



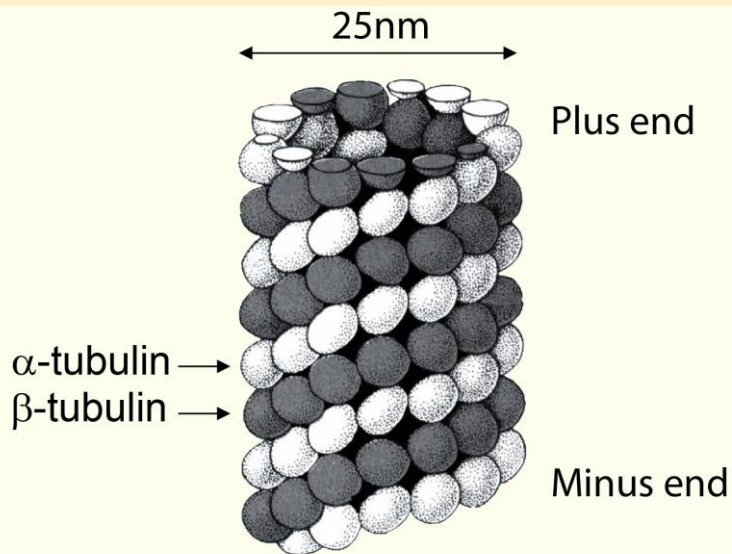
МЕТАБОЛИЧЕСКИ СТАБИЛЬНЫЕ АНАЛОГИ ТУБУЛОКЛАСТИНА И 2-МЕТОКСИЭСТРАДИОЛА: СИНТЕЗ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Николай Алексеевич
Зефиоров
Email: kolaz92@gmail.com

Соавторы: **В.М. Шибилев, С.А. Кузнецов, О.Н. Зефирова**

Тубулин как молекулярная мишень противоопухолевых агентов

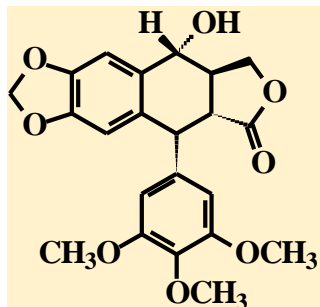
Микротрубочка построенная из тубулиновых димеров



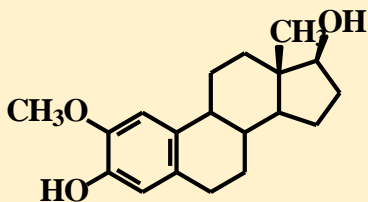
Колхициновый сайт тубулина находится в бета-субъединице белка, на его границе с альфа-субъединицей



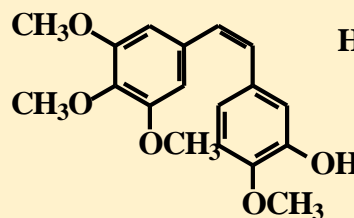
Примеры “классических” лигандов колхицинового сайта



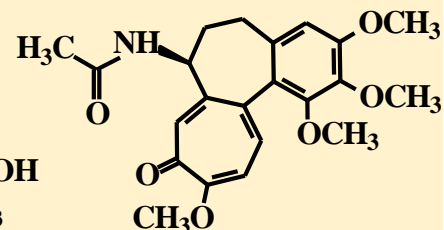
Подофиллотоксин



2-Метоксиэстрадиол

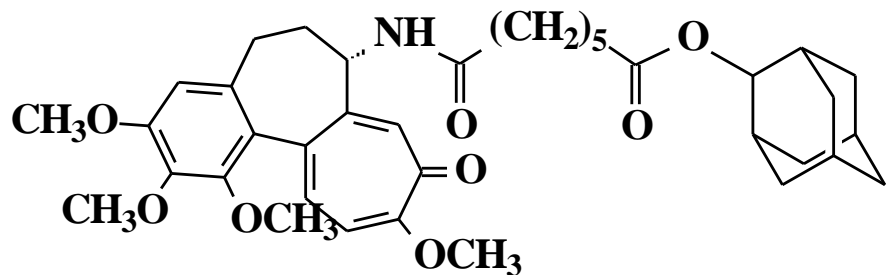


Комбретастатин А-4

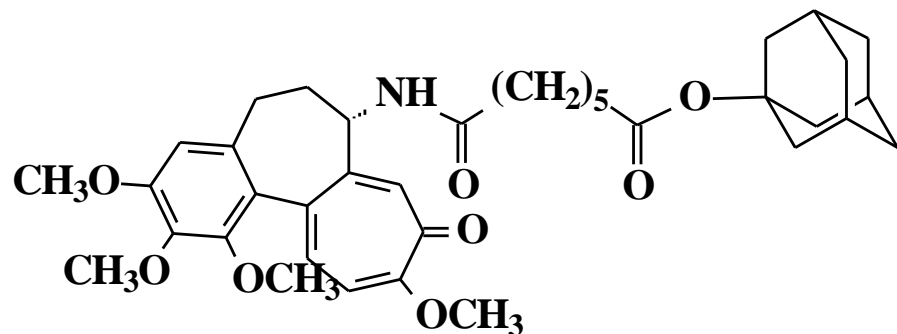


Колхицин

Метаболически стабильные аналоги тубулокластина

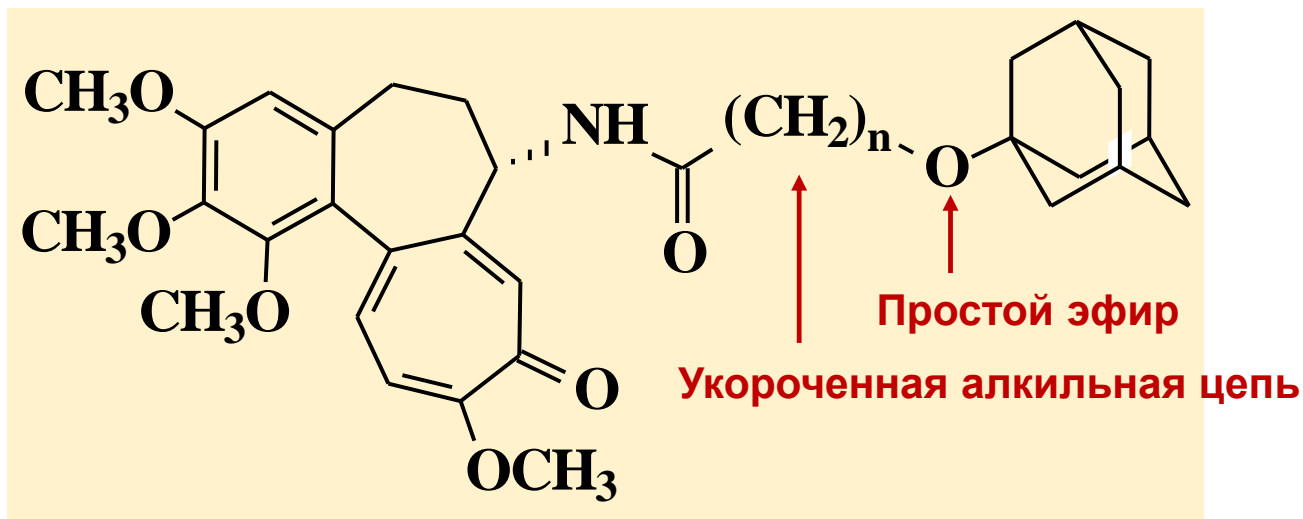


Тубулокластин и его “узловой” аналог проявляют очень высокую цитотоксичность к опухолевым клеткам и имеют улучшенный токсикологический профиль *in vivo*.

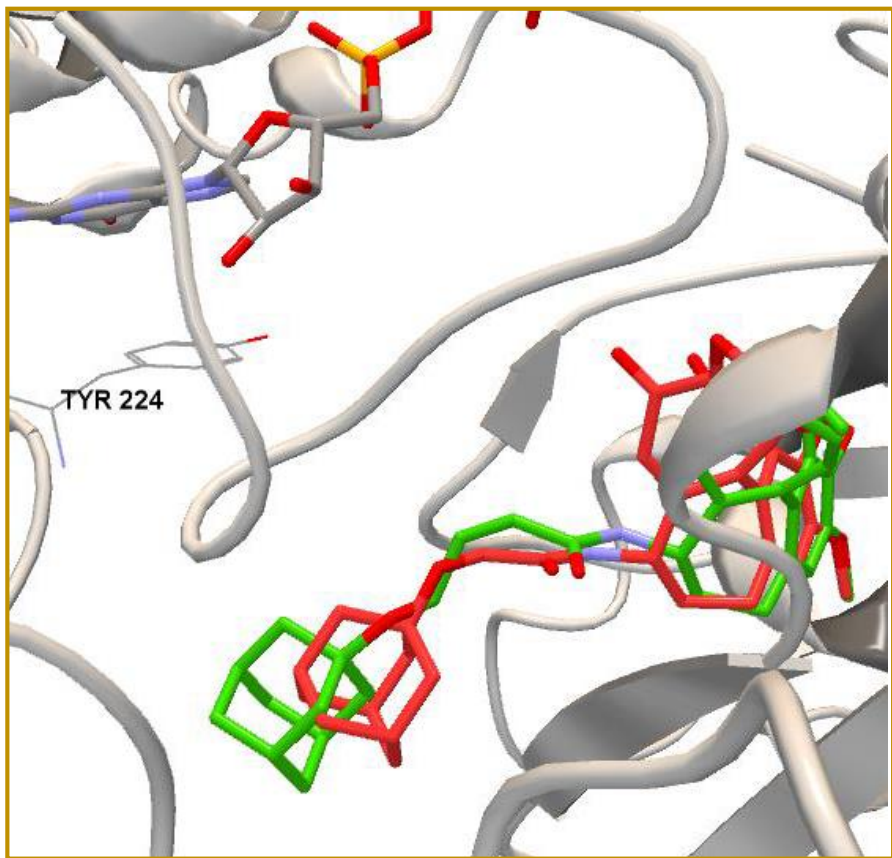


Проблемы: высокая липофильность ($\log P = 5.45$), возможная метаболическая лабильность из-за наличия сложноэфирной группы.

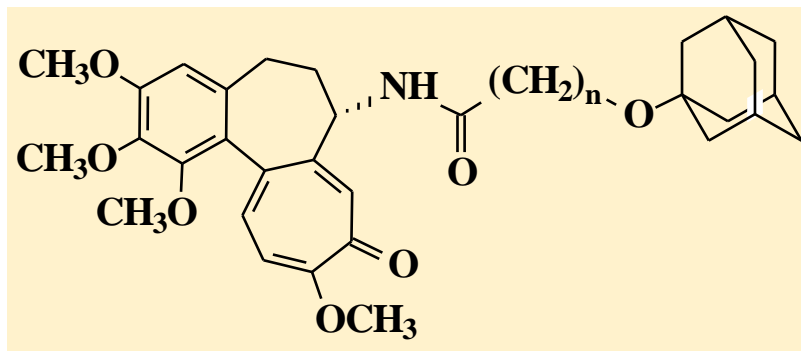
Предложенный структурный тип:



Молекулярное моделирование – предсказание оптимальной длины цепи

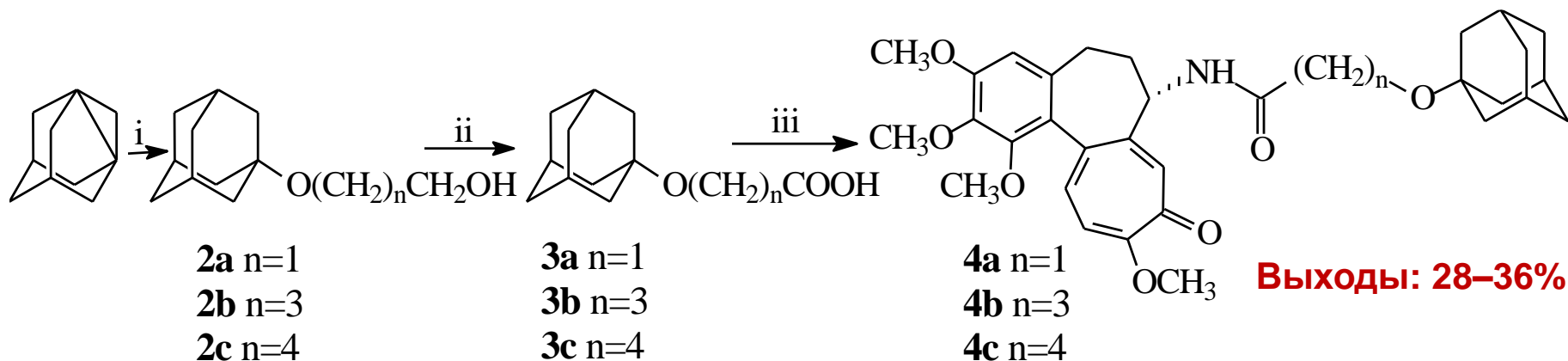


Длина линкера в соединениях общей формулы была подобрана на основе результатов докинга их молекул в трехмерную модель колхицинового сайта связывания в тубулиновом димере (PDB ID:4O2B) с помощью программ AutoDock Vina 1.1.2 и UCSF Chimera 1.13.1.



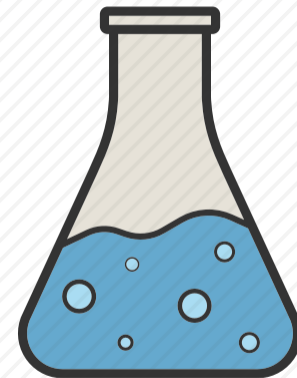
По данным этого исследования тип связывания лигандов, **n=1–3** близок к такому для тубулокластина, но без образования водородной связи с остатком альфа-Tyr224. Тип связывания лигандов с более длинными цепями (**n=4, 5**) с белком **существенно отличается**, в связи с чем для синтеза были выбраны структуры, n=1, 3 и 4 (в качестве контроля).

Синтез целевых веществ



Реагенты и условия: i) алкандиол, Et₂O, 30–40°C, 2–3 ч; [1] ii) реагент Джонса, ТГФ, r.t., 5 мин; iii) N-деацетилколхицин (получен по стандартной методике из колхицина) [2], EEDQ, CH₂Cl₂, r.t., 12 ч

1. G. M. Butov and V.M. Mokhov, *Russ. J. Org. Chem.* 2018, 54, 1746.
2. J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton and C. B. Grissom, *J. Org. Chem.*, 2004, 69, 8987.



Биотестирование

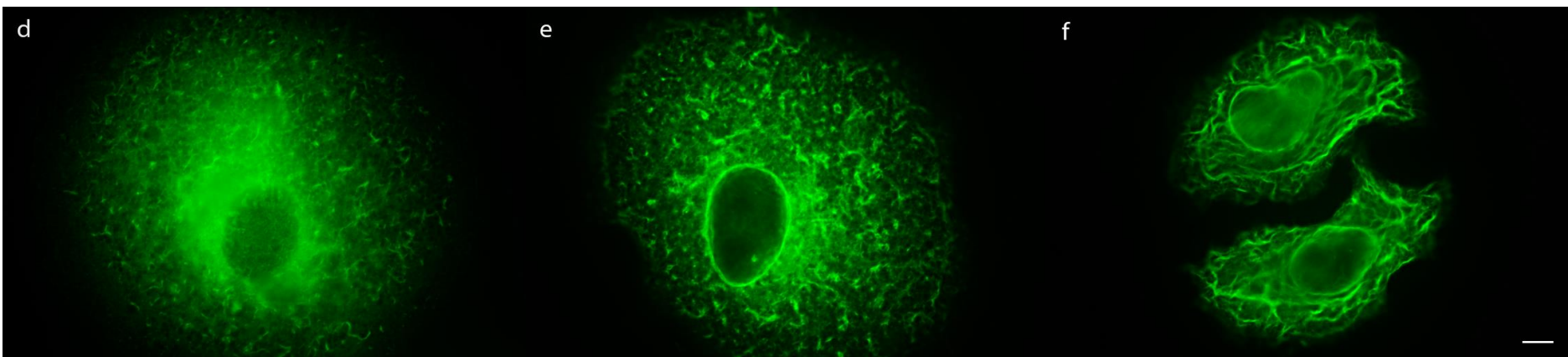
N	Разборка микротрубочек		Кластеризация тубулина (н.о. – не определялось)					Ингибирование клеточного роста IC ₅₀ (нМ)	Цитотоксичность EC ₅₀ (нМ)
	50 нМ	100 нМ	50 нМ	100 нМ	200 нМ	400 нМ или 800 нМ	1200 нМ		
n=1	-	-	++	++	+++	+++	+++	6.4±1	7.8±2
n=3	-	-	++	+++	+++	+++	+++	5.0±1	6.7±2
n=4	+/-	-	-	-	+/-	+	++	15.5±3	18.4±4

Кластеризация тубулина:

+

++

+++

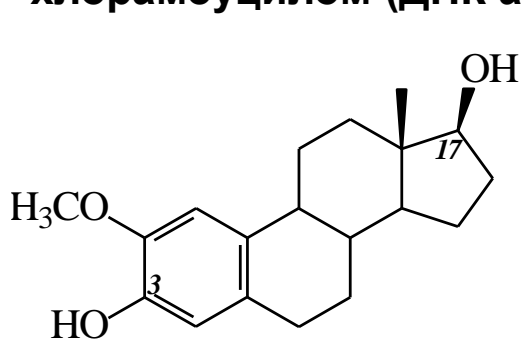


Итоги:

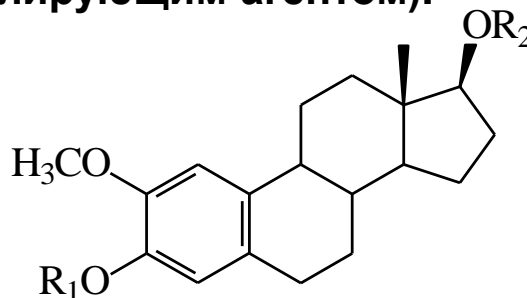
1. Тенденция к стимуляции образования кластеров у конъюгатов резко различалась и изменялась в последовательности: $4b(n=3) > 4a(n=1) \gg 4c(n=4)$, что соответствует данным, полученным в ходе молекулярного моделирования.
2. Результаты биотестирования впервые свидетельствуют о том, что тубулокластиновые аналоги без сложноэфирной группы могут сохранять сильную кластеризующую способность, причем эта способность коррелирует с цитотоксичностью, наилучшие значения IC_{50} и EC_{50} – в субнанолярном интервале концентраций – наблюдались для соединений 4a и 4b. Соединение 4b представляет собой аналог тубулокластина, идентичный по антипролиферативной активности, но метаболически гораздо более стабильный и менее липофильный ($\text{LogP}=4.51$), чем исходная молекула, что делает конъюгат 4b перспективным для изучения его токсикологического профиля в экспериментах *in vivo*.

Метаболически стабильные аналоги 2-метоксиэстрадиола

С целью блокировки быстрого метаболизма 2-метоксиэстрадиола в организме мы сконструировали его пролекарства на основе сложных эфиров с дихлорацетатом (обладающим собственной противоопухолевой активностью при высоких дозах и нетоксичным к нормальным клеткам), а также с хлорамбуцилом (ДНК алкилирующим агентом).



1 2-Метоксиэстрадиол



2a $R_1=H$, $R_2=C(O)CHCl_2$

2b $R_1=R_2=C(O)CHCl_2$

2c $R_1=R_2=C(O)CH_2Cl$

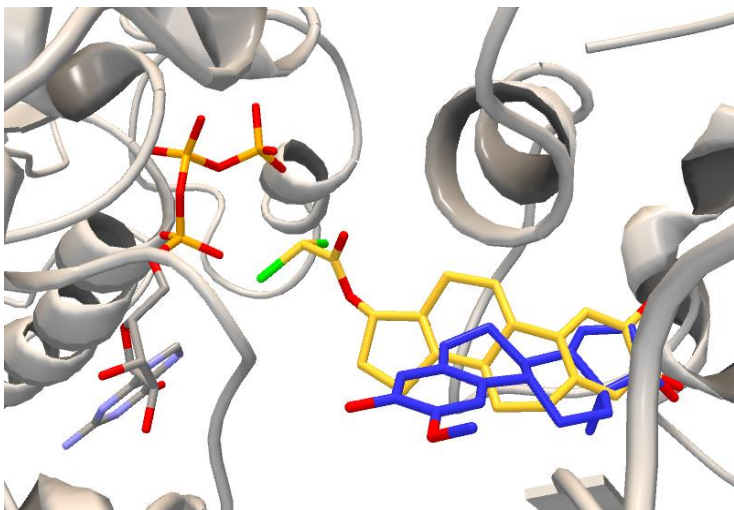
Соединения 2a-с
синтезированы на
химическом факультете МГУ
имени М.В. Ломоносова в
группе к.х.н. доцента
Н.А. Лозинской

Поскольку модификация 2-метоксиэстрадиола по положениям C^3 и C^{17} часто приводит к резкому уменьшению его активности, мы ожидали от предложенных пролекарств низкой активности *in vitro*, но заметной – *in vivo*, что и наблюдалось для пролекарства с хлорамбуцилом.

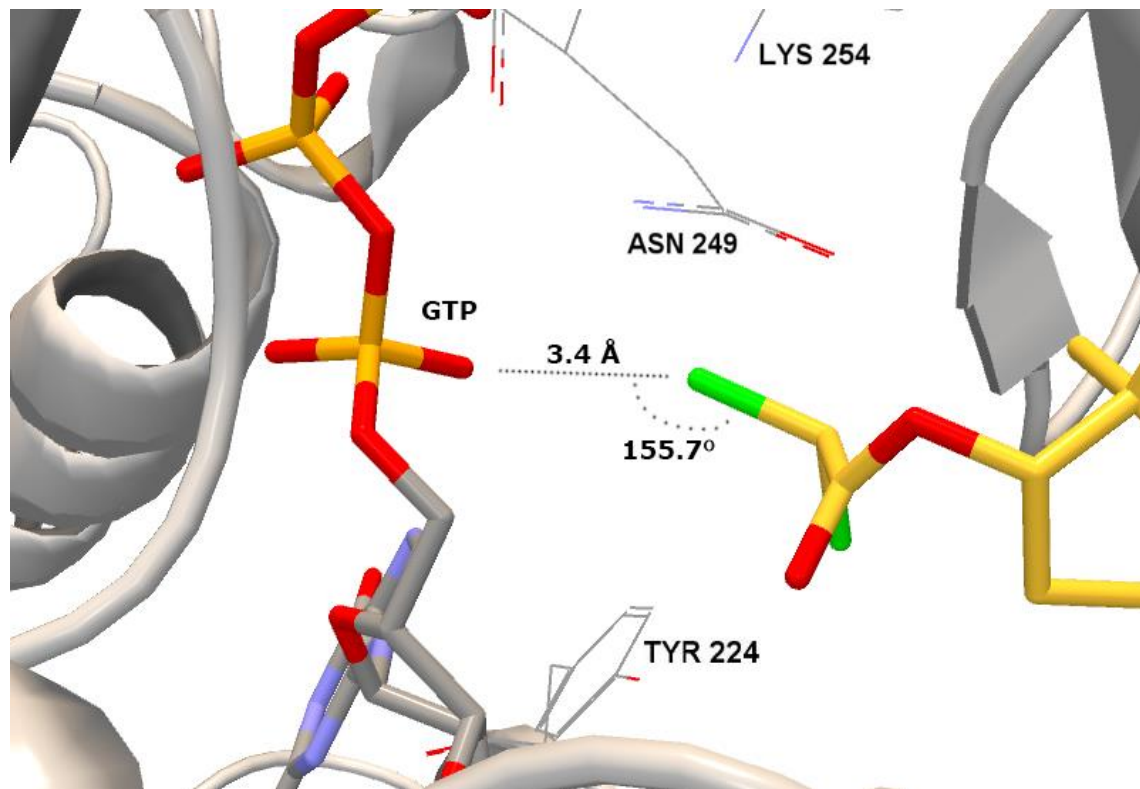
Однако биотестирование соединений 2a и 2b (и контрольного соединения 2c с остатком хлоруксусной кислоты) показало, что все они проявляли заметную способность ингибировать рост клеток карциномы легких человека A549.

Деполимеризацию микротрубочек вызывало только соединение 2c.

Объяснение результатов методом молекулярного моделирования



Расположение конъюгата 2a (желтый) и 2-метоксиэстрадиола (синий) в тубулиновом димере по данным докинга (AutoDock Vina 1.1.2).



Вывод: позиция стероидного ядра конъюгатов существенно отличается от таковой для 2-метоксиэстрадиола. Это различие обусловлено не только возможностью **обоих** атомов кислорода сложноэфирной группы при C17 образовывать водородные связи с Lys 254, Tyr 224, Asn 249, но и возможностью образования **галогеновой связи** между атомом хлора и атомом кислорода GTP (показана пунктиром). См: Kolář M.H., Tabarrini O. Halogen Bonding in Nucleic Acid Complexes. *J Med Chem.* 2017, 8681).

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

**Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований, проект № 18-03-00524.**