

©Коллектив авторов

КОНЬЮГАТ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА С ХЛОРАМБУЦИЛОМ: СИНТЕЗ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Н.А. Зефиров^{1,2*}, А.В. Мамаева¹, Е.В. Радченко^{1,2}, Е.Р. Милаева^{1,2}, С.А. Кузнецов³, О.Н. Зефирова^{1,2}

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3; *эл. почта: kolaz92@gmail.com

²Институт физиологически активных веществ Российской Академии наук, 142432 Черноголовка

³Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, 18059 Germany

Изучен конъюгат ДНК-алкилирующего агента хлорамбуцила с подофиллотоксином — лигандом колхицинового сайта тубулина. Целевое соединение получено этерификацией по Стеглиху с выходом 41%. Результаты биотестирования на клетках карциномы А549 выявили его способность в концентрации 2 мкМ вызвать полную деполимеризацию сети микротрубочек без какого-либо другого действия на свободный тубулин. Полученный конъюгат ингибирует пролиферацию ($IC_{50}=135\pm30$ нМ) и рост ($EC_{50}=240\pm30$ нМ) клеток А549 в наномолярном интервале концентраций. Результаты компьютерного молекулярного докинга нового соединения в трёхмерную модель колхицинового сайта α,β -тубулина и моделирования молекулярной динамики позволяют объяснить различие в действии конъюгатов подофиллотоксина с хлорамбуцилом и колхицина с хлорамбуцилом на сеть микротрубочек.

Ключевые слова: подофиллотоксин; хлорамбуцил; молекулярное моделирование; тубулин; карцинома А549

DOI: 10.18097/PBMC20216703289

ВВЕДЕНИЕ

Объединение фрагментов двух биоактивных веществ в одну молекулу “двойного лекарства” [1] часто используется в дизайне лекарственных веществ [2, 3]. Если исходные молекулы действуют на разные молекулярные мишени, то преимущество двойного лекарства перед смесью составляющих его компонентов состоит в возможности улучшения фармакокинетических свойств, уменьшения общей токсичности и др. В случае резкого различия действующих дозировок компонентов получаемый конъюгат фактически представляет собой производное

более активной молекулы. Но и для него возможно улучшение токсикологического профиля, а также проявление действия, не характерного ни для одного из исходных компонентов (см. примеры в работах [4-6]). Так, недавно полученный нами конъюгат ДНК-алкилирующего соединения хлорамбуцила (1) с колхицином (рис. 1) — антимитотическим агентом, действующим на тубулин, — проявил не типичную для исходных молекул способность вызывать образование тубулиновых кластеров (и при этом обладал выраженной селективностью по отношению к опухолевым клеткам) [4]. Для конъюгатов хлорамбуцила с другими лигандами

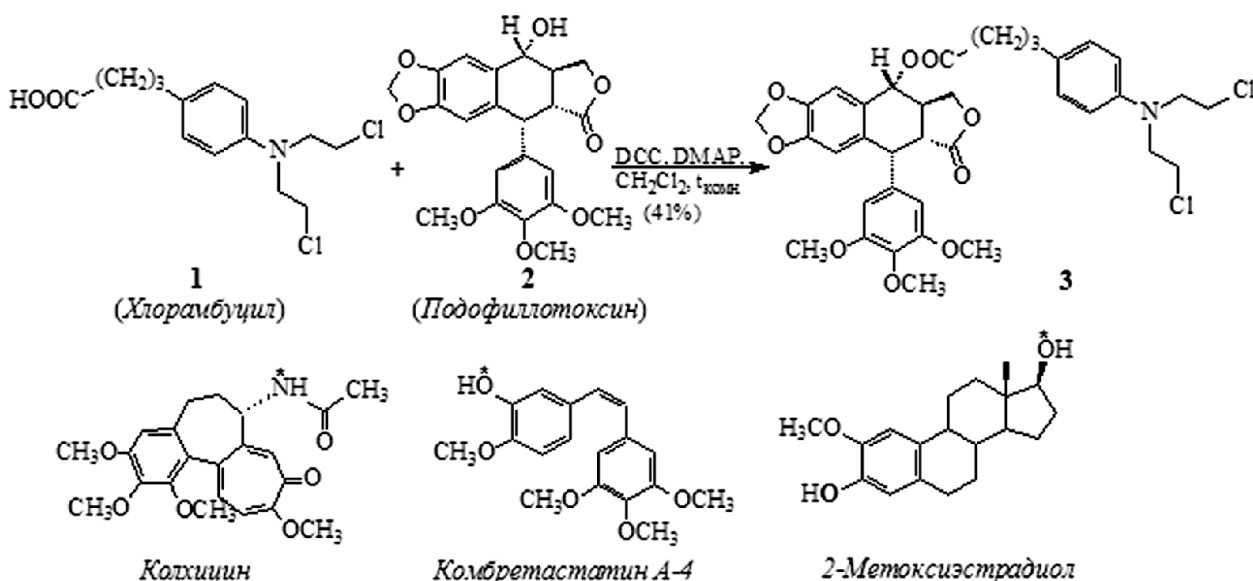


Рисунок 1. Структуры хлорамбуцила (1) и подофиллотоксина (2) и схема синтеза конъюгата 3, изученного в данной работе. Внизу представлены структуры некоторых лигандов колхицинового сайта тубулина, для которых описаны конъюгаты с хлорамбуцилом (остаток этой молекулы присоединяли к атомам, отмеченным звездочкой) [4, 7, 8].



колхицинового сайта тубулина — комбретастатином и 2-метоксиэстрадиолом (рис. 1) — такая активность не была обнаружена [7, 8]. Это вызвало интерес к синтезу подобных соединений с другими лигандами указанной области связывания в тубулине, в частности, с подофиллотоксином (2), С4-гидроксильная группа которого расположена в белке наиболее близко к атому азота колхицина [9]. С целью проверки способности конъюгата хлорамбуцила и подофиллотоксина (структура 3, рис. 1) стимулировать образование тубулиновых кластеров в данной работе был реализован его синтез и биотестирование, а также проведено компьютерного молекулярное моделирование его комплекса с тубулином.

МЕТОДИКА

Для проведения синтеза использовали коммерчески доступные исходные реагенты: подофиллотоксин, хлорамбуцил [4-(4-(бис(2-хлорэтил)амино)фенил)масляная кислота], N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC), 4-N,N'-диметиламинопиридин (4-DMAP) (все — фирмы “Sigma-Aldrich”, США). Контроль хода реакции осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах ALUGRAM Xtra G/UV254. Хроматографирование проводили на колонке с силикагелем Macherey-Nagel (0,063-0,2 мм). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Agilent 400-MR (400 МГц и 100 МГц соответственно, “Agilent Technologies”, США) при 28°C; химические сдвиги приведены относительно остаточного сигнала CDCl_3 : $\delta_{\text{H}}=7,26$ м.д., $\delta_{\text{C}}=77,0$ м.д. Масс-спектр MALDI-TOF регистрировали на приборе Bruker Autoflex II (“Brucker”, США), в рефлекторном режиме (ускоряющее напряжение 20 кВ). Элементный анализ выполнен на CHN-анализаторе Vario micro cube (“Elementar”, Германия).

4-O-(4-(Бис(2-хлорэтил)амино)фенил)бутаноат-L-подофиллотоксин (3)^{1,2}

К раствору 0,048 г (0,157 ммоль) хлорамбуцила в CH_2Cl_2 (10 мл) при комнатной температуре добавляли 0,050 г (0,121 ммоль) подофиллотоксина, 0,050 г (0,242 ммоль) DCC и каталитическое количество (0,01 г) DMAP. Перемешивали при комнатной температуре 24 ч, к реакционной смеси добавляли 5 мкл уксусной кислоты и через 15 мин растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате (10 мл) и выдерживали при 4°C 2 ч. Выпавший осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывали, промывали охлаждённым этилацетатом (2×5 мл), а фильтрат промывали насыщенным раствором NaCl (10 мл) и водой (10 мл), высушивали Na_2SO_4 и упаривали. Остаток хроматографировали [элюент: этилацетат — петролейный эфир (40-70°C), градиент 1:8-1:5]. Получено 0,035 г соединения 3 (выход 41%) в виде бледно-жёлтой маслянистой жидкости.

1 Отметим, что синтез соединения 3 упомянут в патенте [10], однако в качестве характеристик полученного вещества автором приведён только спектр ЯМР ^1H , который не соответствует указанной структуре.

2 Приведённое название соответствует принятому в литературе для производных подофиллотоксина. Название конъюгата 3 по IUPAC — (5*R*,5*aR*,8*aR*,9*R*)-8-оксо-9-(3,4,5-триметоксифенил)-5,5*a*,6,8,8*a*,9-гексагидрофурано[3',4':6,7]нафто[2,3-*d*][1,3]диоксол-5-ил 4-(4-(бис(2-хлорэтил)амино)фенил)бутаноат.

Отнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР проведено с учётом данных работы [11] и принятой в литературе [12] нумерации атомов в молекуле подофиллотоксина. ^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д., $\Delta\delta$, $\text{J}/\text{Гц}$): 1,96-2,01 (2H, м, H3a'), 2,42-2,47 (2H, м, H2a'), 2,61 (2H, т, H4a', $J=7,4$ Гц), 2,77-2,82 (1H, м, H3), 2,93 (1H, дд, H2, $J=4,3$, 14,5 Гц), 3,62-3,65 (4H, м, $2\text{CH}_2\text{Cl}$), 3,69-3,72 (4H, м, 2NCH_2), 3,75 (6H, с, OMe), 3,82 (3H, с, OMe), 4,20 (1H, м, H3a, $J=10,2$), 4,32 (1H, дд, H3a, $J=7,0$, 9,4 Гц), 4,60-4,61 (1H, д, H1, $J=4,3$ Гц), 5,88 (1H, д, H4, $J=9,0$ Гц), 5,99-6,00 (2H, м, OCH_2O), 6,39 (2H, с, H2',6'), 6,55 (1H, с, H8), 6,67 (2H, д, H3'',5'', $J=8,6$ Гц), 6,75 (1H, с, H5), 7,08 (2H, д, H2'',6'', $J=8,6$ Гц). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ): 26,58 (C3a'), 33,60 (C4a'), 33,97 (C2a'), 38,74 (C3), 40,29 ($2\text{CH}_2\text{Cl}$), 43,69 (C1), 45,57 (C2), 53,72 (2NCH_2), 56,12 (3',5'- OCH_3), 60,74 (4'- OCH_3), 71,36 (C3a), 73,47 (C4), 101,58 (OCH_2O), 106,97 (C5), 108,07 (C2', C6'), 109,70 (C8), 112,50 (C3'',5''), 128,30 (C8a), 129,69 (C2'',6''), 132,30 (C4a), 134,79 (C1', 1''), 137,12 (C4'), 144,15 (C4''), 147,55 (C7), 148,09 (C6), 152,60 (C3', C5'), 173,61 (C=O), 173,91 (C2a). MALDI-TOF, m/z : 652 ($\text{M}^+[\text{Cl}^{35}] - \text{CH}_2\text{Cl}^{35}$), (664 ($\text{M}^+[\text{Cl}^{35}] - \text{Cl}$), 699 ($\text{M}^+[\text{Cl}^{35}]$). Найдено, %: C 61,74; H 5,63; вычислено, %: $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{NO}_9\text{Cl}_2$, %: C 61,72; H 5,61.

Биотестирование

Биотестирование конъюгата 3 и (для сравнения) исходных веществ 1 и 2 проводили на линии клеток эпителиальной карциномы лёгких человека A549 (CCL-185), чувствительной к лигандам колхицинового сайта тубулина. В качестве отрицательного контроля использовали 0,5% диметилсульфоксид (ДМСО).

1. Стандартный колориметрический МТТ тест [13] проводили, используя [3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-2*H*-тетразолилбромид] (МТТ, “Roth GmbH”, Германия). Клетки высаживали в плашки в культуральной среде DMEM при температуре 37°C, добавляли растворы тестируемых веществ в ДМСО в интервале концентраций 0,001-50 мкМ (8 ячеек для каждого значения концентрации) и выдерживали 24 ч. Раствор МТТ добавляли до конечной концентрации 0,45 мг/мл. После удаления клеточной среды в каждую ячейку добавляли ДМСО и лизирующий раствор (10% додецилсульфат натрия и 0,6% уксусной кислоты) и образовавшиеся кристаллы формазана солибилизировали перемешиванием на качалке. Оптическую плотность измеряли при 590 нм с референсным фильтром 690 нм на приборе EL808 Ultra Microplate Reader (“Bio-Tek Instruments”, США). Подробное описание методики см. в [14].

2. Для определения ингибирования роста клеток высаженные в плашки клетки обрабатывали в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч веществами 1-3 в концентрациях 5-1500 нМ. Количество клеток определяли с помощью камеры Горяева и микроскопа с фазовым контрастом.

3. Действие на сеть микротрубочек и ядер клеток A549 изучали методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Клетки культивировали на покровных стёклах; инкубировали 24 ч, 48 ч или 72 ч с соединением **3** в концентрациях 2 мкМ, 10 мкМ или 100 мкМ или с соединениями **2**, **3** в концентрации 2 мкМ. Фиксированные клетки окрашивали с помощью первичных мышиных моноклональных антител к α -тубулину (“Sigma”, США) с последующей инкубацией с флуоресцентно мечеными AlexaFluor488 вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов мышей (“Molecular Probes”, США). Подробное описание методики см. в [15]. Анализ клеток проводили с помощью микроскопа Nikon Diaphot 300 (“Nikon GmbH”, Германия), оснащённого камерой SenSys (“Photometrics”, США). Апоптотический индекс определяли как отношение числа клеток с фрагментированными ядрами к общему числу клеток, выраженное в процентах.

Молекулярный докинг

Молекулярный докинг соединения **3** проводили в трёхмерную модель колхицинового сайта связывания в α , β -тубулине (PDB: 1SA1). Предварительно из модели были удалены молекулы воды и вещества, использованные для рентгеноструктурного анализа белка, но оставлены все молекулы и ионы, присутствующие в области интерфейса между α - и β -субъединицами белка. Заряды атомам белка присваивали по стандартному методу Кольмана с помощью программы AutoDock Tools 1.5.6. Двумерные структуры лигандов преобразовывали в трёхмерные и проводили оптимизацию геометрии методом молекулярной механики в силовом поле Amber ff14SB с использованием модели зарядов Гастайгера в программе UCSF Chimera 1.15 [16]. Процедуру докинга проводили с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2 [17] (размер области докинга 15,0 Å × 17,25 Å × 15,0 Å, координаты центра $x = 118,881$ Å, $y = 88,149$ Å, $z = 7,522$ Å, полнота поиска = 20). Отбирали комплексы лиганд-белок с наилучшими значениями оценочной функции и наиболее близким расположением подофиллотоксинового фрагмента к таковому для подофиллотоксина в модели белка. Структуры комплексов визуализировали с помощью программы CLC Drug Discovery Workbench (Version 4).

Моделирование молекулярной динамики

Моделирование молекулярной динамики проводили в силовом поле CHARMM36 / CGenFF 4.4 [18, 19]

с помощью программы GROMACS 2020.3 [20]. Начальные модели системы строили с помощью модулей Ligand Reader & Modeler и Solution Builder веб-службы CHARMM-GUI [21]. Молекулу белка встраивали в прямоугольный периодический бокс с водой в модели TIP3P, расстояние от белка до границы бокса составляло не менее 10 Å (общий размер бокса порядка 120×120×120 Å³). Отдельные случайно выбранные молекулы воды заменяли на ионы калия и хлора таким образом, чтобы обеспечить электрическую нейтральность системы и общую концентрацию KCl порядка 0,15 М. Для каждой системы проводили первоначальную минимизацию методом молекулярной механики (до 5000 шагов) на центральном процессоре, а затем выполняли предварительное уравнивание системы с помощью метода молекулярной динамики в течение 125 пс при температуре 300 К при постоянном объёме и температуре с использованием термостата v-rescale на графическом процессоре NVIDIA GeForce GTX 1080. Далее выполняли моделирование молекулярной динамики в течение 100 нс, при постоянном давлении 1 атм и температуре 300 К с использованием термостата v-rescale и баростата Парринелло-Рамана. Движения атомов водорода ограничивали с помощью алгоритма LINCS. Для анализа и визуализации результатов молекулярно-динамического моделирования и молекулярного докинга использовали программы cptraj [22] в пакете AmberTools 18 [23] и UCSF Chimera 1.15 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целевое соединение **3** было получено этерификацией подофиллотоксина хлорамбуцилом по Стэглиху с приемлемым выходом 41%. Результаты биотестирования конъюгата **3** на рост клеток карциномы лёгких A549 путём их прямого подсчёта под микроскопом показывает, что оно обладает антимитотической активностью в наномолярном интервале концентраций ($IC_{50}=135$ нМ) после 24 ч инкубации, причём это значение коррелирует с данными МТТ теста (таблица).

По данным иммунофлуоресцентной микроскопии в концентрации 2 мкМ соединение **3** вызывает полную деполимеризацию МТ (таблица, рис. 2). Никакого другого действия на сеть МТ, например, образования кластеров тубулина [4] или “закрученных МТ” [26, 27] не было обнаружено даже при высокой концентрации 100 мкМ. В концентрации 2 мкМ конъюгат **3** вызывает апоптоз в 30% опухолевых клеток (таблица, рис. 2С).

Таблица. Результаты биотестирования конъюгата **3** и исходных молекул **1** и **2**

N	Деполимеризация МТ ¹			Ингибирование роста клеток, IC_{50} мкМ ²	Цитотоксичность, EC_{50} мкМ ²	Апоптотический индекс (2 мкМ, 48 ч) %
	2 мкМ	10 мкМ	100 мкМ			
1	—	н.о.	н.о.	>1	>50	3
2	+++	н.о.	н.о.	0,01±0,002	0,02±0,005	48
3	+++	+++	+++	0,135±0,04	0,24±0,03	30

Примечание. 1 — Действие на МТ клеток карциномы A549 при указанной концентрации после 24 ч обработки; символами обозначено: “—” — нет эффекта; “+++” — полная деполимеризация МТ, н.о. — не определялось. 2 — Результаты трёх независимых экспериментов.

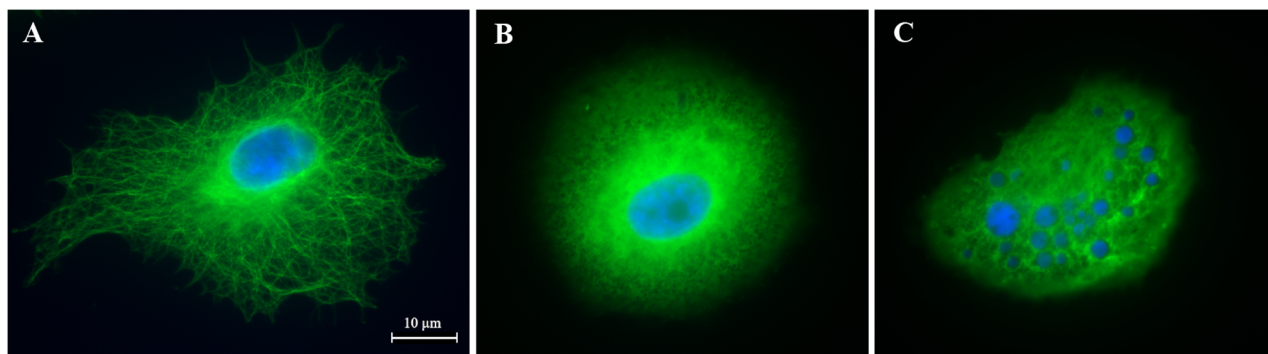


Рисунок 2. Данные иммунофлуоресцентной микроскопии для клеток карциномы A549, обработанных (А): 0,5% ДМСО (отрицательный контроль; сеть МТ в норме), аналогичная картина наблюдается для клеток, обработанных 2 мкМ хлорамбуцила (1); (В) — 2 мкМ конъюгата **3**, 24 ч инкубации (полная деполимеризация МТ), аналогичная картина наблюдается для клеток, обработанных 2 мкМ подофиллотоксина (2); (С) — 2 мкМ конъюгата **3**, 48 ч инкубации (апоптоз, ядра клеток фрагментированы).

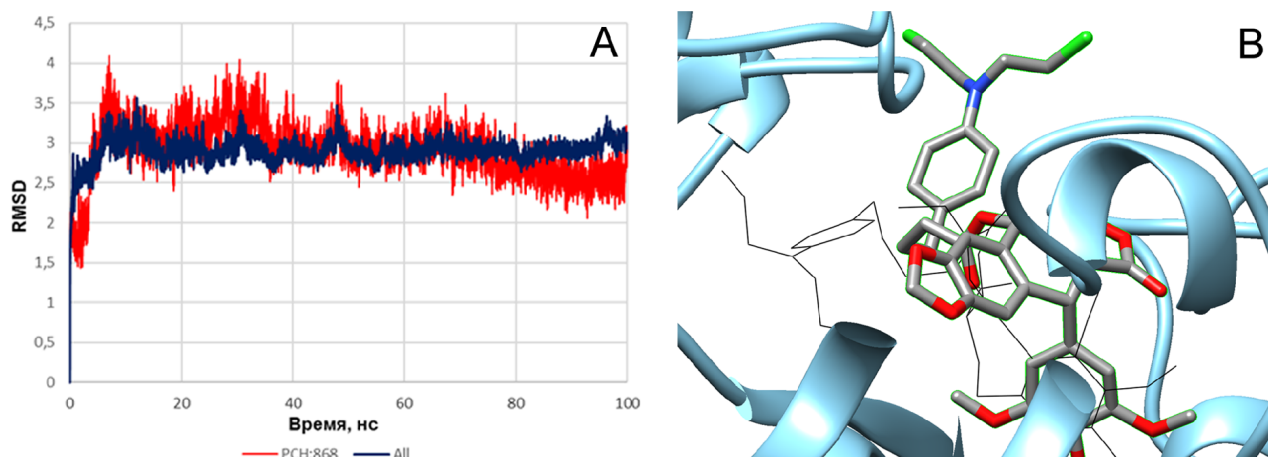


Рисунок 3. А. Значения среднеквадратичного отклонения координат тяжёлых атомов белка (синий) и лиганда (красный) от их начального положения в ходе моделирования молекулярной динамики. В. Расположение соединения **3** в тубулиновом димере по результатам молекулярной динамики (β-субъединица расположена справа, α-субъединица — вверху; атомы водорода не показаны; для сравнения тонкими чёрными линиями показано положение конъюгата колхицина с хлорамбуцилом, описанного в работе [4]).

Результаты докинга соединения **3** в структуру колхицинового сайта связывания в α,β-тубулине показывают, что в комплексе лиганд-белок с наилучшим значением оценочной функции расположение подофиллотоксинового фрагмента конъюгата близко к таковому для подофиллотоксина (среднеквадратичное отклонение $\text{RMSD} < 1,5 \text{ \AA}$). Фрагмент хлорамбуцила экспонирован в полость между двумя субъединицами, вблизи молекулы GTP(α) и аминокислотных остатков Gln11(α) и Lys254(β). Результаты моделирования молекулярной динамики не выявили существенных изменений положения лиганда от прогнозируемого на основе молекулярного докинга (рис. 3А,В). Сравнение позиций 4-(бис(2-хлорэтил)амино)фенильных группировок соединения **3** и описанного в работе [4] конъюгата хлорамбуцила (рис. 3В) демонстрирует их резкое различие, которое может быть причиной различия действия указанных веществ на сеть МТ опухолевых клеток.

Таким образом, в данной работе получен конъюгат подофиллотоксина с хлорамбуцилом, который обладает высокой цитотоксичностью (в наномолярном диапазоне концентраций) и способностью вызывать деполимеризацию МТ без какого-либо другого действия на МТ. Это действие отлично от такового для ранее описанного конъюгата хлорамбуцила с колхицином, способного вызывать образование тубулиновых кластеров, и может быть объяснено на основании данных компьютерного молекулярного моделирования различным расположением 4-(бис(2-хлорэтил)амино)фенильных группировок обоих конъюгатов в белке.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФН (грант 19-13-00084). Молекулярное моделирование для соединения **3** выполнено в рамках госзадания 121021000105-7.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Апполонии Глассл (университет Росток) за помощь в проведении биотестирования, а также Германской службе академических обменов (German Academic Exchange Service).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных или с участием людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Зефи́рова О.Н., Балакин К.В., Красавин М.Ю., Палюлин В.А., Поро́йков В.В., Радченко Е.В., Салахутдинов Н.Ф., Спасов А.А., Фисенко В.П., Бачурин С.О. (2019) Изв. АН. Сер. хим., №12, 2381-2395. [Zefirova O.N., Balakin K.V., Krasavin M.Yu., Palyulin V.A., Poroikov V.V., Radchenko E.V., Salahutdinov N.F., Spasov A.A., Fisenko V.P., Bachurin S.O. (2019) Izv. AN. Ser. Khim., no. 12, 2381-2395.]
2. Viegas-Junior C., Danuello A., da Silva B.V., Barreiro E.J., Fraga C.A. (2007) Curr. Med. Chem., **14**(17), 1829-1852.
3. Bérubé G. (2016) Expert Opin. Drug Discov., **11**(3), 281-305.
4. Nurieva E.V., Zefirov N.A., Fritsch N., Milaeva E.R., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2020) Mendelev Comm., **30**(6), 706-708.
5. Bombuwal K., Kinstle T., Popik V., Uppal S.O., Olesen J.B., Viña J., Heckman C.A. (2006) Beilstein J. Org. Chem., **2**, 13. DOI: 10.1186/1860-5397-2-13.
6. Chen Y., Jia Y., Song W., Zhang L. (2018) Front. Pharmacol., **9**, 1453. DOI: 10.3389/fphar.2018.01453
7. Coggiola B., Pagliai F., Allegrone G., Genazzani A.A., Tron G.C. (2005) Bioorg. Med. Chem. Lett., **15**(15), 3551-3554.
8. Lavrushkina E.A., Shibilev V.M., Zefirov N.A., Shevtsova E.F., Shevtsov P.N., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2020) Russ. Chem. Bull., Int. Ed., **69**, 558-562.
9. Liu Y.-Q., Tian J., Qian K., Zhao X.-B., Morris-Natschke S.L., Yang L., Nan X., Tian X., Lee K.-H. (2015) Med. Res. Rev., **35**(1), 1-62.
10. Yang L.-X. (2005) Patent US2005/004169, A1.
11. Terada T., Fujimoto K., Nomura M., Yamashita J., Kobunai T., Takeda S., Wierzb K., Yamada Y., Minami Y., Yoshida K., Yamaguchi H. (1993) Chem. Pharm. Bull., **41**(5), 907-912.
12. Dewick P.M., Jackson D.E. (1981) Phytochemistry, **20**, 2277-2280.
13. Mosmann T. (1983) J. Immunol. Methods, **65**(1-2), 55-63.
14. Zefirov N.A., Gädert L., Fatkulin A.R., Shibilev V.M., Butov G.M., Mokhov V.M., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2020) Mendelev Comm., **30**(1), 106-108.
15. Zefirov N.A., Evteeva Y.A., Krasnoperova A.I., Mamaeva A.V., Milaeva E.R., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2020) Mendelev Comm., **30**(4), 421-423.
16. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004) J. Comput. Chem., **25**(13), 1605-1612.
17. Trott O., Olson A.J. (2010) J. Comput. Chem., **31**(2), 455-461.
18. Huang J., MacKerell A.D.J. (2013) J. Comput. Chem., **34**(25), 2135-2145.
19. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D. Jr. (2010) J. Comput. Chem., **31**(4), 671-690.
20. Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei Sh., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L. 3rd, MacKerell A.D. Jr., Klauda J.B., Im W. (2016) J. Chem. Theory Comput., **12**(1), 405-413.
21. Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W. (2008) J. Comput. Chem., **29**(11), 1859-1865.
22. Roe D.R., Cheatham T.E. (2013) J. Chem. Theory Comput., **9**(7), 3084-3095.
23. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. (2013) Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci., **3**(2), 198-210.
24. Zefirov N.A., Evteeva Yu.A., Wobith B., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2019) Struct. Chem., **30**, DOI: 10.1007/s11224-018-1219-9.
25. Зефи́ров Н.А., Лаврушкина Е.А., Кузнецов С.А., Зефи́рова О.Н. (2019) Биомедицинская химия, **65**(2), 86-90. [Zefirov N.A., Lavrushkina E.A., Kuznetsov S.A., Zefirova O.N. (2019) Biomeditsinskaya Khimiya, **65**(2), 86-90.]

Поступила в редакцию: 15. 04. 2021.
После доработки: 26. 04. 2021.
Принята к печати: 09. 05. 2021.

CONJUGATE OF PODOPHYLLOTOXIN WITH CHLORAMBUCIL:
SYNTHESIS, BIOLOGICAL TESTING AND MOLECULAR MODELING

N.A. Zefirov^{1,2}, A.V. Mamaeva¹, E.V. Radchenko^{1,2}, E.R. Milaeva^{1,2}, S.A. Kuznetsov³, O.N. Zefirova^{1,2}

¹Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
1/3 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: kolaz92@gmail.com

²Institute of Physiologically active compounds, Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

³Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, 18059 Germany

In the present work we have studied a novel conjugate of the DNA alkylating agent chlorambucil with podophyllotoxin, a ligand of the colchicine binding site in tubulin. The target compound was obtained by Steglich esterification of podophyllotoxin with the percentage yield of 41%. Results of biotesting carried out on the carcinoma A549 cell line revealed that at a concentration of 2 μ M the conjugate caused full depolymerization of microtubules without any other effect on free tubulin. The conjugate inhibited proliferation ($IC_{50}=135\pm30$ nM) and growth ($EC_{50}=240\pm30$ nM) of A549 cells. The data of computer molecular docking of the novel compound into the 3D model of the colchicine binding site in α,β -tubulin and molecular dynamics modelling allowed to explain the observed difference in effects of chlorambucil-podophyllotoxin and chlorambucil-colchicine conjugates on microtubules.

Key words: podophyllotoxin; chlorambucil; molecular modeling; tubulin; carcinoma A549

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-13-00084). Molecular modeling for compound **3** was carried out within State assignment 121021000105-7.

Received: 15.04.2021, revised: 26.04.2021, accepted: 09.05.2021.