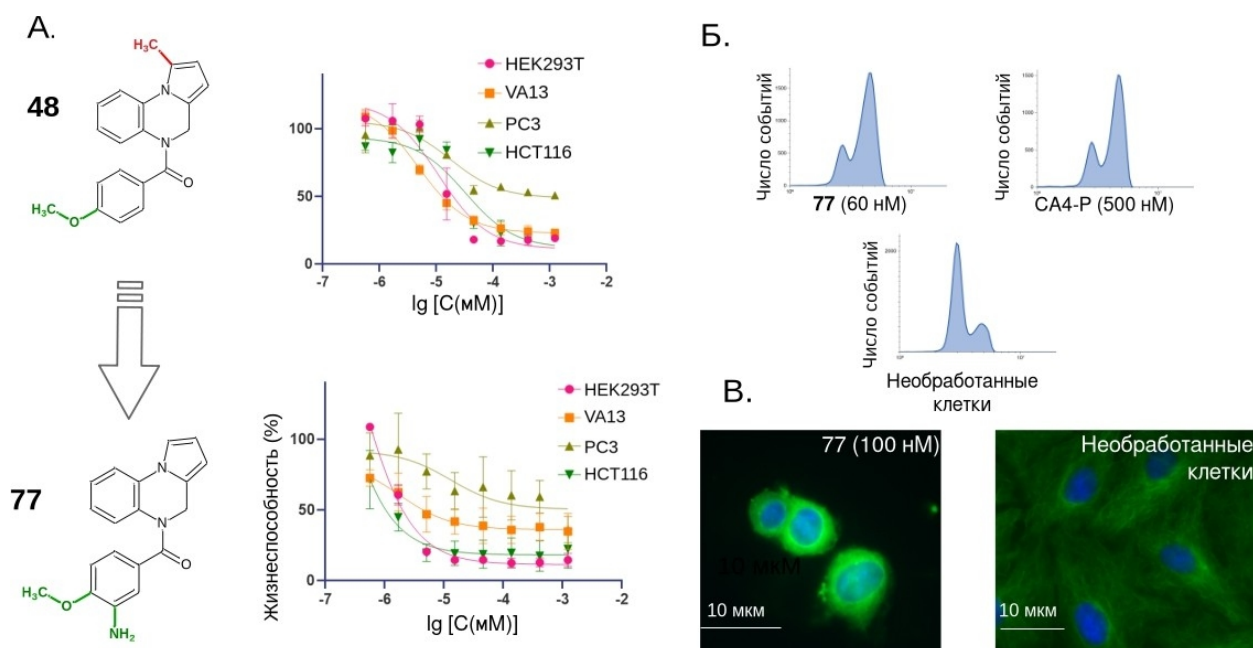


Рисунок 7. А. Анализ структура-активность производных пирроло[1,2α]хиноксалина. Введение в структуру аминогруппы приводит к значительному увеличению цитотоксичности. Б. Анализ клеточного цикла при обработке клеток A549 соединением 77; наблюдается остановка клеточного цикла в G2/M фазе, форма графика сопоставима с данными, полученными при обработке клеток препаратом сравнения CA4-P. В. Микроскопические изображения ингибирования полимеризации тубулина при обработке клеток A549 соединением 77.

Для соединения 77 было предположено, что молекулярным механизмом действия является ингибирование полимеризации тубулина. Форма зависимости на графике цитотоксичности указывала на выраженный цитостатический эффект, сопоставимый с действием известного ингибитора полимеризации тубулина – CA4-P. Также цитотоксичность исследуемых соединений напрямую зависела от скорости пролиферации клеточных линий (Рисунок 7А). Соединение 77 вызывало остановку клеточного цикла в фазе G2/M, что также согласуется с гипотезой (Рисунок 7Б). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток линии A549, обработанных соединением 77, выявило деполимеризацию тубулина, характеризующуюся отсутствием четкой структуры микротрубочек (Рисунок 7В). Данные структурные изменения аналогичны эффектам, наблюдаемым при воздействии комбретастатина А4 фосфата.

Соединение 77 было исследовано в моделях *in vivo*. Для повышения растворимости в итоговой форме для парентерального введения были использованы коллифор и этиловый

спирт. Соединение 77 не вызывало токсические эффекты у мышей вплоть до дозировки 20 мг/кг (при однократном введении). При исследовании активности соединения в моделях лейкозов (Таблица 2) и привитых опухолей (Рисунок 8) терапевтические эффекты были сопоставимы или превосходили препарат сравнения.

Таблица 2. Увеличение продолжительности жизни мышей в модели перевиваемых лейкозов при лечении соединением 77 и СА4-Р

Модель	Группа	Условия лечения	Исследуемые параметры	
		доза (мг/кг)/интервал (часы) x количество инъекций	L±m (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

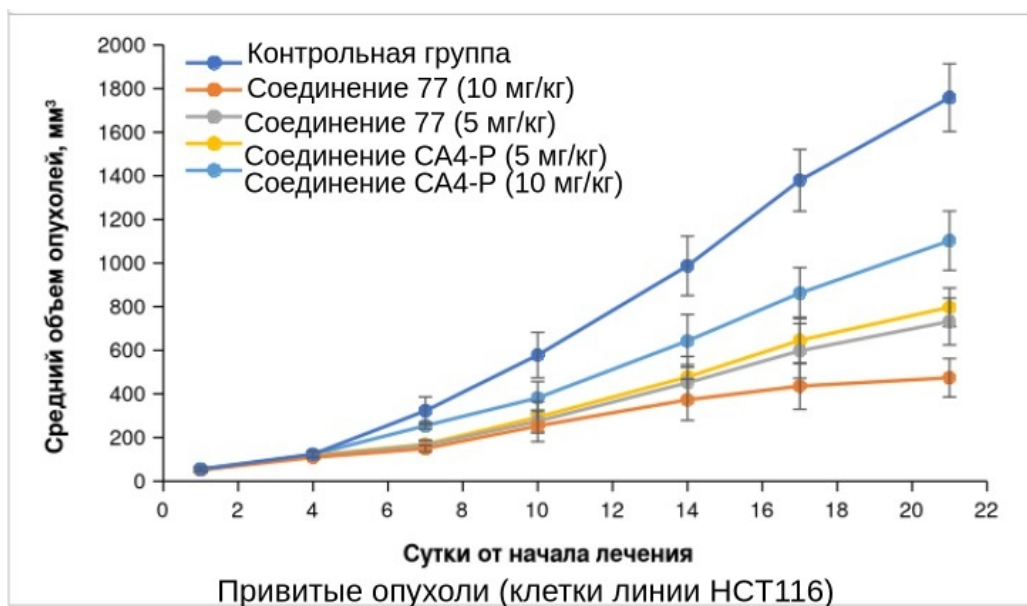


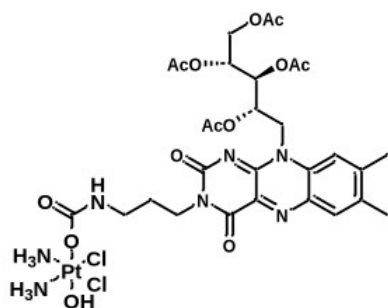
Рисунок 8. Торможение роста привитой опухоли рака толстого кишечника (клетки линии НСТ116) при внутривенном введении 77

### Соединения, проявляющие цитотоксическое действие при фотораспаде

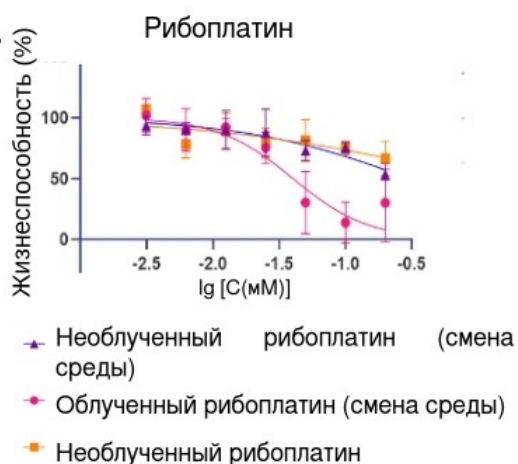
Создание фотоактивируемых пролекарств Pt(IV) представляет собой инновационный подход, основанный на конъюгации соединения Pt(II) с фотосенсибилизатором, способным возбуждаться под воздействием видимого или ближнего инфракрасного излучения и высвободить цитотоксический агент. Цитотоксическое действие таких соединений может быть высокоселективно, так как высвобождение токсического фрагмента происходит контролируемо. Нашими коллегами был синтезирован рибоплатин – пролекарство Pt(IV) на основе цисплатина с тетраацетилрибофлавином (Рисунок 9А). Нами была экспериментально показана реализация цитотоксического действия данного синтезированного конъюгата только в условиях фотоактивации. При этом цитотоксический эффект рибоплатина был схож с эффектом цисплатина (в аналогичных условиях эксперимента), что позволяет сделать вывод о том, что токсический эффект рибоплатина обусловлен высвобождением цисплатина (Рисунок 9Б).

Далее были изучены производные бородипиррометенов (BODIPY) как фотосенсибилизирующие фрагменты в конъюгатах с цисплатином. Нами было исследовано действие на опухолевые клетки мультикомпонентного пролекарственного вещества, объединяющее два терапевтически активных фрагмента – цисплатин и комбретагастин А4 (CA4), соединенных с флуорофором BODIPY (Рисунок 9В).

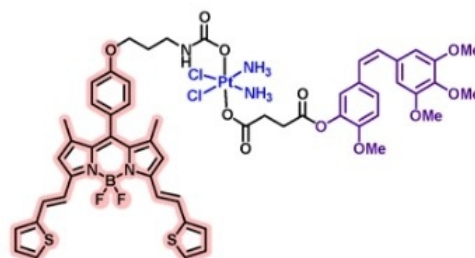
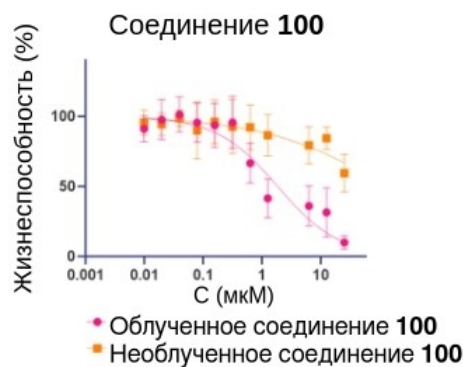
A.



Б.



В.



Г.

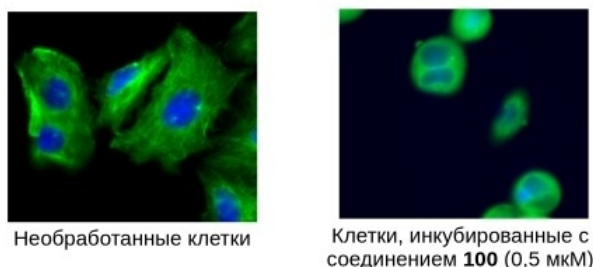


Рисунок 9. А. Структура рибоплатина Б. Зависимость выживаемости клеток MCF7 от концентрации рибоплатина при фотообработке и в ее отсутствие В. структура комплекса 100; цитотоксичность комплекса 100 реализуется только при фотообработке Г: Высвобождаемый при фотообработке СА4 нарушает полимеризацию тубулина в клетках MCF7

По результатам проведенных экспериментов мы предположили, что цитотоксичность данного комплекса определяется только высвобождением СА4. Предположения были основаны на форме графика цитотоксичности соединения 100 (Рисунок 9В), в частности, из-за наличия характерного плато, проявляющегося в диапазоне 1-10 мкМ, совпадающего по форме кривой с графиком токсичности СА4. Также при обработке клеток соединением 100 идет накопление в G2/M фазе. При флуоресцентном окрашивании тубулина четко видно дезорганизацию цитоскелета, что также характерно для СА4 (Рисунок 9Г).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленного исследования были изучены противоопухолевые свойства новых низкомолекулярных органических соединений от первичного скрининга в клеточных моделях до анализов *in vivo*. Для выделенных соединений-лидеров (в частности, производных 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 $\alpha$ ]хиноксалина) были исследованы механизмы действия. Их противоопухолевая активность была подтверждена на мышинных моделях *in vivo*, эффекты были сопоставимы с препаратами сравнения (доксорубицин, таксол) или превосходили их. Изучение фотоактивируемых комплексов платины подтвердило перспективность создания 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 (пиразолкарбоксамида, хроман-4-она, 1,4-нафтохинона и пирроло[1,2 $\alpha$ ]хиноксалина) были выделены наиболее цитотоксичные и селективные соединения-лидеры,  $IC_{50}$  которых находилась в низком микромолярном или наномолярном диапазоне.
2. Для производных пиразолкарбоксамида 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 пара-хлорфенил, 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 значимо улучшает цитотоксичность и селективность производных пирроло[1,2 $\alpha$ ]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 $\alpha$ ]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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

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., Мальшев 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.