

## Трабектедин – лиганд узкой бороздки ДНК

Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская

НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;  
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Геннадий Альтерович Белицкий belitsga@gmail.com

Трабектедин (*Trabectedin*, ET-743, *Yondelis*) – алкалоид, который был выделен из беспозвоночного обитателя Карибского бассейна *Ecteinascidia turbinata*, в настоящее время производится синтетически. Его молекула содержит 3 тетрагидроизохинолиновых функциональных домена, 2 из которых ковалентно связываются с гуанином узкой бороздки ДНК и изгибают молекулу в сторону широкой бороздки, а 3-я находится вне дуплекса и препятствует взаимодействию транскрипционных факторов с ДНК. В результате этого индуцируется каскад событий, нарушающих связывание транскрипционных факторов с ДНК и процессы эксцизионной репарации. Трабектедин, связываясь с обеими цепями ДНК, вызывает межнитевые сшивки, а кроме того, ингибирует работу топоизомераз. Аддукты трабектедина связывают белки эксцизионной репарации, препятствуя их нормальному функционированию и индуцируя разрывы ДНК. Клетки, дефектные по гомологичной рекомбинации, которая репарирует двойные разрывы, особо чувствительны к трабектедину. По этой причине к трабектедину чувствителен ряд опухолей, и в первую очередь миксоидные липосаркомы, а также рак яичников и молочной железы с мутантными генами *BRCA1* и *BRCA2*. У больных с рецидивами сарком, ставшими резистентными к производным платины, трабектедин также оказал терапевтическое действие. Кроме воздействия на опухолевые клетки, трабектедин ингибирует воспалительный процесс путем апоптоза моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов, а также опосредованного воздействия на продукцию провоспалительных медиаторов: цитокинов и хемокинов. Трабектедин также ингибирует экспрессию гена *MDR-1*, ответственного за резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам, и препятствует ангиогенезу.

**Ключевые слова:** трабектедин, узкая бороздка ДНК, лиганд, злокачественная опухоль, химиотерапия, репарация ДНК, рекомбинация, метаболизм, гепатотоксичность

DOI: 10.17 650/2313-805X. 2015.2.2.41–49

### Trabectedin – the DNA minor groove binder

G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center;  
24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia

*Trabectedin (ET-743, Yondelis) is an alkaloid that was originally isolated from the Caribbean Sea squirt, Ecteinascidia turbinata and is now produced synthetically. Its chemical structure consists in three fused tetrahydroisoquinoline rings. Two of them, A and B, binds covalently to guanine residues in the minor groove of the DNA double helix to bend the molecule toward the major groove and the third ring C protrudes from the DNA duplex, apparently allowing interactions with several nuclear proteins. Binding to the minor groove of DNA, trabectedin trigger a cascade of events that interfere with several transcription factors, DNA binding proteins, and DNA repair pathways in particular nucleotide excision repair. It acts both as a DNA-alkylating drug and topoisomerase poison. Trabectedin-DNA adduct traps the nucleotide excision repair proteins repairing the DNA damage in transcribing genes and induces DNA strand breaks. Cells deficient in homologous recombination pathway which repairs these double-strand breaks show increased sensitivity to trabectedin. The most sensitive of them were myxoid liposarcomas. Trabectedin is also effective in chemotherapy-experienced patients with advanced, recurrent liposarcoma or leiomyosarcoma as well as in women with ovarian cancer and breast cancer with BRCAness phenotype. Besides of tumor cells Trabectedin inhibits inflammatory cells by affecting directly monocytes and tumor-associated macrophages and indirectly by inhibiting production of inflammatory mediators, the cytokines and chemokines. It inhibits also the MDR-1 gene, which is responsible for the resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents and strikes tumor angiogenesis.*

**Key words:** trabectedin, DNA minor groove, ligand, malignant tumor, chemotherapy, DNA repair, recombination, metabolism, hepatotoxicity

Доктор, я изобрел отличное лекарство,  
подберите к нему болезнь!

#### Введение

Создание противоопухолевых препаратов идет 2 основными путями. Первый направлен на изучение механизмов злокачественного роста и поиск факторов, отличающих злокачественную клетку от нормаль-

ной. На основе найденных отличий создаются препараты с действием определенной избирательности. Основа второго пути – широкий скрининг активных молекул любого происхождения. При их исследовании на клеточных культурах и перевиваемых опухолях обнаруживаются соединения как с широким спектром действия, так и с относительно узким, избирательно направленным на опухоли со специфическими нару-

шениями клеточного метаболизма. В таких случаях для них в мозаике человеческой онкопатологии отыскиваются подходящие варианты.

Примером цитостатика, высокоэффективного в отношении узкого круга опухолей, резистентных к другим препаратам, является лиганд узкой бороздки ДНК трабектедин, известный также как Ecteinascidin-743, Yondelis, ET-743, NSC-684766. Он представляет собой алкалоид тетрагидроизохинолинового ряда, найденный в ткани беспозвоночного обитателя Карибского бассейна *Ecteinascidia turbinata*. Экспериментальные данные о высокой противоопухолевой активности трабектедина известны с 1969 г., но разрешение к его применению в странах Европейского союза было получено только через 38 лет, в конце 2007 г., когда обнаружилась его выдающаяся эффективность при лечении сарком мягких тканей.

### Механизм связывания с малой бороздкой ДНК

Трабектедин содержит 3 тетрагидроизохинолиновых функциональных домена (рис. 1) и обладает в общей сложности 7 хиральными центрами и 8 циклами, включая один 10-членный гетероцикл, содержащий остаток цистеина. В отличие от других алкилирующих агентов, связывающихся с гуанином ДНК в положениях N7 или O6 в большой бороздке, трабектедин связывается с N2 экзоциклической аминогруппой гуанина в малой бороздке. Другим отличием является то, что при этом ДНК изгибается в сторону большой бороздки [1, 2].

Связывание с ДНК происходит через иминиевую группу, образующуюся путем дегидрирования карбиноламинной группы — домена А (см. рис. 1). Эта группа играет главную роль в механизме связывания трабектедина с гуанином, так как лишенное его производное (ЕТ-745) не образует аддуктов с ДНК и обладает в 100 раз меньшей цитотоксичностью [3].

Как и в случае других узкобороздочных лигандов, связь трабектедина с ДНК дополнительно стабилизируется по механизму ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей доменов А и В с нуклеотидами обеих цепей ДНК. Преимущественными сайтами связывания являются триплеты TGG, CGG, AGC и GGC, но не CGA (рис. 2) [5]. Анализ аддуктов трабектедина на ДНК показал, что в триплетах он связывается с тем же гуанином, что и цинковый палец транскрипционных факторов типа EGR1, активирующих экспрессию пропролиферативных и провоспалительных генов [6].

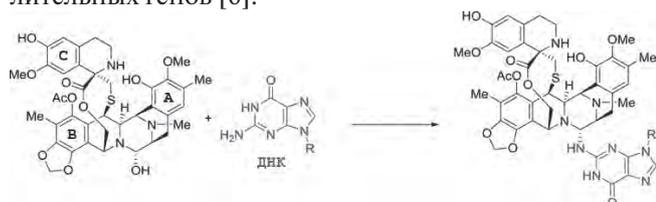


Рис. 1. Структура трабектедина (А, В и С) и его взаимодействие с гуанином (адаптировано из [4])

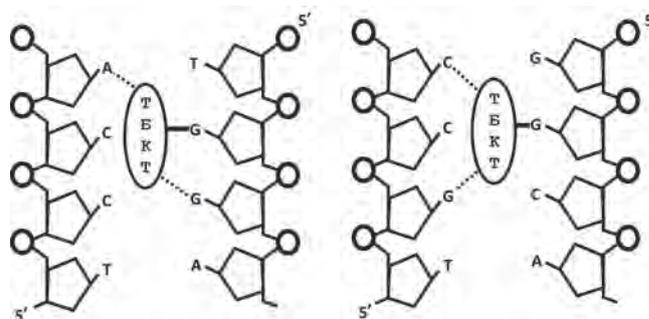


Рис. 2. Схема связывания трабектедина с 2 избирательными триплетами: — ковалентная связь; - водородная связь; ТБКТ — трабектедин (адаптировано из [5])

Эксперименты по изучению роли домена С в свойствах трабектедина дали неоднозначные результаты. Этот домен не участвует в связывании с ДНК, так как находится вне дуплекса ДНК. Предполагалось, что такое его расположение препятствует связыванию ДНК с белками репарации и различными транскрипционными факторами и потому необходимо для действия трабектедина.

О роли оригинальной структуры домена С для свойств молекулы трабектедина свидетельствуют результаты ряда работ с его химической модификацией, которая приводила к снижению цитотоксичности производных и утрате способности избирательно подавлять систему эксцизионной репарации [3, 7]. При этом в одной из работ описано производное, лишенное домена С, которое, по данным авторов, сохранило цитотоксичность трабектедина [8].

### Метаболизм трабектедина и проблема лекарственного взаимодействия

**Метаболизм трабектедина.** Трабектедин является субстратом практически для всех известных изоформ цитохрома Р450 (СYP3А, 2С9, 2С19, 2D6, 2Е1, 3А4), кроме СYP1В1, 2С19 и 4А11. Вследствие этого он преобразуется во множество различных метаболитов. Основные окислительные и деметилирующие изменения происходят в домене А. Домен С подвергается O-деметилрованию [9].

Среди изученных метаболитов, обозначаемых как ЕТ-745, ЕТ-759А, ЕТМ-259, ЕТМ-217, ЕТМ-204 и ЕТ729, последний (N-дисметилтрабектедин) привлекает внимание как производное, с которым связано гепатотоксическое действие трабектедина. Во 2-й фазе метаболизма часть производных взаимодействует с конъюгирующими ферментами — глутатион-S-трансферазой (GST-M1) и глюкуронозилтрансферазой (UGT1A12B15). Конечные продукты выводятся из организма в основном с калом, а часть с мочой в виде глюкуронидов. В неизменном виде выводится не более 1 % трабектедина [10].

Ограниченные экспериментальные возможности в клинике поставили вопрос об адекватности моделей,

используемых для изучения метаболизма и механизма действия трабектедина. Поскольку масштабные исследования в фармакологии проводятся на грызунах, метаболизм трабектедина у крыс сравнивали с метаболизмом собак, обезьян и человека. В микросомах печени человека и обезьян трабектедин метаболизируется главным образом изоформой CYP3A4 и в меньшей степени CYP2C9, CYP2D6 и CYP2E1, а в микросомах крысы и собаки — в основном CYP3A2 и CYP2A2. Наиболее чувствительными к гепатотоксическому действию трабектедина оказались самки крыс, у которых морфологические и функциональные изменения в печени были намного более выраженными и длительными, чем у других изученных видов. У пациентов, получавших трабектедин в соответствии с принятыми схемами, эти изменения были менее выражены и нормализовались после отмены препарата. Эти данные послужили основой для коррекции результатов, полученных на крысах. Кроме того, выяснилось, что результаты, получаемые на разных уровнях организации живого: в биохимических системах *in vitro*, в культуре клеток и на животных — могут существенно отличаться как друг от друга, так и от данных клинических исследований, что ограничивает их прогностическую ценность.

Например, у крыс наблюдаются четкие половые различия в чувствительности к гепатотоксическому действию трабектедина. Самки значительно более чувствительны, чем самцы. Это связано с тем, что у самок в печени образуется и выделяется с желчью в 5 раз больше цитотоксичного производного, чем у самцов. В выделенных микросомах человека также обнаруживаются половые различия в метаболизме трабектедина, но в клинике различий в токсичности трабектедина у женщин и мужчин нет, т. е. в данном случае модель с учетом сходства по одному из параметров не имеет прогностической значимости для клиники.

Точно так же индивидуальный полиморфизм ферментов CYP (3A4, 2C9, 2D6, 2C19, 2E1, GST-M1, P1, T1 и UGT1A1 2B15), выявленный в препаратах микросом из биоптатов больных, не отразился на общих показателях фармакодинамики и фармакокинетики трабектедина [10–12].

**Лекарственное взаимодействие.** Система ферментов CYP, метаболизирующая трабектедин, активируется и ингибируется многими соединениями, в том числе и лекарственными препаратами. В связи с этим важно знать их влияние на эффективность действия трабектедина для того, чтобы предвидеть последствия лекарственных взаимодействий. В эксперименте было показано, что предобработка крыс индукторами изоформ типа CYP3A (фенобарбитал, дексаметазон) повышает интенсивность метаболизма трабектедина, тогда как индукция изоформ типа CYP1B1 (20-метилхолантрен) неэффективна. Ингибиторы изоформ CYP3A значительно снижали уровень метаболизма трабектедина, тогда как соединения, ингибирующие

другие изоформы (CYP2E, CYP2C, CYP2A), влияли на него мало [13].

В то же время клинические исследования с использованием некоторых индукторов и ингибиторов системы метаболизма трабектедина показали, что не все активные в эксперименте соединения эффективны для человека. Это относится к индуктору CYP3A4 рифампину (полусинтетический противотуберкулезный антибиотик) и ингибитору кетоконазолу (противогрибковый препарат имидазольного ряда), которые в отличие от дексаметазона не оказали никакого действия на токсичность и метаболизм трабектедина у больных, хотя на микросомных препаратах ожидаемый эффект ингибирования и стимулирования был обнаружен [14].

Потенциальными ингибиторами изоформы CYP3A4, совместное применение с которыми может повлиять на фармакокинетику трабектедина и его токсичность, являются итраконазол, кларитромицин, атазанавир, индинавир, нефазодон, нелфинавир, ритонавир, саквинавир, телитромицин и вориконазол. Очевидно, что этот список не окончательный, и изучение лекарственного взаимодействия трабектедина с другими препаратами будет продолжено.

Следует иметь в виду, что отдельные продукты питания также способны модифицировать эффекты трабектедина. Описан случай, когда больной липосаркомой «подкреплял» действие трабектедина большим количеством сока черноплодной рябины. Это вызвало у него 2 осложнения: рабдомиолиз и тяжелое нарушение функций печени. Отмена средства домашней медицины привела к восстановлению мышц и нормализации ферментов печени [15].

Способностью ингибировать отдельные изоформы CYP обладают и другие растительные препараты. К ним относят применяемые в качестве психостимуляторов женьшень (ингибирующий CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A) и гинкго билоба (CYP2D6 и CYP3A4), иммуностимуляторы эхинацею (CYP2D6, CYP3A) и алоэ (CYP3A, CYP2C9), антидепрессант зверобой (CYP2D6, CYP3A, CYPB1, CYP1A2), а также продукты питания, такие как зеленый чай (CYP3A, CYP2C9, CYP3A4), чеснок (CYP3A, CYP2C9, CYP2C19) и др.

### Механизмы ингибирования роста опухоли

Распространенность в геноме триплетов, с которыми связывается трабектедин, обуславливает множественность его эффектов на опухоль. Наиболее существенными для химиотерапии (ХТ) являются:

- индукция разрывов ДНК и предотвращение их репарации путем блокады (nukleotide excision repair, NER), связанной с транскрипцией;
- блокирование транскрипционной активности химерных белков;
- токсическое действие на мононуклеары и ассоциированные с опухолью макрофаги;
- ингибирование ангиогенеза.

**Индукция разрывов ДНК и предотвращение их репарации системой NER.** Большинство используемых в настоящее время цитостатиков наиболее эффективны в отношении опухолей с нарушенной системой репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией TC-NER, которая необходима для распознавания повреждений структуры ДНК и ее восстановления. Трабектедин в отличие от них в несколько раз более токсичен для клеток с функционирующей TC-NER при нарушенной системе гомологичной рекомбинации [16, 17].

Механизм ингибирования TC-NER связан с тем, что на сайтах избирательной посадки трабектедин блокирует белок эксцизионной репарации G (XPG). При этом образуется прочный функционально неактивный тройной комплекс трабектедина с ДНК и XPG. Это приводит к расщеплению нуклеазой XPF/ERCC1 противоположной нити и, таким образом, к образованию в ранней S-фазе двунитевого разрыва ДНК, который может быть правильно репарирован только в процессе гомологичной рекомбинации. Этот процесс при невозможности восстановления ДНК с помощью системы TC-NER инициируется белками BRCA, которые привлекают белки гомологичной рекомбинации к местам разрывов. Опухоли с нарушениями в системе гомологичной рекомбинации особенно чувствительны к трабектедину. К ним, в частности, относят некоторые формы мягкотканых сарком, в наибольшей степени миксоидные липосаркомы. Неожиданно высокая эффективность трабектедина в отношении этой узкой группы опухолей, резистентных к другим цитостатикам, выдвинула его в ряд перспективных и интенсивно изучаемых соединений [18, 19].

**Блокирование aberrантных транскрипционных факторов химерных генов.** Особая чувствительность миксоидных липосарком к трабектедину связана еще и с тем, что геном клеток 95 % этих опухолей содержит транслокацию t(12;16)(q13; p11), в результате которой образуется химерный ген *FUS-CHOP*, экспрессирующий aberrантный белок DDIT3-TLS, или более редкую транслокацию t(12;22)(q13;q12), дающую химерный ген *EWSR1-CHOP* и белок DDIT3-EWS. Химерные белки, как aberrантные транскрипционные факторы, изменяют экспрессию генов, контролирующей репарацию, пролиферацию, дифференцировку, а также провоспалительные, ангиогенные и другие каскады, что способствует неограниченному агрессивному росту опухоли [20].

Трабектедин блокирует транскрипционную активность онкобелков, конкурируя с ними за связывание с промоторными участками соответствующих генов. В результате этого в клетках миксоидных липосарком среди других процессов, связанных с пролиферацией, нормализуется экспрессия циклинов D1 и E и их киназ CDK4 и CDK2, а также уровень P16 — ингибитора CDK4/6 и P27 и P57 — ингибиторов CDK2. Вследствие разобщения связи *FUS-CHOP* с промотором гена

*PTX3* активируется фагоцитоз апоптотических клеток, а разобщение с промотором гена *FNI* восстанавливает нормальную экспрессию фибронектина. Кроме того, трабектедин снимает блокаду онкобелком транскрипции генов, необходимых для дифференцировки адипоцитов, что приводит к нормализации морфологии опухоли, т.е. в ткани липосарком атипичные формы липобластов заменяются зрелыми. Механизм этого эффекта подлежит тщательному изучению, поскольку может послужить фундаментальной основой для принципиально нового стратегического направления в химиотерапии [21–23].

Из других опухолей соединительной ткани чувствительность к трабектедину обнаружена при юношеской форме саркомы Юинга, клетки которой в результате транслокации t(11;22)(q24;q12) становятся носителями химерного гена *EWS-FLI1*. Трабектедин блокирует транскрипционную активность экспрессируемого химерным геном белка *EWS-FLI1*, который регулирует более 70 генов. Клетки других соединительнотканых опухолей — остеосарком, рабдомиосарком и синовиальных сарком, не имеющие этой аномалии, значительно более резистентны к трабектедину [5, 24]. Среди эпителиальных опухолей сочетание низкой активности гомологичной рекомбинации с сохранением TC-NER имеют некоторые формы рака молочной железы (PMЖ) и яичников. В частности, более чем у 20 % больных с наследственной предрасположенностью к этим опухолям гомологичная рекомбинация нарушена в результате герминативных мутаций *BRCA1* и *BRCA2*, а при sporadicком PMЖ — примерно у 25 % вследствие соматических мутаций. Клинические испытания показали, что в этих случаях трабектедин значительно более эффективен, чем у больных с диким типом генов *BRCA*. В то же время наличие мутаций *XPG* в этих опухолях значительно снижает эффективность трабектедина по сравнению с диким типом, поскольку в мутантных клетках не происходит надрезание спирали и связывание комплекса трабектедина с ДНК, а следовательно, и образование разрывов [25–29].

С чувствительностью клеток опухоли к трабектедину коррелирует также наличие синдрома атаксии-телеангиэктазии или дефект белков, связанных с анемией Фанкони в результате мутаций генов *FANCA*, *FANCC*, *FANCF*, *FANCG* или *FANCD1* [30, 31].

Среди опухолей кроветворной системы многочисленны варианты с наличием транслокаций и образованием функционально активных химерных генов, причем в ряде случаев это определяет их клинический прогноз [32, 33]. В связи с этим представляется перспективным изучение действия трабектедина на гемобласты в зависимости от наличия в их клетках такого рода транслокаций. Для этой цели в лаборатории механизмов химического канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» собрана коллекция долго-

живущих клеточных линий Т- и В-клеточных лейкозов и лимфом. Результаты предполагается верифицировать путем анализа первичных культур клеток лейкозов больных из отделения химиотерапии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Вероятно, что подобно тому, как из множества гистологических типов опухолей соединительной ткани был выделен узкий сектор миксоидных липосарком, высокочувствительных к трабектедину, так и среди многообразия гемобластозов могут обнаружиться подобные варианты.

**Другие факторы, связанные с чувствительностью опухолей к трабектедину.** Значительную роль в чувствительности клеток к трабектедину играет опухолевый супрессор TP53. На клетках культуры сарком человека различной гистологической структуры показано, что нарушение функций TP53 в 3 раза повышает токсическое действие трабектедина [34]. Помимо способности блокировать клеточный цикл и пролиферацию трабектедин ингибирует экспрессию провоспалительных медиаторов типа хемокинов CCL2 и CXCL8, цитокина интерлейкина 6 (IL-6), а также ангиогенного фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Ценное свойство трабектедина – блокировка гиперэкспрессии гена множественной лекарственной резистентности (*MDR-1*). В связи с этим к цитотоксическому действию трабектедина чувствительны клетки, ставшие в процессе лечения резистентными к другим химиопрепаратам (ХП) [35, 36].

Одним из недавно выявленных механизмов терапевтического действия трабектедина является его способность ингибировать функции HMGA – высокомолекулярной группы негистоновых белков хроматина, регулирующих транскрипцию ряда генов, в том числе гена атаксии-телеангиэктазии (*ATM*), который связан с репарацией двунитевых разрывов, циклина *CCNE1*, проапоптотического онкогена *E2F1* и регулятора апоптоза *Bcl-2*. Неупорядоченная гиперэкспрессия HMGA характерна для многих злокачественных опухолей. Она часто коррелирует с их лекарственной резистентностью и отрицательным прогнозом течения заболевания. Трабектедин блокирует взаимодействие HMGA с чувствительными к нему регуляторными районами гена, и его ХТ-действие на клетки опухолей с высокими показателями экспрессии HMGA более выражено, чем с низкими [37, 38].

Ингибирование NER связывают отчасти с действием трабектедина на топоизомеразу I. Показано, что в миллимолярных концентрациях трабектедин образует стабильный комплекс с этим ферментом и блокирует концы разрывов, т.е. работает как ингибитор топоизомераз. В более низких, но фармакологически эффективных наномолярных концентрациях эта реакция не происходит, что позволяет считать ее минорным компонентом в механизме действия трабектедина. Об этом говорит и то, что клетки, резистентные к камптотецину, который предотвращает ли-

гирование ДНК путем ковалентного связывания с топоизомеразой I и ДНК, сохраняют чувствительность к трабектедину [39–41].

#### **Прогноз чувствительности опухоли к трабектедину**

Поскольку трабектедин обладает выраженной токсичностью и является дорогостоящим препаратом, важен предварительный прогноз его эффективности в каждом конкретном случае. Для его оценки разрабатываются методы, в числе которых определение количества аддуктов трабектедина и периода их персистенции. Последнее особенно важно, так как первоначально в чувствительных и резистентных клетках образуется одинаковое количество аддуктов, но в чувствительных они не репарируются и сохраняются на много дольше.

Другими показателями служат характеристики повреждения ДНК в тесте «ДНК-комет», обнаружение эндонуклеазы RAD51 или визуализация двойных разрывов ДНК по накоплению гистона гамма-H2AX, который фосфорилируется вблизи сайта разрыва и маркирует пораженный хроматиновый домен.

Прогностическую ценность имеет и определение активности лигазы CUL4A, которая убиквитинирует белки гомологичной рекомбинации. Высокий уровень экспрессии CUL4A в клетках сарком с нарушенной системой гомологичной рекомбинации коррелирует с положительным прогнозом при их лечении трабектедином [5, 42, 43].

#### **Механизмы резистентности к трабектедину**

Клетки с нарушенной по разным причинам системой TC-NER резистентны к трабектедину. В частности, причиной резистентности клеток одной из линий карциномы прямой кишки была потеря гетерозиготности по 13q33, приводящая к отсутствию функционально активного XPG [16].

Другой вариант приобретения резистентности к трабектедину обнаружен в клетках линии миксоидной липосаркомы, в которых, в отличие от исходных чувствительных клеток, FUS-SHOP был неспособен связываться с промоторами генов *PTX3* и *FN1*. Кроме того, резистентная линия утратила способность экспрессировать Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу вследствие гиперметилирования ее промотора. В результате эти клетки стали высокочувствительными к темозоломиду, который алкилирует гуанин в положениях Об и N7 с последующим аберрантным восстановлением метилового остатка. Эти данные указывают на возможную перспективность изучения соединений, изменяющих профиль метилирования, в качестве препаратов для лечения опухолей, резистентных к трабектедину. Кроме того, в большинстве случаев резистентные к трабектедину клетки проявляют повышенную чувствительность к другим цитотоксическим факторам, например к ультрафиолетовому излучению.

Следует отметить, что ни в одной из линий, резистентных к трабектедину, это свойство не было связано ни с активацией экспрессии белков MDR, ни с транспортом трабектедина, ни с уровнем глутатиона [44].

#### Токсичность трабектедина и возможности ее снижения

В доклинических испытаниях трабектедина среди серьезных побочных эффектов (анемия, нейтропения, тромбоцитопения) особо отмечена его гепатотоксичность. При однократном внутривенном введении крысам 40 мкг/кг трабектедина через 24 ч развивалось тяжелое повреждение печени по типу холангита. Морфология поражения состояла в некрозе эпителия желчевыводящих протоков, воспалении и последующем фиброзе. Гепатоциты повреждались в значительно меньшей степени. Холангит сохранялся до 3 мес. При этом повышенный в 7 раз уровень билирубина держался около 1 мес, высокий уровень щелочной фосфатазы и аспартатаминотрансферазы — до 2–3 мес. Активность P450 A1/2, CYP2E1 и CYP3A2 была понижена на фоне резкого повышения экспрессии аденозинтрифосфатсвязывающей кассеты транспортных генов *Abcb1a* и *Abcb1b* [45].

Генетические параметры чувствительности к поражению печени трабектедином изучались на мышах, дефектных по основному ферменту метаболизма трабектедина (CYP3A) и транспортерам *Abcb1a/1b*, *Abcc2*, и/или *Abcc3*. Нокаут CYP3A увеличил гепатотоксичность трабектедина незначительно. Такой же эффект отмечен у мышей *Abcc2*–/– и чуть меньше у *Abcb1a/1b*–/– и *Abcc3*–/–. Наибольшее поражение печени наблюдалось у мышей *Abcb1a/1b/Abcc2*–/– и *Abcc2/Abcc3*–/–, а наименьшее — у животных *CYP3a/Abcb1a/1b/Abcc2*–/–. Это свидетельствует о том, что образование метаболитов трабектедина изоформой CYP3A является необходимым условием гепатотоксичности. Дальнейшие исследования показали, что дефект транспортера *Abcc2* при работающей CYP3A имеет следствием накопление в печени токсических метаболитов трабектедина, но не исходного соединения. Таким образом, транспортеры *Abcb1*, *Abcc2* и *Abcc3* освобождают клетку от токсических метаболитов трабектедина, образуемых изоформой CYP3A. Главную роль играет *Abcc2*, меньшую — *Abcc3* и минимальную — *Abcc1*. Оптимальный эффект достигается, если они работают все вместе, дополняя эффект друг друга [46].

Это исследование получило подтверждение в клинической практике, когда от обычной дозы трабектедина у больного с саркомой, имевшего генетический дефект транспортного белка *Abcc2*, развилось летальное поражение печени. Таким образом, в набор тестов, необходимых для безопасного применения трабектедина, следует ввести молекулярно-генетическое исследование состояния ABC-транспортеров [47].

Эксперименты, направленные на снижение токсичности трабектедина, показали, что в отличие от опухолевых клеток эффект может быть достигнут

с помощью некоторых индукторов CYP. В частности, предобработка крыс  $\beta$ -нафтофлавоном или фенобарбиталом снижала гепатотоксическое действие трабектедина. Однако модель *in vitro*, когда культуру гепатоцитов обрабатывали теми же индукторами, предсказательной силы не имела, так как клетки, обработанные и не обработанные индукторами, были одинаково чувствительны к токсическому действию трабектедина [48].

Наиболее подходящим агентом для снижения токсичности трабектедина оказался дексаметазон. Предобработка самок крыс этим кортикостероидом (5–20 мг/кг) за 24 ч до введения трабектедина (40 мкг/кг) полностью предотвращала его гепатотоксичность. В то же время дексаметазон не снижал противоопухолевое действие трабектедина на перевиваемую карциному молочной железы и ряд опухолей мышей. Изучение механизма действия дексаметазона показало, что он во много раз увеличивает экспрессию в печени ряда генов CYP3A, в том числе *CYP3A11* (в 23 раза), *CYP3A16* (в 18 раз), *CYP3A25* (в 13 раз) и *CYP3A13* (в 10 раз) [49].

Протекторное действие дексаметазона может иметь в своей основе не только изменение метаболизма трабектедина, но и другие процессы, связанные с феноменом множественной лекарственной устойчивости. В частности, изменение транспорта трабектедина через мембрану клеток печени, которое связано с активацией экспрессии и функций аденозинтрифосфатзависимого кассетного транспортного белка, кодируемого геном *Mrp2* (Multidrug Resistance-associated Protein), продемонстрировано на первичной культуре гепатоцитов крысы [50]. Предполагается также, что дексаметазон снижает токсичность трабектедина, блокируя воспалительный компонент его действия путем ингибирования NF- $\kappa$ B, который активирует экспрессию провоспалительных генов [35, 51].

Протекторным действием обладал и индол-3-карбинол, содержащийся в капусте и других крестоцветных. Он так же, как и дексаметазон, оказался мощным индуктором CYP3A2 у крыс [52]. Индол-3-карбинол защищал крыс от токсического действия трабектедина при сохранении его терапевтического действия при РМЖ. Существенно, что защитный эффект индол-3-карбинола не сопровождался снижением содержания трабектедина в печени, что указывает на наличие альтернативных путей его детоксикации [53].

Защитное действие дексаметазона нашло непосредственное применение в клинике, где премедикация дексаметазоном (4 мг перорально за 24 ч до трабектедина) больных с саркомами резко снижала гепатотоксический эффект и миелосупрессию. В одном из клинических исследований после курса лечения трабектедином в группе плацебо у 34 % больных отмечено повышение трансаминазы, у 24 % — нейтропения, у 25 % — тромбоцитопения. Среди пациентов,

получавших дексаметазон, указанные осложнения имелись у 2, 2 и 0 % соответственно [54, 55].

### **Действие трабектедина на строму опухоли и ангиогенез**

В последнее время значительно возрос интерес к роли опухолеассоциированных макрофагов в прогрессии новообразований. Обильная инфильтрация опухоли макрофагами, которые являются основным источником провоспалительных медиаторов, коррелирует с метастазированием и резистентностью к ХТ. Их ингибирование в эксперименте приводило к замедлению роста опухоли и большей эффективности как цитотоксической, так и антиангиогенной терапии [56–58].

Экспериментальные и клинические данные показали, что даже в нетоксичной дозе трабектедин избирательно ингибирует мононуклеарные фагоциты, в том числе ассоциированные с опухолью. Их апоптоз происходит путем активации каспазы 8. При этом нейтрофилы и лимфоциты не поражаются, так как в отличие от моноцитов у них иначе происходит экспрессия рецепторов фактора некроза опухоли TRAIL, продуцируемых у человека геном *TNFSF10*. В результате гибели ассоциированных с опухолью макрофагов в опухоли прекращается продукция медиаторов воспаления *CCL2* и *IL-6*. Первый считается ведущим фактором привлечения моноцитов в опухоль, а второй – ростовым фактором. Помимо этих медиаторов, трабектедин ингибирует в культуре клеток миксоидных липосарком продукцию провоспалительного хемокина *CXCL8* и белка острой фазы воспаления пентраксина 3 (*PTX3*). Такие же изменения обнаруживаются и в ксенографтах сарком от больных, получавших трабектедин. В них наряду со снижением инфильтрации опухоли макрофагами отмечен низкий уровень продукции ее клетками *VEGF*, а также маркера миграции и пролиферации клеток эндотелия сосудов *CD31* [59–61].

### **Комбинация трабектедина с другими цитостатиками**

Как известно, наибольший эффект противоопухолевых цитостатиков проявляется при первых курсах терапии, особенно в случае опухолей с нарушенной системой репарации. В ходе лечения отбираются клоны с повышенной ее активностью, которые удаляют аддукты из алкилированных цепей ДНК, в результате чего чувствительность к препарату падает. Этот механизм ингибируется трабектедином, поскольку он избирательно токсичен для такого рода клонов. В связи с этим в настоящее время успешно используется комбинация трабектедина с производными платины и доксорубицином при лечении рецидивов опухолей различного происхождения [29, 62–64]. Активно исследуются также и другие комбинации трабектедина с традиционными и новыми ХП [65, 66].

### **Перспективы использования узкобороздочных лигандов в химиотерапии**

Удельный вес узкобороздочных лигандов среди используемых в настоящее время противоопухолевых ХП невелик. Это, с нашей точки зрения, отчасти объясняется тем, что их перспективность была скомпрометирована существующей парадигмой выбора ХП, при которой в результате скрининга отбираются соединения, способные ингибировать злокачественный рост на различных моделях. В то же время хорошо известно, что некоторые агенты, не обладающие самостоятельной цитотоксичностью, могут многократно усиливать ее у других ХП при комбинированном применении. В этом смысле узкобороздочные лиганды представляют особый интерес, поскольку они, располагаясь на узкой бороздке ДНК и связываясь с ее последовательностями, важны для экспрессии генов «домашнего хозяйства» и могут блокировать репарацию ДНК-клеток, поврежденных другими агентами. Такой подход, возможно, даст повышенный терапевтический эффект не только в случае комбинации узкобороздочных лигандов с известными ХП, но и при одновременном действии этих лигандов, каждый из которых оказывает слабое действие или вообще неэффективен. В этом плане представляется перспективным исследование комбинированного действия узкобороздочных лигандов, разрешенных к клиническому использованию в качестве антимикробных, антипротозойных и противовирусных препаратов типа диариламинов (*DAPI*, беренил, пентамидин) и бисбензимидазолов типа *Ноеchst 33258*. В клетках опухолей такие препараты, как *Ноеchst 33258* и дистамицин, препятствуют конденсации хромосом, особенно в АТ-богатых участках гетерохроматина, и вызывают апоптоз путем индукции летальных цитогенетических изменений. Пентамидин, применявшийся ранее для лечения протозойных инфекций, используется в настоящее время при опухолях желудочно-кишечного тракта для ингибирования так называемых фосфатаз регенерирующей печени (*PRL-фосфатаз*), которые стимулируют пролиферацию и миграцию злокачественных клеток [67, 68].

Особый интерес представляет изучение возможности воспроизвести действие трабектедина на опухоли путем комбинации узкобороздочных лигандов различной тропности к последовательностям ДНК в целях подавления эксцизионной репарации и конкуренции с белками химерных генов.

В настоящее время появились данные об успешном применении малых молекул, ингибирующих поли(аденозиндифосфатрибоза)-полимеразу (*PARP*), для лечения опухолей различного гистогенеза, особенно дефектных по белкам гомологичной рекомбинации (*BRCA*, *RAD51D*, *ATM* *PALB2*, *RAD51C*, *BRIP1*). Эти молекулы подобно трабектедину образуют стабильный комплекс с *PARP* и ДНК, что, прекращая работу эксцизионной репарации, дает многочис-

сленные однонитевые разрывы, которые в процессе репликации становятся двойными и не репарируются [69, 70].

Ранее нами было показано, что классические узкобороздочные лиганды (беренил, пентамидин, DAPI, Hoechst 33342 и 33258) способны ингибировать ДНК-

зависимый путь активации PARP *in vivo* и *in vitro*. В настоящее время мы предполагаем провести исследование влияния на этот путь вновь синтезированных димерных производных бисбензимидазолов, а также их комбинаций с классическими узкобороздочными лигандами [19, 71].

*Работа была поддержана грантами 15-04-04006, 13-04-01707, 15-04-09216 Российского фонда фундаментальных исследований, грантом № ДП-Б-27/15 Фонда некоммерческих программ Дмитрия Зимица «Династия».*

## ЛИТЕРАТУРА

- Pommier Y., Kohlhagen G., Bailly C. et al. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 1996;35(41):13303–9.
- Zewail-Foote M., Hurley L.H. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *J Med Chem* 1999;42(14):2493–7.
- David-Cordonnier M.H., Gajate C., Olmea O. et al. DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chem Biol* 2005;12(11):1201–10.
- Basmadjian C., Zhao Q., Bentouhami E. et al. Cancer wars: natural products strike back. *Front Chem* 2014;2:20.
- D'Incalci M., Galmarini C.M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther* 2010;9(8):2157–63.
- Marco E., Garcia-Nieto R., Mendieta J. et al. A 3-(ET743)-DNA complex that both resembles an RNA-DNA hybrid and mimicks zinc finger-induced DNA structural distortions. *J Med Chem* 2002;45(4):871–80.
- Guirouilh-Barbat J., Antony S., Pommier Y. Zalypsis (PM00104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009;8(7):2007–14.
- Erba E., Cavallaro E., Damia G. et al. The unique biological features of the marine product Yondelis (ET-743, trabectedin) are shared by its analog ET-637, which lacks the C ring. *Oncol Res* 2004;14(11–12):579–87.
- Vermier M., Hemeryck A., Cuyckens F. et al. *In vitro* studies on the metabolism of trabectedin (YONDELIS) in monkey and man, including human CYP reaction phenotyping. *Biochem Pharmacol* 2009;77(10):1642–54.
- Beumer J.H., Rademaker-Lakhai J.M., Rosing H. et al. Metabolism of trabectedin (ET-743, Yondelis) in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(6):825–37.
- Reid J.M., Kuffel M.J., Ruben S.L. et al. Rat and human liver cytochrome P-450 isoform metabolism of ecteinascidin 743 does not predict gender-dependent toxicity in humans. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2952–62.
- Brandon E.F., Sparidans R.W., Guijt K.J. et al. *In vitro* characterization of the human biotransformation and CYP reaction phenotype of ET-743 (Yondelis, Trabectedin), a novel marine anti-cancer drug. *Invest New Drugs* 2006;24(1):3–14.
- Brandon E.F., Meijerman I., Klijn J.S. et al. *In vitro* cytotoxicity of ET-743 (Trabectedin, Yondelis), a marine anti-cancer drug, in the Hep G2 cell line: influence of cytochrome P450 and phase II inhibition, and cytochrome P450 induction. *Anticancer Drugs* 2005;16(9):935–43.
- Machiels J.P., Staddon A., Herremans C. et al. Impact of cytochrome P450 3A4 inducer and inhibitor on the pharmacokinetics of trabectedin in patients with advanced malignancies: open-label, multicenter studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;74(4):729–37.
- Strippoli S., Lorisso V., Albano A., Guida M. Herbal-drug interaction induced rhabdomyolysis in a liposarcoma patient receiving trabectedin. *BMC Complement Altern Med* 2013;13:199.
- Takebayashi Y., Pourquier P., Zimonjic D.B. et al. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 2001;7(8):961–6.
- Damia G., D'Incalci M. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2007;43(12):1791–801.
- Herrero A.B., Martin-Castellanos C., Marco E. et al. Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res* 2006;66(16):8155–62.
- Горбунова В.А. Новые направления лекарственного лечения сарком мягких тканей. *Вестник РОНЦ* 2009;11:2–3. [Gorbunova V.A. New ways of drug therapy of soft tissues sarcomas. *Vestnik RONC = Bulletin of RCRC (Russian Cancer Research Center)* 2009;11:2–3. (In Russ.)].
- Olofsson A., Willen H., Goransson M. et al. Abnormal expression of cell cycle regulators in FUS-CHOP carrying liposarcomas. *Int J Oncol* 2004;25(5):1349–55.
- Forni C., Minuzzo M., Viridis E. et al. Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Mol Cancer Ther* 2009;8(2):449–57.
- Charytonowicz E., Terry M., Coakley K. et al. PPARgamma agonists enhance ET-743-induced adipogenic differentiation in a transgenic mouse model of myxoid round cell liposarcoma. *J Clin Invest* 2012;122(3):886–98.
- Di Giandomenico S., Frapolli R., Bello E. et al. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. *Oncogene* 2014;33(44):5201–10.
- Grohar P.J., Griffin L.B., Yeung C. et al. Ecteinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma cells. *Neoplasia* 2011;13(2):145–53.
- Peto J., Collins N., Barfoot R. et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(11):943–9.
- Turner N., Tutt A., Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):814–9.
- Delalogue S., Wolp-Diniz R., Byrski T. et al. Activity of trabectedin in germline *BRCA1/2*-mutated metastatic breast cancer: results of an international first-in-class phase II study. *Ann Oncol* 2014;25(6):1152–8.
- Massuti B., Cobo M., Camps C. et al. Trabectedin in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) with XPG and/or ERCC1 overexpression and *BRCA1* underexpression and pretreated with platinum. *Lung Cancer* 2012;76(3):354–61.
- Monk B.J., Ghatage P., Parekh T. et al. Effect of *BRCA1* and XPG mutations on treatment response to trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced ovarian cancer: exploratory analysis of the phase 3 OVA-301 study. *Ann Oncol* 2015;26(5):914–20.
- Guirouilh-Barbat J., Zhang Y.W., Pommier Y. Induction of glutathione-dependent DNA double-strand breaks by the novel anticancer drug brostallicin. *Mol Cancer Ther* 2009;8(7):1985–94.
- Casado J.A., Rio P., Marco E. et al. Relevance of the Fanconi anemia pathway

- in the response of human cells to trabectedin. *Mol Cancer Ther* 2008;7(5):1309–18.
32. Chang M., Raimondi S.C., Ravindranath Y. et al. Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. *Leukemia* 2000;14(7):1201–7.
33. Port M., Böttcher M., Thol F. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and *CEBPA* gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* 2014;93(8):1279–86.
34. Moneo V., Serelde B.G., Fominaya J. et al. Extreme sensitivity to Yondelis (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma cell lines correlates with mutated p53. *J Cell Biochem* 2007;100(2):339–48.
35. Jin S., Gorfajn B., Faircloth G., Scotto K.W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6775–9.
36. Ganjoo K.N., Patel S.R. Trabectedin: an anticancer drug from the sea. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10(16):2735–43.
37. Fusco A., Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(12):899–910.
38. D'Angelo D., Borbone E., Palmieri D. et al. The impairment of the High Mobility Group A (HMGA) protein function contributes to the anticancer activity of trabectedin. *Eur J Cancer* 2013;49(5):1142–51.
39. Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* 2009;109(7):2894–902.
40. Martinez E.J., Corey E.J., Owa T. Antitumor activity- and gene expression-based profiling of ecteinascidin Et 743 and phthalascidin Pt 650. *Chem Biol* 2001;8(12):1151–60.
41. Tavecchio M., Simone M., Erba E. et al. Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer* 2008;44(4):609–18.
42. Garcia M.J., Saucedo-Cuevas L.P., Munoz-Repetto I. et al. Analysis of DNA repair-related genes in breast cancer reveals CUL4A ubiquitin ligase as a novel biomarker of trabectedin response. *Mol Cancer Ther* 2013;12(4):530–41.
43. Soares D.G., Escarquil A.E., Poindessous V. et al. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(32):13062–7.
44. Uboldi S., Bemasconi S., Romano M. et al. Characterization of a new trabectedin-resistant myxoid liposarcoma cell line that shows collateral sensitivity to methylating agents. *Int J Cancer* 2012;131(1):59–69.
45. Donald S., Verschoyle R.D., Edwards R. et al. Hepatobiliary damage and changes in hepatic gene expression caused by the antitumor drug ecteinascidin-743 (ET-743) in the female rat. *Cancer Res* 2002;62(15):4256–62.
46. van Waterschoot R.A., Eman R.M., Wagenaar E. et al. ABCC2, ABCC3, and ABCB1, but not CYP3A, protect against trabectedin-mediated hepatotoxicity. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7616–23.
47. Laurenty A.P., Thomas F., Chatelut E. et al. Irreversible hepatotoxicity after administration of trabectedin to a pleiomorphic sarcoma patient with a rare ABCC2 polymorphism: a case report. *Pharmacogenomics* 2013;14(12):1389–96.
48. Donald S., Verschoyle R.D., Greaves P. et al. Comparison of four modulators of drug metabolism as protectants against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the female rat and in hepatocytes *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;53(4):305–12.
49. Donald S., Verschoyle R.D., Greaves P. et al. Complete protection by high-dose dexamethasone against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the rat. *Cancer Res* 2003;63(18):5902–8.
50. Lee J.K., Leslie E.M., Zamek-Gliszczyński M.J., Brouwer K.L. Modulation of trabectedin (ET-743) hepatobiliary disposition by multidrug resistance-associated proteins (Mrps) may prevent hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;228(1):17–23.
51. Minuzzo M., Marchini S., Broqqini M. et al. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6780–4.
52. Leibel D.A., Hedstrom O.R., Fischer K.A. et al. Evaluation of chronic dietary exposure to indole-3-carbinol and absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane in sprague-dawley rats. *Toxicol Sci* 2003;74(1):10–21.
53. Donald S., Verschoyle R.D., Greaves P. et al. Dietary agent indole-3-carbinol protects female rats against the hepatotoxicity of the antitumor drug ET-743 (trabectedin) without compromising efficacy in a rat mammary carcinoma. *Int J Cancer* 2004;111(6):961–7.
54. Grosso F., Dileo P., Sanfilippo R. et al. Steroid premedication markedly reduces liver and bone marrow toxicity of trabectedin in advanced sarcoma. *Eur J Cancer* 2006;42(10):1484–90.
55. Paz-Ares L., López-Pousa A., Poveda A. et al. Trabectedin in pre-treated patients with advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a phase II study evaluating co-treatment with dexamethasone. *Invest New Drugs* 2012;30(2):729–40.
56. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11(11):723–37.
57. Allavena P., Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol* 2012;167(2):195–205.
58. Qian B.Z., Li J., Zhang H. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475(7355):222–5.
59. Germano G., Frapolli R., Simone M. et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res* 2010;70(6):2235–44.
60. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C. et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013;23(2):249–62.
61. Allavena P., Germano G., Belgiovine C. et al. Trabectedin: A drug from the sea that strikes tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology* 2013;2(6):e24614.
62. Stevens E.V., Nishizuka S., Antony S. et al. Predicting cisplatin and trabectedin drug sensitivity in ovarian and colon cancers. *Mol Cancer Ther* 2008;7(1):10–8.
63. Lopez-Guerrero J.A., Romero I., Poveda A. Trabectedin therapy as an emerging treatment strategy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Chin J Cancer* 2015;34(1):41–9.
64. Pautier P., Floques A., Chevreau C. et al. Trabectedin in combination with doxorubicin for first-line treatment of advanced uterine or soft-tissue leiomyosarcoma (LMS-02): a non-randomised, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(4):457–64.
65. Kawano M., Mabuchi S., Kishimoto T. et al. Combination treatment with trabectedin and irinotecan or topotecan has synergistic effects against ovarian clear cell carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 2014;24(5):829–37.
66. Riccardi A., Meco D., Ubezio P. et al. Combination of trabectedin and irinotecan is highly effective in a human rhabdomyosarcoma xenograft. *Anticancer Drugs* 2005;16(8):811–5.
67. Stephens B.J., Han H., Gokhale V., Von Hoff D.D. PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer. *Mol Cancer Ther* 2005;4(11):1653–61.
68. Cai X., Gray P.J. Jr, Von Hoff D.D. DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat Rev* 2009;35(5):437–50.
69. Coward J.I., Middleton K., Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Health* 2015;7:189–203.
70. Collins I.M., Thomas D.M. Novel approaches to treatment of leiomyosarcomas. *Curr Oncol Rep* 2011;13(4):316–22.
71. Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P. et al. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways. *Oncotarget* 2014;5(2):428–37.