

УДК 577.2

Димерные бисбензимидазолпирролы $DB_2Py(n)$ – АТ-сайт-специфичные лиганды: синтез, физико-химический анализ и исследования биологической активности

О. Ю. Сусова^{1*}, С. Ш. Каршиева¹, А. А. Костюков², Н. И. Моисеева¹, Е. А. Зайцева¹,
К. В. Калабина¹, Е. Жусинайте⁴, К. Гильдеманн⁴, Н. М. Смирнов³, А. Ф. Арутюнян³,
А. Л. Жузе³

¹НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115522 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁴Тартуский университет, Институт технологии, Тарту, 50411 Эстония

*E-mail: o.susova@ronc.ru

Поступила в редакцию 16.11.2023

Принята к печати 29.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27327

РЕФЕРАТ Бензимидазол является фундаментальным фармакофором при создании лекарств из-за его широкого спектра биологической активности. Синтезированы новые АТ-специфичные флуоресцентные молекулы бисбензимидазола $DB_2Py(n)$, содержащие пирролкарбоксамидный фрагмент антибиотика нетропсина. С использованием спектров поглощения, флуоресценции и кругового дихроизма показана способность бисбензимидазолпирролов к комплексообразованию с ДНК. Новая серия $DB_2Py(n)$ оказалась более токсичной на линиях опухолевых клеток человека и менее токсичной для неопухолевых клеток. Бисбензимидазолпирролы проникали в ядро клетки, воздействовали на фазу S-клеточного цикла, а также в низких концентрациях ингибировали эукариотическую топоизомеразу I в бесклеточной модели. Анализ пролиферации опухолевых клеток в режиме реального времени подтвердил усиление токсических свойств при димеризации бисбензимидазолпиррола. Согласно предварительным данным определения цитотоксичности бисбензимидазолпирролов на клеточной модели с фенотипом множественной лекарственной устойчивости мономерные соединения преодолевают множественную лекарственную устойчивость, в то время как димеризация молекулы приводит к снижению этого свойства до средних величин по сравнению с доксорубицином. Таким образом, новые цитотоксичные бисбензимидазолпиррольные структуры представляют интерес для дальнейшего глубокого изучения их свойств и механизма действия в отношении опухолевых клеток человека, а также для дизайна новых АТ-специфичных лигандов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бисбензимидазолпиррол, узкобороздочный лиганд, цитотоксичность, комплексообразование с ДНК, топоизомераза I, клеточный цикл, множественная лекарственная устойчивость.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМФА – диметилформамид; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; Топо-I – эукариотическая топоизомераза I; ХЖКД – холестерическая жидкокристаллическая дисперсия; IC_{50} – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Соединения, способные связываться с высокой константой с узкой бороздкой ДНК за счет образования водородных связей, представляют интерес в качестве средств, способных регулировать биологическую активность. Применение бисбензимидазолов в качестве лекарственных препаратов открывает

новые возможности для терапии социально значимых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований. Быстрый рост устойчивости опухолей к используемым протоколам лечения делает необходимым поиск новых эффективных ДНК-специфичных лигандов, что является важным направлением развития медицинской химии [1–4].

Мишенью ДНК-специфичных соединений на основе узкобороздочных лигандов служат АТ-пары нуклеотидов в структуре ДНК. Существует возможность подбора структуры лиганда под выбранный участок связывания на ДНК, а также исключение неспецифического связывания с ДНК благодаря комплементарным взаимодействиям между ДНК-специфичным лигандом и биомолекулой. В этом плане наиболее перспективны низкомолекулярные узкобороздочные лиганды. Такие соединения в значительной степени свободны от побочного мутагенного эффекта, характерного для низкомолекулярных соединений, интеркалирующих между парами оснований ДНК. Они способны модулировать экспрессию генов и ДНК-связывающих белков, проявляя таким образом противоопухолевые свойства.

Ранее мы получили на основе **Hoechst 33258** ряд флуоресцентных водорастворимых АТ-специфичных димерных бисбензимидазольных узкобороздочных лигандов серий **DB(n)**, **DBP(n)**, **DVA(n)** и **ДВРА(n)**, где **n** равно количеству метиленовых звеньев в линкере. Все вышеупомянутые соединения содержат в своей структуре два АТ-распознающих фрагмента, состоящих из двух бис-

бензимидазольных блоков [5–8]. При взаимодействии с ДНК каждый АТ-распознающий фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с О2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних АТ-пар, накрывая при этом участок размером примерно полторы пары оснований [9]. Все соединения (**DB(n)**, **DBP(n)**, **DVA(n)** и **ДВРА(n)**) проникали через клеточную и ядерную мембраны, окрашивали ДНК и демонстрировали значительную активность в качестве ингибиторов ДНК-зависимых ферментов.

В работе проведен синтез и изучена биологическая активность новых узкобороздочных лигандов, содержащих в своей структуре АТ-распознающий пирролкарбоксамидный фрагмент, аналогичный фрагменту природного антибиотика нетропсина [10], не нашедшего применения в практике из-за высокой цитотоксичности. Новые лиганды **MB₂Py** и **MB₂Py(Ac)** (рис. 1) состоят из трех АТ-распознающих блоков – двух бензимидазольных и одного пирролкарбоксамидного, ковалентно связанных друг с другом, и димерных производных **DB₂Py(n)** (рис. 1), являющихся продуктом димеризации **MB₂Py** олигометиленовыми α,ω-дикарбоновыми кислотами различной длины

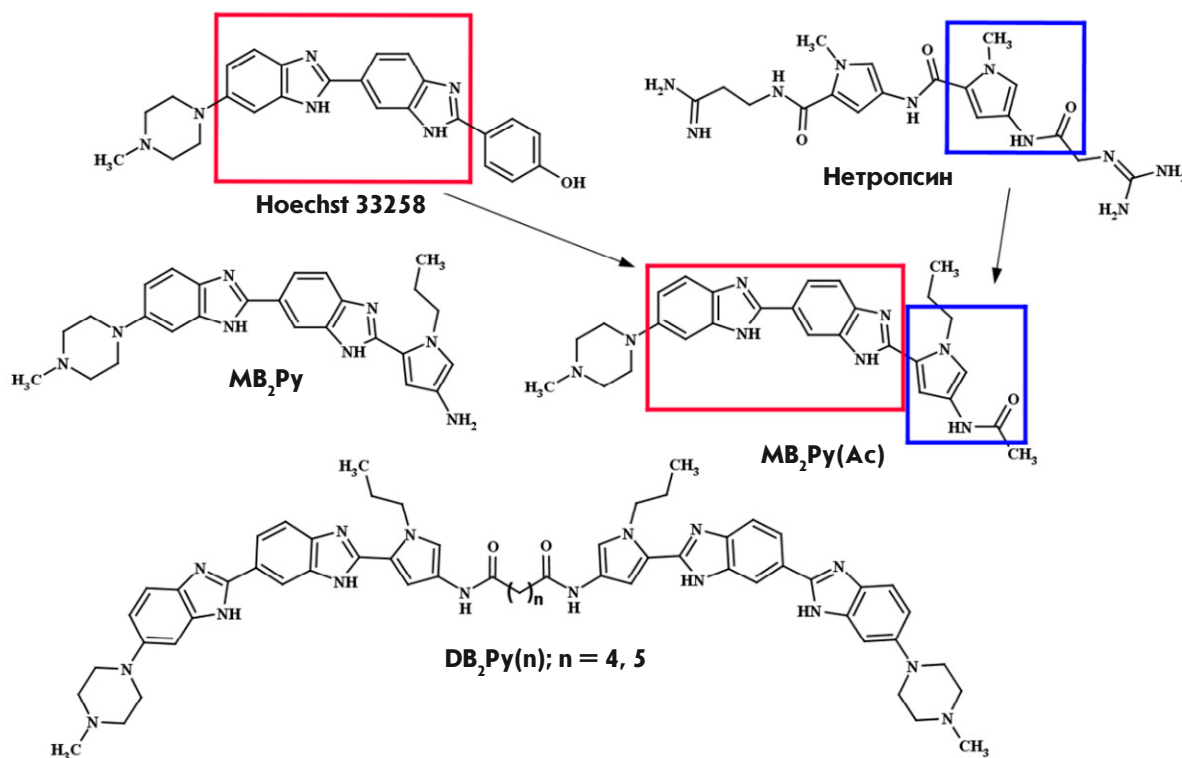


Рис. 1. Структурные формулы **Hoechst 33258**, нетропсина, мономерных **MB₂Py**, **MB₂Py(Ac)** и димерных соединений **DB₂Py(n)**. В **MB₂Py(Ac)** бисбензимидазольный фрагмент выделен красным, а пирролкарбоксамидный фрагмент синим цветом

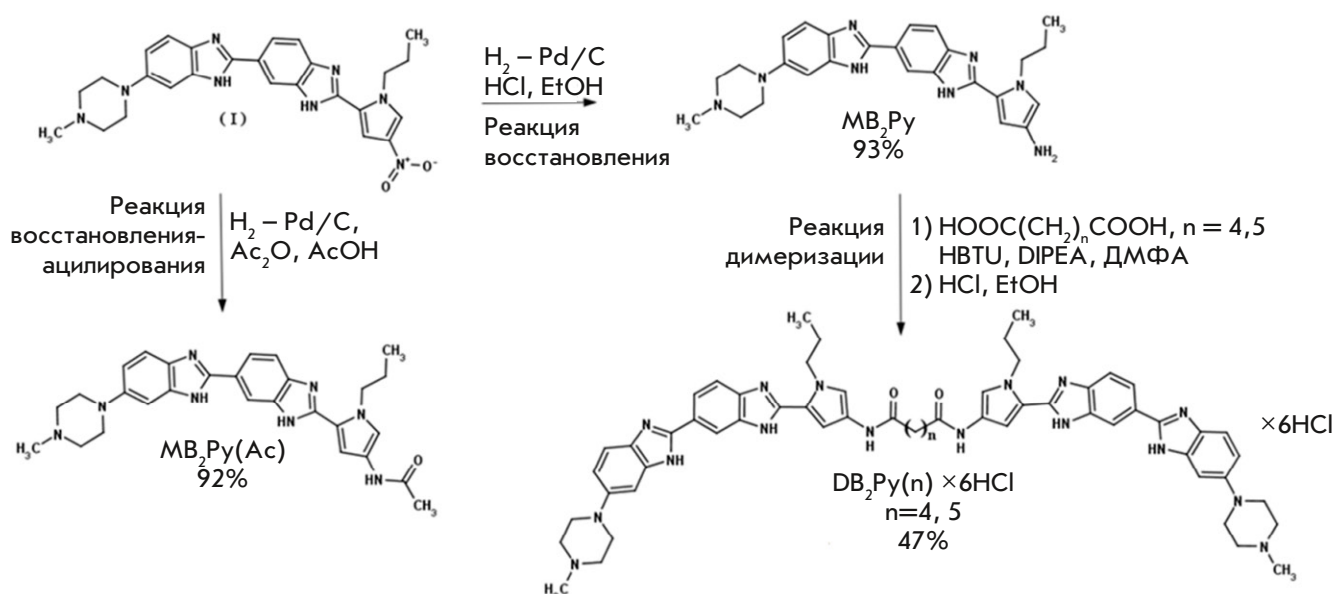


Рис. 2. Схема синтеза мономерных соединений MB_2Py , $MB_2Py(Ac)$ и димерных $DB_2Py(4, 5)$

(n – число метиленовых звеньев в линкере) с образованием симметричных соединений по типу «голова-к-голове». Использование гибкого линкера в димерных соединениях позволит молекуле связываться с двумя АТ-богатыми сайтами, находящимися на разных расстояниях друг от друга. Как показано нами ранее, димеризация мономерного лиганда серии $DB(n)$ привела к увеличению аффинности к ДНК новой структуры [11].

Увеличение количества АТ-распознающих фрагментов в мономерной субъединице ведет к увеличению константы комплексообразования лиганд–ДНК и должно снижать ингибирующую концентрацию в отношении ДНК-зависимых ферментов. В данной работе описываются синтез и изучение биологической активности двух мономерных соединений – MB_2Py и $MB_2Py(Ac)$, и димерных соединений $DB_2Py(n)$.

Синтез димерных бисбензимидазолпирролов $DB_2Py(4,5)$ осуществлен исходя из 6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-1,3-бензодиазол-2-ил]-2-(4-нитро-1-пропил-1H-пиррол-2-ил)-1H-1,3-бензодиазола (I) (рис. 2), полученного в лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Института молекулярной биологии РАН. Соединение (I) использовали для получения мономерного лиганда $MB_2Py(Ac)$ путем восстановления исходного соединения в токе водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии уксусного ангидрида на 10% палладии на угле в качестве катализатора. Мономерное соединение MB_2Py получено аналогичным методом в присутствии соляной кислоты и этанола в качестве растворителя. Исходя из мономерного бис-

бензимидазолпиррольного блока MB_2Py получены два димерных соединения $DB_2Py(n)$ путем его димеризации рядом алифатических нормальных α,ω -дикарбоновых кислот в присутствии $NBTU$ в качестве конденсирующего агента и $DIPEA$ как основания в $DMFA$, отличающихся количеством метиленовых звеньев в линкере, $n = 4, 5$ (рис. 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали адипиновую и пимелиновую кислоты, $NBTU$, $DIPEA$ (Fluka, Швейцария), диоксан, $DMFA$, ледяную $AcOH$, Ac_2O , $iPrOH$, ацетон («Реахим», Россия). Растворы веществ в органических растворителях сушили над Na_2SO_4 . Растворители упаривали на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса, как правило, при $30-50^\circ C$. Вещества высушивали в вакууме над P_2O_5 и $NaOH$. Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия). Гидрирование проводили над 10% Pd/C (Merck, Германия) при атмосферном давлении и комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Чистоту полученных соединений определяли с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck). Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете по поглощению при 254 нм и/или по флуоресценции при 365 нм.

Спектры 1H -ЯМР регистрировали на спектрометре Avance III 300 MHz (Bruker, Германия), оснащенным криогенным зондом тройного резонанса TCI (Bruker Biospin GmbH, Германия) в $DMSO-d_6$ при $30^\circ C$.

Масс-спектры снимали на времяпролетном приборе AB SCIEX 4800 (AB SCIEX, США) в режиме регистрации положительных ионов (если специально не оговорено); матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; N₂ – лазер, 337 нм.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary100 (Varian, США).

Спектры флуоресценции растворов измерены на спектрофлуориметре PTI (Photo Technology Intern., Канада). Использовали двухцепочечную ДНК тимуса теленка (Sigma).

Спектры КД регистрировали при помощи портативного дихрометра СКД-2 (изготовлен в Институте спектроскопии РАН, г. Троицк). Использовали ДНК спермы лосося (Техномедсервис, Россия), кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Опухолевые клеточные линии человека

Использовали линии немелкоклеточного рака легкого A549, рака толстой кишки HCT-116, гепатокарциномы Huh7, карциномы поджелудочной железы PANC-1, рака молочной железы SKBR3, MCF7, рака яичников SKOV3, остеосаркомы U2OS человека, первичную культуру глиобластомы человека Gbl13n, иммортализованную эпителиальную клеточную линию HBL-100 и ее устойчивую к доксорубину сублинию HBL-100/DOX и линию клеток молочной железы MCF10A неопухолевого происхождения. В качестве контрольных лекарств использовали иринотекан, доксорубин (Sigma), этопозид, пуромидин (InvivoGen).

Для опухолевых клеточных линий человека использовали среду DMEM (Sigma), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Южная Америка) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Клетки неопухолевого происхождения MCF10A культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma), содержащей 5% лошадиной сыворотки (Biocera, Южная Америка), 100 мг/мл эпидермального фактора роста (EGF), 1 мг/мл гидрокортизона и 10 мг/мл инсулина («ПанЭко»). Обе среды содержали пенициллин и стрептомицин 100 Ед/мл («ПанЭко»), все клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂.

Цитотоксический эффект оценивали с помощью стандартного МТТ-теста (Microculture Tetrazolium Test), основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-

тетразолиум бромида (МТТ-реагента) до голубого кристаллического фармазана, растворимого в диметилсульфоксиде (DMSO). IC₅₀ – концентрация соединения, вызывающая 50% гибель клеток. Реагент МТТ был приобретен в «ПанЭко». Окраску регистрировали на спектрофотометре при длине волны 570 нм с помощью спектрофотометра (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировали без контроля, принимали за 100%. Показатели оптической плотности в лунках с каждой концентрацией контроля усредняли и вычисляли процент выживших клеток при той или иной концентрации препарата.

Измерение клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки HCT-116 рассеивали по 500 × 10³ клеток на лунку в 6-луночной планшете и растили в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко») и 1-кратный раствор антибиотика – антимикотика (Gibco) с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco) при 37°C и 5% CO₂. Через 24 ч меняли среду на свежую с добавлением препаратов в концентрации 1 мкМ, оставляя контрольные лунки без препарата. Клетки инкубировали в течение 24 и 48 ч. Для анализа клетки промывали на чашках раствором Версена («ПанЭко») и 0.25% раствором трипсина-EDTA (Gibco). Подсчитывали концентрацию клеток и отбирали равные количества для анализа. Центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, удаляли супернатант, промывали в 1 мл холодного PBS. Клетки ресуспендировали в 1 мл холодного 96% этанола и инкубировали ночь при +4°C. Затем центрифугировали (15 мин, 1900 об/мин), промывали 1 раз раствором холодного PBS. К осадку добавляли 1 мл 3.8 мМ раствора цитрата натрия в PBS, содержащего 500 мкг/мл иодида пропидия и 1 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Флуоресценцию иодида пропидия измеряли в канале FL2 с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex. Данные анализировали с помощью программы ModFit LT 3.2 (Verity Software).

Пролиферацию клеток, подвергнутых воздействию исследуемых соединений, определяли с использованием анализатора клеток в реальном времени (RTCA) xCELLigence (ACEA Biosciences, США). По 5000 клеток остеосаркомы человека U2OS высевали в лунки 16-луночной планшеты с микроэлектронным биосенсором на дне каждой лунки (запатентованные E-планшеты) и инкубировали

в течение 24 ч в приборе Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyser (RTCA) DP (Roche Diagnostics GmbH, Германия). При достижении клеточного индекса 1 среду удаляли с последующим добавлением либо одной среды (контроль), либо среды с различными концентрациями веществ (0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 мкМ соответственно).

Способность соединений проникать в клеточное ядро определяли с использованием флуоресцентного микроскопа в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Живые клетки глиобластомы Gbl13n выдерживали в культуральной среде с соединениями в концентрации 2 мкМ в течение 2 суток, хорошо промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали формальдегидом, фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия). Ядра клеток фотографировали с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 710 (Carl Zeiss AG).

Ингибирование каталитической активности эукариотической топоизомеразы I в реакции релаксации суперскрученной ДНК (ссДНК). Способность модулировать активность топоизомеразы I (Топо-I) *in vitro* изучали с использованием набора Topoisomerase I Drug Screening kit (ТопоGen, Inc., cat. № 1018-1, www.topogen.com). 1 ед. очищенной Топо-I из тимуса теленка (Fermentas, США) и исследуемые соединения в концентрации 2.5 и 5 мкМ; 0.65 и 1.25 мкМ инкубировали с 0.12 мкг суперскрученной плазмидной ДНК рHOT1 (ТопоGen) в реакционном буфере ×1 (10 мМ Трис-НСl рН 7.9, 1 мМ EDTA, 0.15 М NaCl, 0.1% BSA, 0.1 мМ спермидин, 5% глицерин). Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C, останавливали внесением SDS до конечной концентрации 1%, обрабатывали протеиназой К с конечной концентрацией 50 мкг/мл в течение 30–60 мин при 37°C. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле с ТАЕ-буфером (2 М Трис-основание, 0.05 М EDTA, 1.56 М уксусная кислота) при максимальной напряженности электрического поля 3–4 В/см и затем окрашивали водным раствором этидия бромида (0.5 мкг/мл). Визуализацию ДНК в геле регистрировали по флуоресценции в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. В отсутствие ингибитора Топо-I релаксировала ссДНК с образованием ряда топоизомеров. Эффект ингибирования Топо-I выявляли по способности исследуемых соединений задерживать реакцию релаксации ссДНК, т.е. по сохранению ссДНК. Исходная концентрация растворов бисбензимидазолпирролов в DMSO составляла 5×10^{-3} М.

Данные по выживаемости клеток обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8, кривые жизнеспособности сравнивали с использованием критерия Фишера (F-тест). Все эксперименты повторяли 3 раза, влияние на пролиферацию клеток в режиме реального времени тестировали дважды. Для представления данных выбирали наиболее удачный опыт, результаты которого не противоречили результатам таких же опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез мономерных бисбензимидазолпирролов MB_2Py , $MB_2Py(Ac)$ и димерных соединений $DB_2Py(4, 5)$

Синтез MB_2Py . Суспензию 0.1 г 10% Pd/C в 20 мл абсолютного этанола насыщали водородом до прекращения его поглощения. Затем добавили 0.3 мл концентрированной соляной кислоты и 0.20 г (0.41 ммоль) 6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-1,3-бензодиазол-2-ил]-2-(4-нитро-1-пропил-1H-пиррол-2-ил)-1H-1,3-бензодиазол (**I**). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Полученный раствор отфильтровывали от катализатора и образовавшегося осадка, твердый осадок целевого вещества смывали с фильтра водой 2×10 мл, воду упаривали при пониженном давлении. Выход MB_2Py – 0.173 г (93%) в виде зеленого аморфного порошка. По данным ТСХ в системе гексан–этил-ацетат (3:1) полученное вещество гомогенно. Масс-спектр: 455.26 [M+H]⁺, рассчитано: 454.57 (C₂₆H₃₀N₈).

Синтез $MB_2Py(Ac)$. Суспензию 0.15 г 10% Pd/C в 30 мл ледяной уксусной кислоты насыщали водородом до прекращения его поглощения. Затем добавляли 2 мл уксусного ангидрида и 0.35 г (0.72 ммоль) вещества (**XII**). Реакционную массу перемешивали в токе водорода комнатной температуры в течение 5 ч. Полученный раствор отфильтровывали от катализатора. Маточный раствор упаривали при пониженном давлении, образовавшееся масло трижды переупаривали с 30 мл изопропилового спирта. Выход $MB_2Py(Ac)$ 0.37 г (92.4%) в виде желтых кристаллов. По данным ТСХ в системе *i*-PrOH–NH₄OH (5:1) полученное вещество $MB_2Py(Ac)$ гомогенно, т. пл. 219°C. Масс-спектр: m/z: 496.15 [M]⁺, 454.13 [M–NHAc]⁺, рассчитано: 496.26 (C₂₈H₃₂N₈O).

Общий метод синтеза $DB_2Py(n)$. К раствору α,ω-алкилдикарбоновой кислоты (0.1 ммоль) в 2 мл абс.

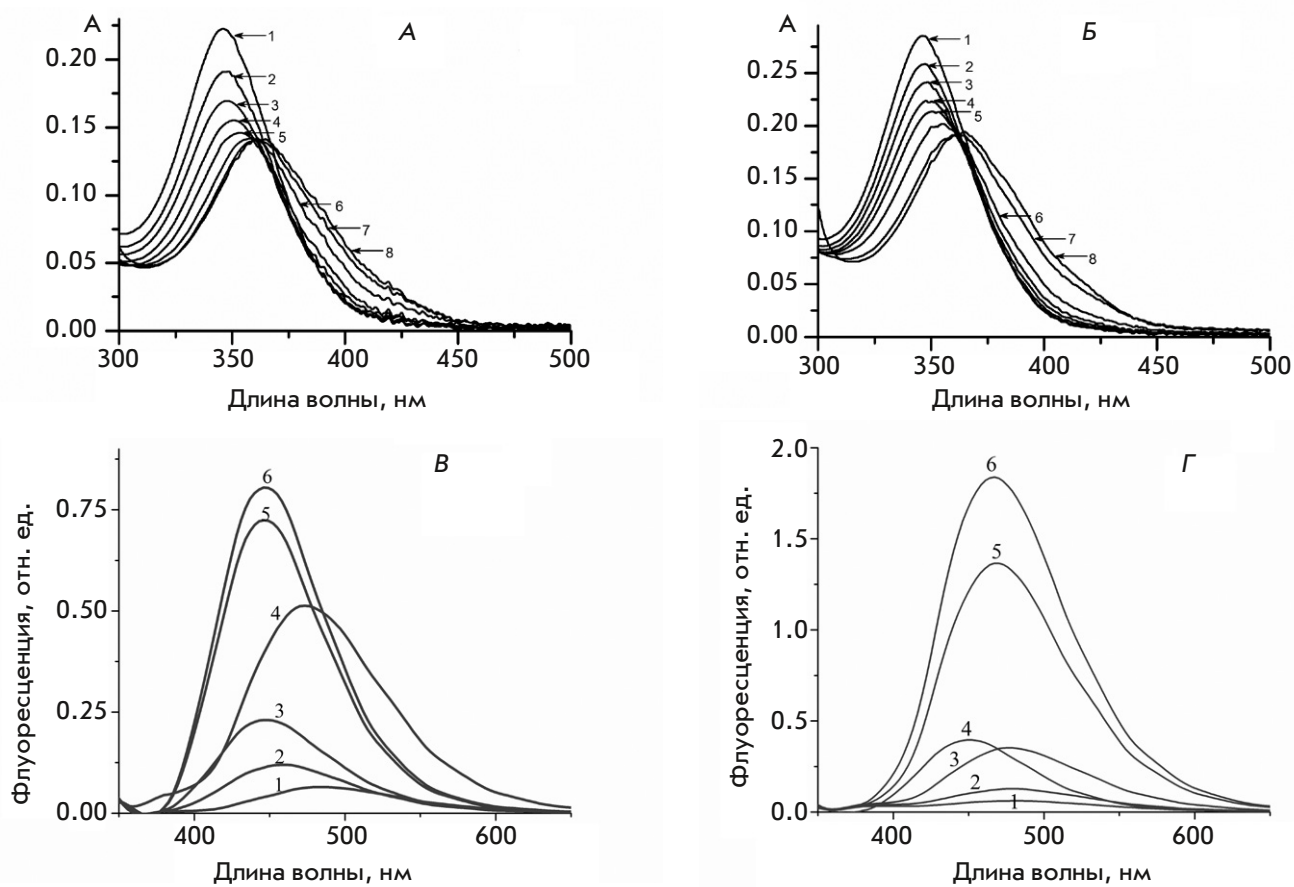


Рис. 3. Спектры поглощения и флуоресценции свободного **DB₂Py(n)** и комплекса с ДНК. **А** – спектры поглощения **DB₂Py(4)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–8); [**DB₂Py(4)**] 4.06×10^{-6} М; 0.001 М какодилат натрия. [ДНК] 1 – 0; 2 – 0.25; 3 – 0.49; 4 – 0.98; 5 – 1.48; 6 – 2.45; 7 – 14.67; 8 – 121.9×10^{-6} М п.н. соответственно; длина оптического пути 1 см. **Б** – спектры поглощения **DB₂Py(5)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–8); [**DB₂Py(5)**] 4.29×10^{-6} М; 0.001 М какодилат натрия. [ДНК] 1 – 0; 2 – 0.25; 3 – 0.49; 4 – 0.98; 5 – 1.48; 6 – 2.45; 7 – 14.67; 8 – 121.9×10^{-6} М п.н. соответственно; длина оптического пути 1 см. **В** – спектры флуоресценции **DB₂Py(4)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–6). [**DB₂Py(4)**] 4.6×10^{-6} М; [ДНК] 1 – 0; 2 – 3; 3 – 6; 4 – 18; 5 – 30; 6 – 54 М п.н. соответственно. Буфер: 10 мМ PBS (рН 7.4). Длина волны возбуждения 320 нм, ширина щели 5 нм, кювета 10×10 мм, 22°C. **Г** – спектры флуоресценции **DB₂Py(5)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–6). [**DB₂Py(5)**] 2.3×10^{-6} М; [ДНК] 1 – 0; 2 – 3; 3 – 6; 4 – 18; 5 – 54; 6 – 78×10^{-6} М п.н. соответственно. Буфер: 10 мМ PBS (рН 7.4). Длина волны возбуждения 320 нм, ширина щели 5 нм, кювета 10×10 мм, 22°C

ДМФА прибавили НВТУ (0.25 мМ), DIPEA (0.50 мМ) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К полученному раствору добавляли 0.10 г (0.2 ммоль) **MB₂Py**, перемешивали в течение еще 1 ч и оставляли реакционную массу на ночь. Растворитель упаривали при пониженном давлении, получившееся масло затирали с абс. *i*-PrOH. В образовавшуюся суспензию добавляли 0.5 мл 35% HCl в диоксане, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 3 раза 80% водным ацетоном и 2 раза абс. *i*-PrOH. Твердый остаток в виде зеленого порошка высушивали в вакууме над NaOH/P₂O₅. По данным ТСХ в системе MeOH–TFA–H₂O (5:1:2) продукт реакции гомогенен.

DB₂Py(4)·6HCl. Выход 55 мг (48%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, 1019.57 [M+H]⁺, рассчитано М 1018.55 (C₅₈H₆₆N₁₆O₂). ¹H-NMR (300 МГц, DMSO-*d*₆): δ 0.85 (6H, t, *J* = 7.4, 2(-CH₃)), 1.65 (4H, m, (-CH₂-CH₂-)), 1.75 (4H, q, *J* = 7.2, 2(-CH₂CH₂CH₃)), 2.31 (4H, m, 2(-COCH₂-)), 2.77 (4H, s, pip), 3.23 (4H, s, pip), 3.35 (6H, s, 2(N-CH₃)), 4.54 (4H, t, *J* = 7.0, 2(N-CH₂-)), 7.05–6.84 (4H, m, ArH), 7.10 (2H, s, ArH), 7.36–7.24 (2H, brs, ArH), 7.48 (2H, d, *J* = 8.6, ArH), 7.58 (2H, m, ArH), 7.97 (2H, m, ArH), 8.26 (2H, d, *J* = 36.2, ArH), 9.93 (2H, s, 2(-NHCO-)).

DB₂Py(5)·6HCl. Выход 61 мг (47%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, *m/z*: 1033.42 [M+H]⁺, рассчитано М 1032.57 (C₅₉H₆₈N₁₆O₂). ¹H-NMR (300 МГц, DMSO-*d*₆):

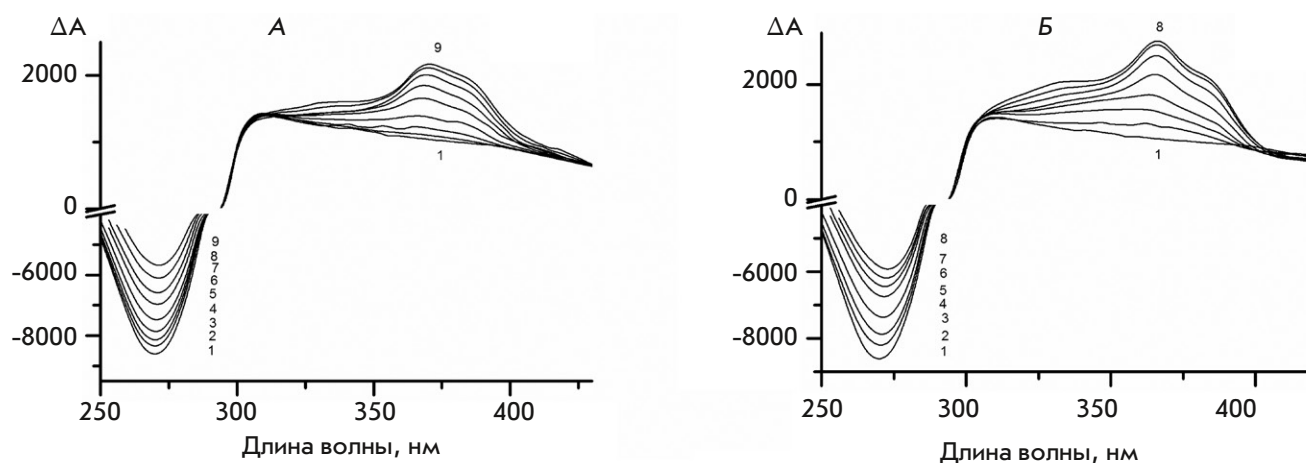


Рис. 4. А – спектры КД ХЖКД ДНК в отсутствие (1) и присутствии (2–9) **DB₂Py(4)**; 0.3 М NaCl; 170 мг/мл ПЭГ-4000; 0.002 М Na-фосфат, [ДНК] 4.545×10^{-5} М п.н.; [**DB₂Py(4)**] 1 – 0; 2 – 0.41; 3 – 0.82; 4 – 1.63; 5 – 3.25; 6 – 4.87; 7 – 6.48; 8 – 8.08; 9 – 10.07×10^{-6} М соответственно. Длина оптического пути 1 см. Б – спектры КД ХЖКД ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2–8) **DB₂Py(5)**; 0.3 М NaCl; 170 мг/мл ПЭГ-4000; 0.002 М Na-фосфат, [ДНК] 4.545×10^{-5} М п.н.; [**DB₂Py(5)**] 1 – 0; 2 – 0.43; 3 – 0.86; 4 – 1.72; 5 – 3.44; 6 – 5.15; 7 – 6.85; 8 – 8.54×10^{-6} М соответственно. Длина оптического пути 1 см

δ 0.87 (6H, t, $J = 7.4$, 2(-CH₃)), 1.34 (2H, m, -CH₂-), 1.63 (4H, m, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.77 (4H, q, $J = 7.2$, 2(-CH₂CH₂CH₃)), 2.30 (4H, m, 2(-COCH₂-)), 2.87 (8H, brs, pip), 3.35 (6H, s, (-NCH₃)), 4.55 (4H, t, $J = 7.2$, N-CH₂-), 7.05 (2H, brs, ArH), 7.24 (2H, m, ArH), 7.42–7.28 (4H, m, ArH), 7.75 (4H, dd, $J = 20.0$, 8.6, ArH), 8.04 (2H, d, $J = 8.7$, ArH), 8.45 (2H, brs, ArH), 9.93 (2H, s, 2(-NHCO-)).

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения и флуоресценции **DB₂Py(n)**

Измерения интенсивности и максимумов поглощения **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в отсутствие и в присутствии ДНК в разных концентрациях и сопоставление полученных спектров позволяют косвенно подтвердить способность новых димерных узкобороздочных лигандов образовывать комплексы с ДНК (рис. 3А,Б). При увеличении концентрации ДНК происходит падение интенсивности поглощения, что свидетельствует об образовании комплекса новых бисбензимидазолпирролов с ДНК. При дальнейшем увеличении концентрации ДНК происходит изменение положения максимума поглощения, характеризующееся сдвигом в длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг), а также увеличением амплитуды полосы поглощения. Все это свидетельствует об образовании нескольких типов комплексов с ДНК в зависимости от концентрации лиганда.

В спектрах флуоресценции соединений **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в присутствии ДНК наблюдается раз-

горание интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации ДНК (рис. 3В,Г). Это свидетельствует об образовании комплекса данных соединений с ДНК. Разгорание флуоресценции обуславливается стабилизацией сопряженной структуры лиганда в узкой бороздке ДНК.

Спектры кругового дихроизма **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в комплексе с ХЖКД ДНК

Спектры кругового дихроизма **DB₂Py(n)** в холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) ДНК позволяют подтвердить образование комплексов полученных соединений с ДНК и их локализацию в одной из бороздок ДНК.

Сходная картина спектров КД в ХЖКД наблюдается для соединений **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** (рис. 4) – в области поглощения лигандов (300–400 нм) присутствует положительная интенсивная полоса, что свидетельствует об образовании комплексов, локализованных в одной из бороздок ДНК [12, 13]. Методом рентгеноструктурного анализа исходного соединения **Hoechst 33258** получены данные, подтверждающие его локализацию в узкой бороздке ДНК [9], поэтому мы полагаем, что наши соединения являются узкобороздочными лигандами.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Цитотоксичность в отношении опухолевых клеток человека

Цитотоксическую активность соединений изучали МТТ-методом на шести клеточных линии-

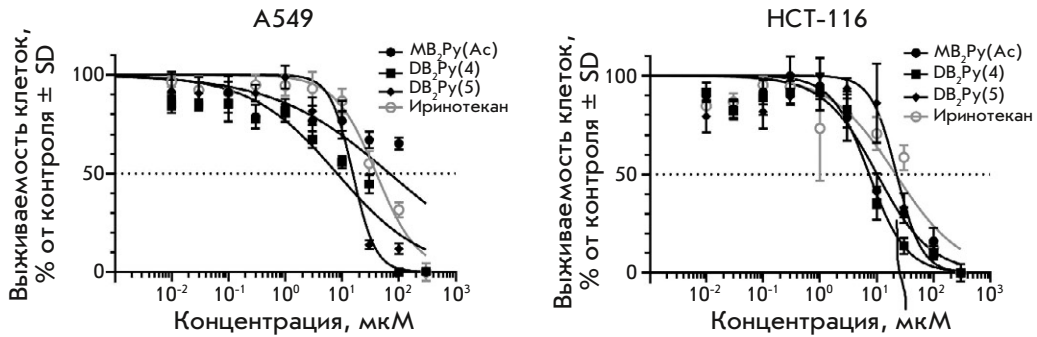
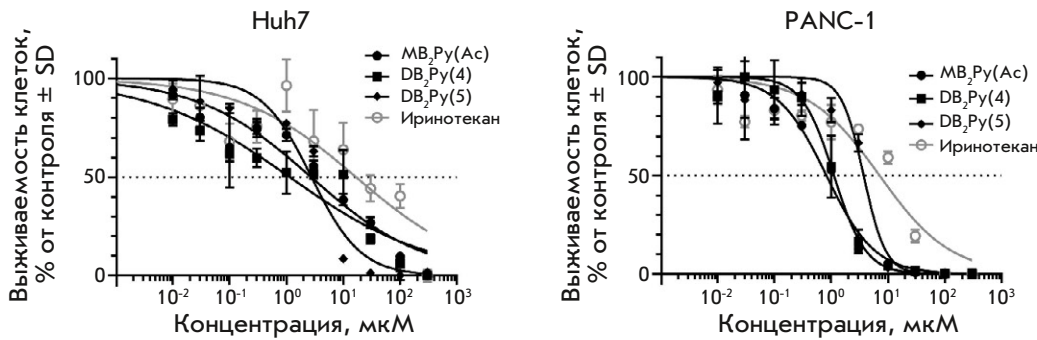
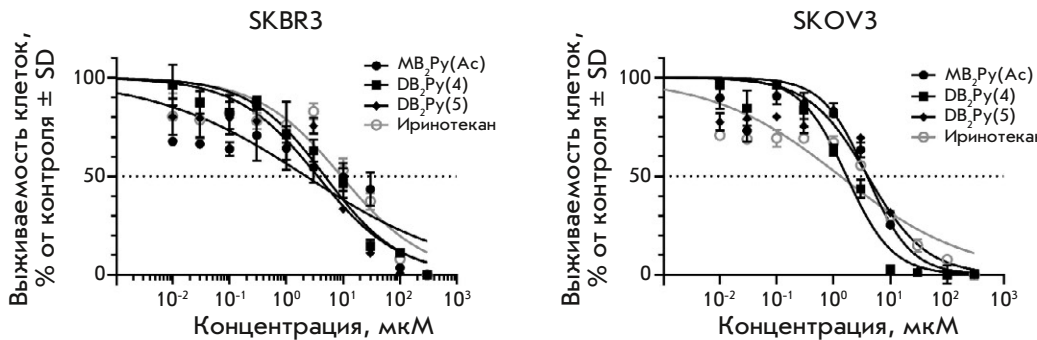


Рис. 5. Цитотоксичность (IC_{50}) мономерного и димерных бисбензимидазолпирролов в сравнении с иринотеканом на различных опухолевых клеточных линиях человека. SD – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка, R^2 – коэффициент детерминации

	A549				HCT-116			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	68.35	1.3E+11	6.5E+10	0.6736	10.13	3.546	1.773	0.9263
BD ₂ Py(4)	8.163	62.48	31.24	0.8911	7.343	1.4048	0.7024	0.9366
DB ₂ Py(5)	15.45	3.202	1.601	0.923	22.32	6.14	3.07	0.8363
Иринотекан	39.95	39.64	19.82	0.9488	21.44	102.08	51.04	0.8267



	Huh7				PANC-1			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	2.697	0.10548	0.05274	0.9061	0.8199	0.15072	0.07536	0.9802
BD ₂ Py(4)	1.133	0.09772	0.04886	0.8728	1.105	0.2964	0.1482	0.9421
DB ₂ Py(5)	2.745	0.11036	0.05518	0.9329	3.704	0.8638	0.4319	0.9407
Иринотекан	16.65	0.11536	0.05768	0.7239	7.064	4.46	2.23	0.8915



	SKBR3				SKOV3			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	2.22	9.002	4.50	0.8045	3.887	3.11	1.555	0.9313
DB ₂ Py(4)	4.754	6	3	0.947	1.694	1.0884	0.5442	0.9706
DB ₂ Py(5)	3.549	2.54	1.27	0.8604	3.991	2.836	1.418	0.8711
Иринотекан	9.259	12.298	6.149	0.8491	1.318	5.15	2.575	0.8844

Таблица 1. Цитотоксичность мономерного и димерных бисбензимидазолпирролов в сравнении с иринотеканом на первичной культуре клеток глиобластомы человека Gbl13n

Соединение	IC_{50} , мкМ
$MB_2Py(Ac)$	>100
$DB_2Py(4)$	12.67 ± 2.33
$DB_2Py(5)$	8.78 ± 6.64
Иринотекан	10.02 ± 0.7

ях и одной первичной культуре опухолей человека. Определена полуингибирующая концентрация (IC_{50}) на клетках немелкоклеточного рака легкого A549, рака толстой кишки HCT-116, гепатокарциномы Huh7, карциномы поджелудочной железы PANC-1, рака молочной железы SKBR3, рака яичников SKOV3 и на полученной нами ранее первичной культуре глиобластомы человека Gbl13n [14, 15]. Данные представлены на *рис. 5*. Показано, что линии Huh7, PANC-1 и SKBR3 обладают большей чувствительностью к воздействию новых соединений, чем к противоопухолевому средству иринотекан. Цитотоксичность димерных молекул $DB_2Py(4)$ и $DB_2Py(5)$ в отношении клеточной линии A549 была значительно выше (в 5–7 раз), чем у мономерной $MB_2Py(Ac)$ и иринотекана (в 2.8–3.8 раза). Однако не выявлено существенных различий в ци-

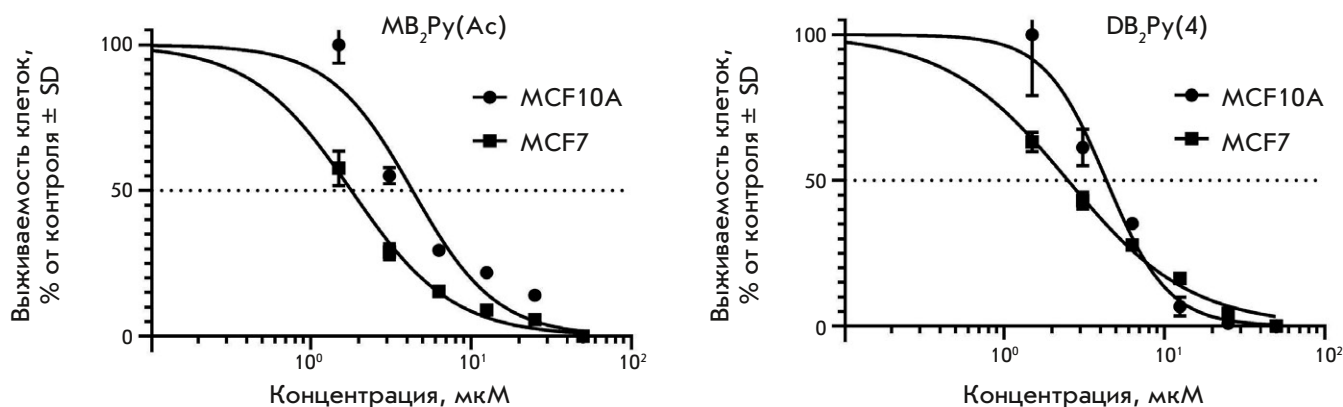
тотоксичности мономерных и димерных бисбензимидазолпирролов в отношении линий Huh7, PANC-1, SKBR3, SKOV3.

Существует мнение о необходимости тестировать новые лекарства не только на линейных, но и на первичных клеточных культурах. На первичной клеточной культуре глиобластомы человека Gbl13n цитотоксическая активность димеров $DB_2Py(4)$, $DB_2Py(5)$ приблизительно в 10 раз превысила активность мономера $MB_2Py(Ac)$ и была сопоставимой с иринотеканом (*табл. 1*).

Тестирование селективности в отношении опухолевых клеток

Возможную селективность новых соединений в отношении опухолевых клеток определяли по уровню их цитотоксичности на опухолевых и трансформированных клеточных линиях.

В качестве модели использовали клеточную линию MCF7 рака молочной железы и условно нормальную линию эпителиальных клеток молочной железы – MCF10A. Протестированные клеточные линии были чувствительны к токсическому действию новых бисбензимидазолпирролов. Наиболее восприимчивой оказалась опухолевая линия MCF7 (*рис. 6*). Таким образом, наблюдалась некоторая, приблизительно двукратная, селективность в цитотоксическом действии соединений на клетки опухолевого происхождения. Однако мономер $MB_2Py(Ac)$



Соединение	MCF10A				MCF7				F-тест
	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	
$MB_2Py(Ac)$	4.316	0.750099	0.5304	0.9225	1.793	0.228678	0.1617	0.9856	* $p < 0.0001$
$DB_2Py(4)$	4.355	0.932363	0.5383	0.9432	2.506	0.77388	0.4468	0.9702	* $p < 0.0001$

*Статистически значимые отличия.

Рис. 6. Сравнение цитотоксичности новых бисбензимидазолпирролов в отношении клеток MCF10A (эпителиальные клетки молочной железы человека, условно нормальная клеточная линия) и на MCF7 (рак молочной железы). SD – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка, R^2 – коэффициент детерминации, F-тест – статистический критерий

и димер **DB₂Py(4)** демонстрировали сходные значения IC_{50} для протестированных клеточных линий. Можно предположить, что удвоение молекулы не повлияло на уровень цитотоксичности в отношении исследуемой пары клеточных линий.

Влияние новых соединений на пролиферацию клеточной линии остеосаркомы

Влияние мономера **MB₂Py(Ac)** и димера **DB₂Py(5)** на пролиферацию культивируемых клеток остеосаркомы U2OS сравнивали в режиме реального времени с использованием прибора RTCA. После внесения веществ в концентрации 0.16–500 мкМ рост клеток фиксировался в течение 74 ч. В качестве контрольного соединения использовали пурамицин, который в концентрации 10 мг/мл (21 мМ) вызывал полную гибель клеток (рис. 7А). Более низкие дозы **MB₂Py(Ac)** (0.16, 0.8 и 4 мкМ) не влияли на пролиферацию U2OS (рис. 7Б). При концентрации 20 мкМ наблюдалось замедление пролиферации, в то время как 100–500 мкМ полностью останавливали деление клеток. Показано, что **DB₂Py(5)** ингибировал рост клеток остеосаркомы зависимым от концентрации и времени способом (рис. 7В). Таким образом, димер был очевидно токсичнее мономера.

Оценка возможности преодоления новыми соединениями множественной лекарственной устойчивости (МЛУ)

Важным свойством потенциального препарата является его способность преодолевать множественную лекарственную устойчивость клеток, опосредованную действием АВС-транспортера Р-гликопротеина (Р-гр). Новые мономерные и димерные бисбензимидазолпирролы тестировали МТТ-методом на иммортализованной, эпителиальной клеточной линии HBL-100 [16, 17] и на сублинии HBL-100/DOX, полученной из нее путем длительной инкубации с доксорубицином. Показано, что 95% клеток HBL-100/DOX сверхэкспрессируют белок Р-гр, отвечающий за установление резистентности клетки к лекарствам, в том числе обладают перекрестной устойчивостью к паклитакселу и винбластину. Таким образом, сублиния HBL-100/DOX обладает фенотипом МЛУ, т.е. резистентностью не только к доксорубицину, но и к другим субстратам Р-гр [18].

Сходное цитотоксическое действие мономеров на линию HBL-100 и ее устойчивую сублинию показано экспериментально – различия в величине IC_{50} не превышали 2 раз.

Представленные в табл. 2 данные показывают, что изучаемые нами бисбензимидазолпирролы не являются субстратами Р-гр. К димеру **DB₂Py(4)** устойчивость клеток HBL-100/DOX была выше в 9

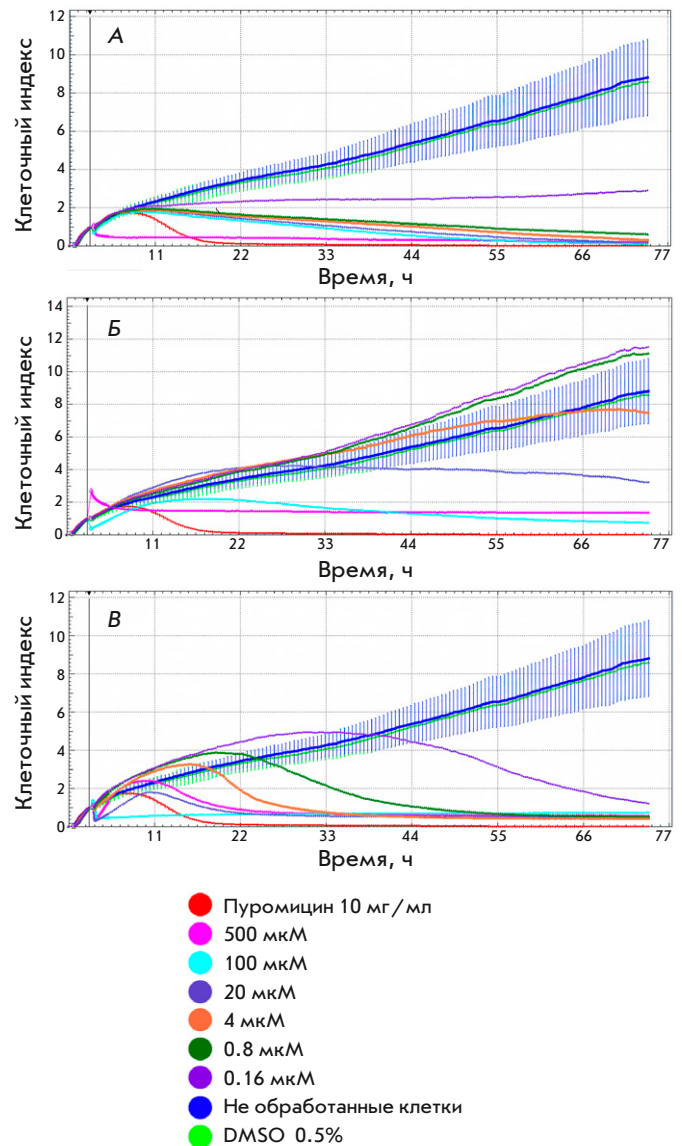


Рис. 7. Влияние бисбензимидазолов **MB₂Py(Ac)** и **DB₂Py(5)** на пролиферацию клеток остеосаркомы в режиме реального времени. Кривые роста представляют собой зависимость клеточного индекса от времени. А – контроль: красная линия – влияние пурамицина (10 мг/мл), синяя – рост клеточной линии U2OS без воздействия химических соединений, зеленая – влияние 0.5% DMSO, Б – воздействие на клетки мономера **MB₂Py**, В – воздействие димера **DB₂Py(5)**

раз по сравнению с HBL-100. Тогда как устойчивость клеток, сверхэкспрессирующих Р-гр, к таким классическим субстратам Р-гр, как доксорубицин и паклитаксел, возрастала в 50–100 и более раз. Можно заключить, что соединение **DB₂Py(4)** является слабым субстратом Р-гр. Таким образом, только мономерные бисбензимидазолпирролы **MB₂Py** и **MB₂Py(Ac)** способны полностью преодолевать МЛУ, ассоциированную со сверхэкспрессией Р-гр.

Таблица 2. Цитотоксичность новых бисбензимидазолпирролов на чувствительной линии HBL-100 и ее устойчивой сублинии HBL-100/DOX с фенотипом МЛУ

Соединение	HBL-100	HBL-100/DOX	Индекс устойчивости*
	$IC_{50} \pm SD, \text{ мкМ}$		
Доксорубин	0.6 ± 0.3	34 ± 6	57
MB₂Py	58 ± 18	125 ± 21	2.1
MB₂Py(Ac)	18 ± 11	29 ± 11	1.5
DB₂Py(4)	4 ± 4.5	37 ± 11	8.9

*Индекс устойчивости – отношение значений IC_{50} в устойчивой сублинии HBL-100 к IC_{50} чувствительной линии HBL-100/DOX.

Проникновение в клетку

Способность новых соединений проникать в течение 2 суток в клеточное ядро, где они, связываясь с гетерохроматином, светятся яркими синими точками, подтверждена методом флуоресцентной микроскопии (рис. 8).

Таким образом, синтезированные соединения являются новыми перспективными флуоресцентными красителями, способными проникать через клеточную и ядерную мембраны и эффективно окрашивать ядра клеток.

Анализ клеточного цикла после воздействия исследуемых соединений

Влияние новых веществ на клеточный цикл изучали с использованием двух контрольных лекарств – этопозида и иринотекана. Этопозид останавливал клеточный цикл в митозе, что видно по накоплению клеток в фазе G2/M и согласуется с данными [19]. Через 48 ч после обработки клеток этопозидом клеточная популяция в фазе G2/M увеличивалась с 47 до 70%. Иринотекан блокировал клеточный цикл в S-фазе, что приводило к уменьшению распределения клеточных популяций в других фазах [20]. Клетки под воздействием иринотекана через 24 ч накапливались в S-фазе и, как следствие, через 48 ч – в фазе G0/G1. Видимо, накопление в G0/G1 происходило за счет клеток, успевших поделиться и перейти из митоза в фазу G0/G1. Через 48 ч наблюдалось незначительное увеличение доли клеток, находящихся в раннем апоптозе (рис. 9).

Количественное определение клеток, присутствующих в различных фазах клеточного цикла, показало, что новые бисбензимидазолпирролы оказывают одинаковое действие на клеточный цикл, сходное с действием иринотекана. Через 24 ч происходит увеличение клеточной популяции в S-фазе клеточного цикла до 62–67% по сравнению с контролем.

Через 48 ч происходит перераспределение клеточных популяций в сторону увеличения клеток

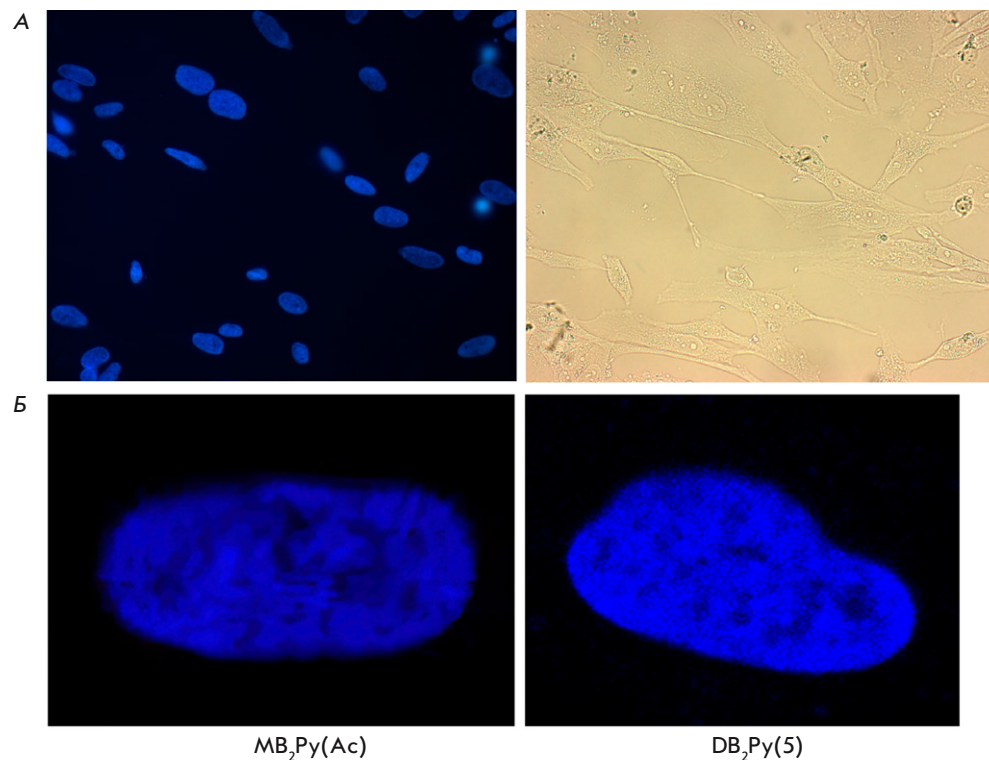


Рис. 8. Флуоресцентное окрашивание клеток глиобластомы Gbl13p, инкубированных с мономерным и димерным бисбензимидазолпирролом в концентрации 2 мкМ в течение 48 ч. А – популяция окрашенных клеток бисбензимидазолпирролом **DB₂Py(5)**. Слева – DAPI-фильтр, справа – фазово-контрастное изображение. Окрашивание **MB₂Py(Ac)** выглядит сходным образом через 2 суток. Б – фото окрашенных ядер, полученное с помощью конфокального микроскопа

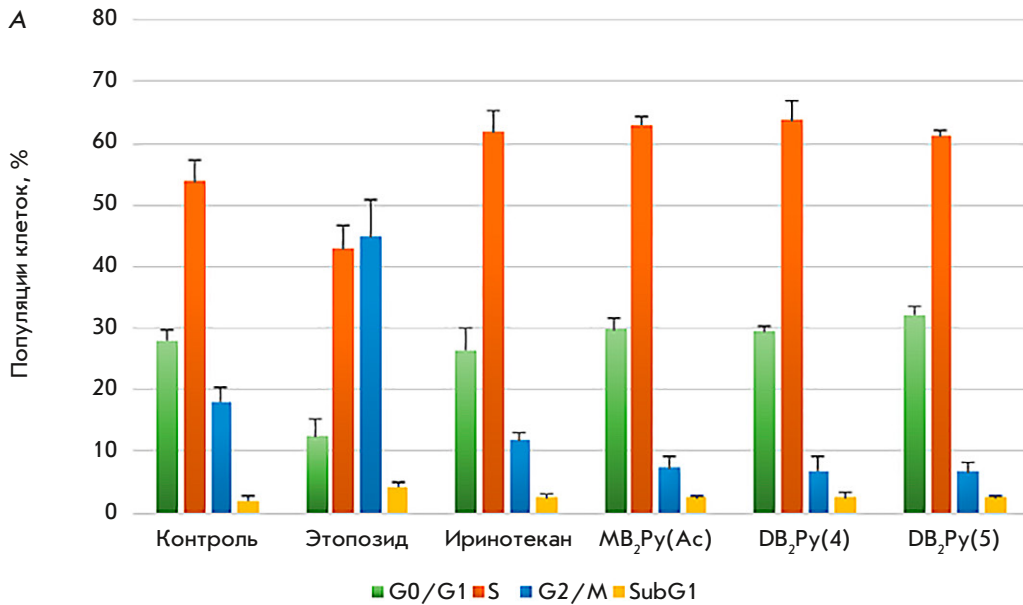
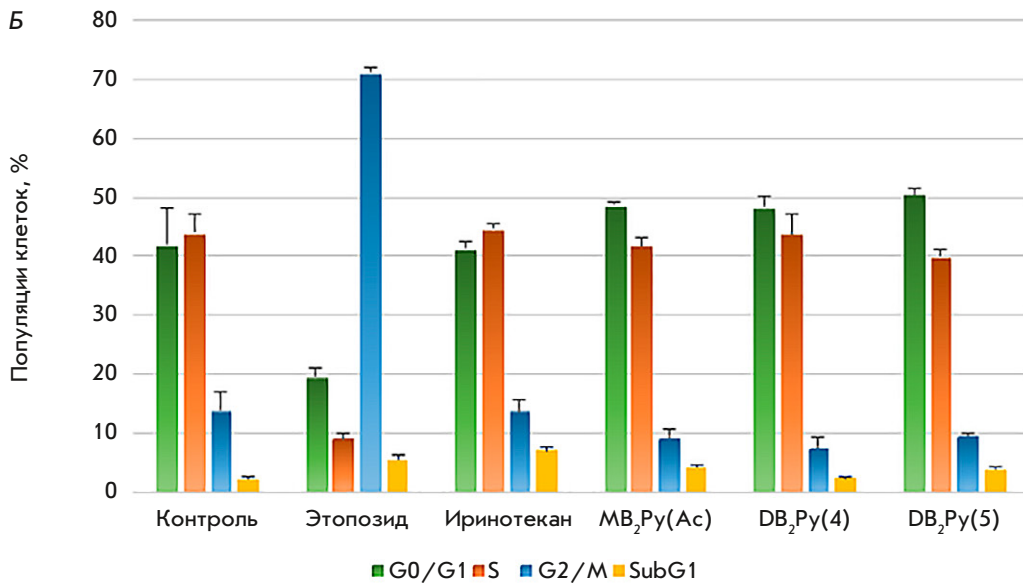


Рис. 9. Влияние бис-бензимидазолпирролов на клеточный цикл на примере клеточной линии HCT-116.

А – инкубация с веществами в течение 24 ч.
Б – инкубация с веществами в течение 48 ч

24 ч	Контроль	Этопозид	Иринотекан	MB ₂ Py(Ac)	DB ₂ Py(4)	DB ₂ Py(5)
G0/G1	28.0 ± 1.6	12.4 ± 2.7	26.4 ± 3.7	29.8 ± 1.8	29.5 ± 0.8	32.2 ± 1.2
S	53.9 ± 3.4	42.9 ± 3.8	61.8 ± 3.5	62.9 ± 1.4	63.7 ± 3.2	61.2 ± 0.9
G2/M	18.1 ± 2.3	44.7 ± 6.2	11.8 ± 1.3	7.3 ± 1.7	6.8 ± 2.5	6.6 ± 1.6
SubG1	2.0 ± 0.8	4.3 ± 0.8	2.4 ± 0.8	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.3



48 ч	Контроль	Этопозид	Иринотекан	MB ₂ Py(Ac)	DB ₂ Py(4)	DB ₂ Py(5)
G0/G1	42.1 ± 6.2	19.7 ± 1.2	41.5 ± 0.9	48.8 ± 0.4	48.5 ± 1.7	50.6 ± 0.9
S	44.0 ± 3.2	9 ± 1	44.8 ± 0.8	41.9 ± 1.3	43.9 ± 3.1	40.0 ± 1.1
G2/M	13.9 ± 3.2	71.3 ± 0.7	13.8 ± 1.7	9.3 ± 1.4	7.6 ± 1.6	9.4 ± 0.6
SubG1	2.1 ± 0.4	5.4 ± 0.9	6.9 ± 0.6	4.1 ± 0.4	2.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5

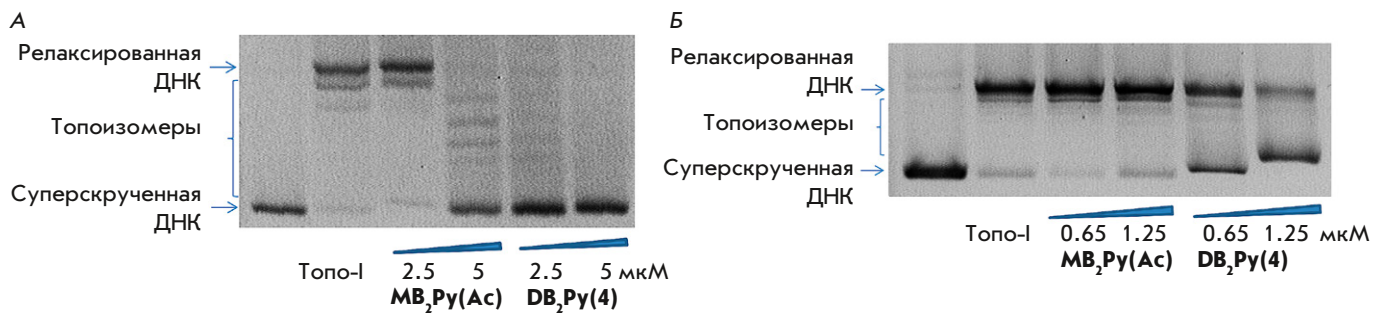


Рис. 10. Ингибирование Топо-І из тимуса теленка мономером **MB₂Py(Ac)** и его димером **DB₂Py(4)**. А – влияние веществ на активность Топо-І в концентрации 2.5 и 5 мкМ, Б – в концентрации 0.65 и 1.25 мкМ

в фазе G₀/G₁. Таким образом, новые бисбензимидазолпирролы воздействуют на фазу синтеза (S) клеточного цикла.

DB₂Py(4) почти не индуцировал апоптоз. Остальные вещества индуцировали ранний апоптоз, но значения превышали контрольные всего в 2–3 раза.

Топоизомераза I – возможная мишень новых производных Hoechst 33258

Некоторые типы опухолей, такие, как рак молочной железы, рак яичников, рак прямой кишки, характеризуются повышенной активностью Топо-І, фермента, который играет ключевую роль в функционировании клетки, регулируя структуру ДНК в процессах транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации. Топо-І может релаксировать (раскручивать) суперскрученные молекулы ДНК путем образования одноцепочечных разрывов с их последующим лигированием для релаксации сверхвитков. В настоящее время Топо-І является признанной мишенью при таргетной терапии опухолей [21–23].

Узкобороздочные лиганды, не связываясь ковалентно с ДНК, не изменяя существенно ее конформацию, способны конкурировать с Топо-І за связывание по АТ-парам оснований. Эффект ингибирования Топо-І выявляли по способности исследуемых соединений задерживать реакцию релаксации ДНК *in vitro*.

Установлено, что исследуемые соединения (рис. 10) обладают Топо-ингибирующей активностью. При концентрации мономера и димера 5 и 2.5 мкМ, соответственно, наблюдалось сохранение суперскрученной ДНК в реакции релаксации ДНК Топо-І (ТороGen) (рис. 10А). Наиболее эффективно каталитическую активность Топо-І ингибировал димер **DB₂Py(4)**. В сравнении с **MB₂Py(Ac)** уже при концентрации 0.65 мкМ **DB₂Py(4)** фиксировалось сохранение ДНК (рис. 10Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бензимидазол является фундаментальным фармакофором при создании лекарств из-за его широкого спектра биологической активности [24–27]. При моделировании новых флуоресцентных бисбензимидазольных молекул мы предполагали, что введение в состав ранее полученных серий **DB(n)**, **DVA(n)** АТ-специфичного пирролкарбоксамидного фрагмента, имеющего сродство к АТ-парам ДНК, позволит усилить их цитотоксичность. Два бисбензимидазольных блока в составе новой молекулы несли флуоресцентные свойства и взаимодействовали с ДНК. Использование гибкого линкера в димерных соединениях **DB₂Py(n)** позволит молекуле связываться с двумя АТ-богатыми сайтами, находящимися на разных расстояниях друг от друга. Полученные новые бисбензимидазолпирролы в комплексе с ДНК имеют планарную форму, изогеометричную узкой бороздке ДНК, что благоприятствует лучшему взаимодействию новых лигандов с ДНК.

С использованием спектров поглощения, флуоресценции и кругового дихроизма мы показали способность бисбензимидазолпирролов взаимодействовать с ДНК. Так как в основе новых соединений лежит молекула **Hoechst 33258**, известная своей локализацией в узкой бороздке ДНК, мы относим наши новые бисбензимидазолы к узкобороздочным лигандам [28, 29]. Наличие в молекуле лиганда двух бисбензимидазольных фрагментов ведет к значительному увеличению его аффинности к полинуклеотиду, что дает экспериментальную основу для целенаправленного синтеза нового класса потенциальных противоопухолевых препаратов на основе димерных бисбензимидазолов.

Показана способность новых флуоресцентных соединений влиять на S-фазу клеточного цикла, проникать в ядро клетки, а также в низких концентрациях ингибировать Топо-І в бесклеточной модели. Новая серия бисбензимидазолпирролов оказалась более токсичной, чем ранее полученные серии

DB(n), DBA(n), в отношении опухолевых линий клеток человека и менее токсичной для клеточной линии неопухолевой природы. Небольшие, в 2 раза, но статистически значимые различия в цитотоксичности мономера и димера продемонстрированы на паре линий клеток молочной железы человека – опухолевого и не опухолевого происхождения.

Ранее в нашей работе была показана способность бисбензимидазолпирролов индуцировать Vcl-x1 -опосредованный апоптоз [30]. Известно, что нетропсин влияет на активность эукариотических транскрипционных факторов [31, 32]. Мы полагаем, что наши новые соединения, содержащие в своей структуре фрагмент нетропсина, имеют сходный механизм действия. Эти предположения подтверждаются данными о связывании с ДНК и остановке клеточного цикла в фазе синтеза при нетоксичной концентрации бисбензимидазолпирролов.

Димеризация молекулы усиливает аффинность к ДНК, повышает Топо-I-ингибирующие свойства *in vitro*. Однако определение методом МТТ цитотоксичности новых соединений на линиях опухолевых клеток не выявило очевидного преимущества димерной молекулы, несмотря на способность проникать в ядро клетки. Тем не менее высокочувствительный тест на пролиферацию в режиме реального времени подтвердил усиление токсических свойств при димеризации бисбензимидазолпиррола.

Важными характеристиками новых соединений как потенциальных противоопухолевых средств являются селективность и преодоление МЛУ. Одной из основных причин слабой эффективности современной химиотерапии является селекция опухолевых клеток с фенотипом МЛУ, способных выжи-

вать при длительном применении лекарственных средств. Наиболее известный механизм МЛУ характеризуется сверхэкспрессией белка Р-гр, входящего в семейство АВС-транспортёров. Предварительное определение цитотоксичности бисбензимидазолпирролов на клеточной модели с фенотипом МЛУ показало, что димеризация молекулы приводит, по-видимому, к взаимодействию с белком Р-гр и, как следствие, к росту устойчивости линии HBL-100/DOX к этому соединению (в среднем в 9 раз) по сравнению с доксорубицином (50–100 и более раз). Интерес представляет возможность непосредственного взаимодействия новых молекул с Р-гр-транспортёром.

Возможно, недооцененное преимущество димерных соединений в биологической активности связано с их большей склонностью к образованию агрегатов по сравнению с мономерными молекулами. Решение проблемы агрегации димерных молекул может привести к получению значительно более активных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированные новые цитотоксичные димерные бисбензимидазолпирролы **DB₂Py(n)** представляются перспективными для дальнейшего глубокого изучения их свойств и механизма действия в отношении опухолевых клеток человека, а также для дизайна новых молекул. ●

Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-25-00373.

Авторы выражают благодарность А. Зайцеву за помощь в оформлении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Venugopal S., Kaur B., Verma A., Wadhwa P., Magan M., Hudda S., Kakoty V. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2023. V. 102. P. 357–376.
- Wu K., Peng X., Chen M., Li Y., Tang G., Peng J., Peng Y., Cao X. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2022. V. 99. № 5. P. 736–757.
- Tyagi Y.K., Jali G., Singh R. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2022. V. 22. № 19. P. 3280–3290.
- Brishty S.R., Hossain M.J., Khandaker M.U., Faruque M.R.I., Osman H., Rahman S.M.A. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 762807.
- Ivanov A.A., Salyanov V.I., Strel'tsov S.A., Cherepanova N.A., Gromova E.S., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2011. V. 37. № 4. P. 530–541.
- Koval V.S., Ivanov A.A., Salyanov V.I., Stomakhin A.A., Oleinikov V.A., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. № 2. P. 167–173.
- Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.L., Klimova R.R., Kushch A.A., Rybalkina E.Yu., Susova O.Yu., Zhuze A.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. № 9. P. 2302–2309.
- Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I., Kostyukov A.A., Melkina O.E., Zavlilgelsky G.B., Klimova R.R., Kushch A.A., Korolev S.P., Agapkina Y.Yu., et al // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28. P. 115378.
- Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 2671–2690.
- Finlay A.C., Hochstein F.A., Sobin B.A., Murphy F.X. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. № 1. P. 341–343.
- Lisitsina E.S., Durandin N.A., Ivanov A.A., Strel'tsov S.A., Susova O.Yu., Shtil A.A., Zhuze A.L., Kuz'min V.A. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2012. V. 46. P. 922–927.
- Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Lortkipanidze G.B. // *Liquid Crystals*. 1992. V. 12. № 1. P. 1–16.
- Gromyko A.V., Salyanov V.I., Strel'tsov S.A., Oleinikov V.A., Korolev S.P., Gottikh M.B., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. № 6. P. 613–623.
- Susova O., Poletaeva A., Lupatov A., Kholodenko I., Karamysheva A., Mitrofanov A.A., Naskhletashvili D., Nasedkina T., Bekyashev A. // *Ann. Oncol.* 2021. № 32. P. 519.
- Ammour Y., Susova O., Krasnov G., Nikolaeva E., Varachev

- V., Schetinina Y., Gavrilova M., Mitrofanov A., Poletaeva A., Bekyashev A., et al // *Viruses*. 2022. V. 14. № 11. P. 2433.
16. Gaffney E.V. // *Cell Tissue Res*. 1982. V. 227. P. 563–568.
17. Saint-Ruf C., Nardeux P., Estrade S., Brouty-Boye D., Lavialle C., Rhim J.S., Cassingena R. // *Exp. Cell Res*. 1988. V. 176. P. 60–67.
18. Rybalkina E.Y., Moiseeva N.I., Karamysheva A.F., Eroshenko D.V., Konyseva A.V., Nazarov A.V., Grishko V.V. // *Chem. Biol. Interact*. 2021. V. 1. № 348. P. 109645.
19. Chen H., Shan J., Chen D., Wang R., Qi W., Wang H., Ke Y., Liu W., Zeng X. // *J. Cell. Physiol*. 2018. V. 234. P. 11871–11881.
20. Khader E.I., Ismail W.W., Mhaidat N.M., Alqudah M.A. // *Int. J. Hlth Sci. (Quassim)*. 2021. V. 15. P. 34–41.
21. Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 10. P. 789–802.
22. Li T.-K. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2001. V. 41. P. 53–77.
23. Pommier Y. // *ACS Chem. Biol*. 2013. V. 8. № 1. P. 82–95.
24. Verma S., Ravichandiran V., Ranjan N., Flora S.J.S. // *Med. Chem*. 2020. V. 16. № 4. P. 454–486.
25. Akhtar W., Khan M.F., Verma G., Shaquiquzzaman M., Rizvi M.A., Mehdi S.H., Akhter M., Alam M.M. // *Eur. J. Med. Chem*. 2017. V. 27. № 126. P. 705–753.
26. Shrivastava N., Naim M.J., Alam M.J., Nawaz F., Ahmed S., Alam O. // *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2017. V. 350. P. 1700040.
27. Gao C., Li B., Zhang B., Sun Q., Li L., Li X., Chen C., Tan C., Liu H., Jiang Y. // *Bioorg. Med. Chem*. 2015. V. 23. № 8. P. 1800–1807.
28. Evdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Lortkipanidze G.B. // *Liquid Crystals*. 1992. V. 12. № 1. P. 1–16.
29. Pjura P.E., Grzeskowiak K., Dickerson R.E. // *J. Mol. Biol*. 1987. V. 20. № 197. P. 257–271.
30. Ianevski A., Kuleskiy E., Krpina K., Lou G., Aman Y., Bugai A., Aasumets K., Akimov Y., Bulanova D., Gildemann K., et al. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. P. 1694.
31. Belikov S.V., Grokhovsky S.L., Isaguliantz M.G., Surovaya A.N., Gursky G.V. // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2005. V. 23. № 2. P. 193–202.
32. Dickinson L.A., Gulizia R.J., Trauger J.W., Baird E.E., Mosier D.E., Gottesfeld J.M., Dervan P.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 22. P. 12890–12895.