

©Коллектив авторов

## N-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЦИТОХРОМА P450 17A1

**Я.В. Панада<sup>1,2</sup>, Я.В. Фалетров<sup>1,2</sup>, Н.С. Фролова<sup>2</sup>, В.М. Шкуматов<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Химический факультет, Белорусский государственный университет,  
Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Белорусский государственный университет,  
Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14; \*эл. почта: biopharm@bsu.by

В данной работе описано получение и исследование 4-х изомерных N-алкиниламиностероидов андростанового и прегнанового ряда в качестве ингибиторов цитохрома P450 17A1, экспрессируемого в трансгенных дрожжах *Yarrowia lipolytica*. Наивысшая ингибиторная активность наблюдается при наличии стероидной боковой цепи, состоящей из 5 атомов. При равных концентрациях субстрата и ингибитора (50 мкМ) производное прегненолона, содержащее N-пропинильный фрагмент, уменьшает степень конверсии прогестерона в 5 раз.

**Ключевые слова:** алкиностероид; ингибирование стероид-17-альфа-гидроксилазы/17,20-лиазы; трансгенные дрожжи; молекулярный докинг; андроген-зависимые опухоли

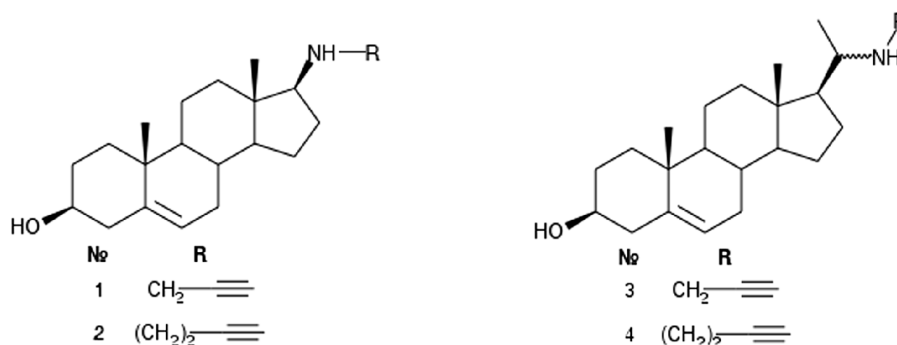
**DOI:** 10.18097/PBMC20196504324

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 представляют собой группу гем-зависимых монооксигеназ, участвующих в I фазе метаболизма ксенобиотиков и биологических окислительных процессах, в том числе стероидогенезе и биосинтезе витамина D3 и желчных кислот [1, 2]. Одним из важнейших стероидогенных цитохромов является стероид-17-альфа-гидроксилаза/17,20-лиаза (CYP17A1), катализирующая превращение прегненолона в дегидроэпиандростерон – ключевую стадию в биосинтезе андрогенов. Один из методов терапии метастатических опухолей предстательной железы основан на селективном ингибировании CYP17A1 абиратероном, действующим на стероидогенные клетки, оставшиеся после хирургического вмешательства [3]. Тем не менее, данное лекарство обладает рядом серьёзных побочных эффектов, в том числе гепато- и нефротоксичностью. Для решения данной проблемы были предприняты попытки создания аналогов абиратерона, самым успешным из которых стало бензимидазольное производное галетерон, действующий одновременно на активность CYP17A1 и рецепторов андрогенов [4, 5]. Несмотря на успешное прохождение

I и II фаз клинических испытаний галетерона, они были прекращены. Таким образом, вопрос о создании новых эффективных ингибиторов CYP17A1 остаётся открытым.

Известно, что цитохромы P450 могут подвергаться суицидному ингибированию терминальными или метилированными алкинами [6]. Предполагается, что механизм действия состоит в окислении алкинового фрагмента до кетена либо  $\alpha$ -алкинилкетона. Оба продукта обладают выраженными электрофильными свойствами и способны ковалентно модифицировать как амини- и тиольные группы, так и сам гем [6]. Другой потенциальный механизм заключается в окислении тиольных групп белка до тиольных радикалов, взаимодействующих с тройной связью [7]. Следует отметить, что большинство исследований в данной области ограничивалось, с одной стороны, замещёнными алкил- и арилацетиленами и, с другой, цитохромами печени CYP2B6 и CYP3A4, обладающими низкой субстратной специфичностью. В рамках поиска специфичных ингибиторов CYP17A1 нами были получены и исследованы ряд аминостероидов, содержащих алкиновую боковую цепь (рис. 1).



**Рисунок 1.** Строение исследованных N-алкиниламиностероидов. Цифрами обозначены: **1** – 3 $\beta$ -гидроксиандрост-5-ен-17 $\beta$ -(2-пропинил)амин; **2** – 3 $\beta$ -гидроксиандрост-5-ен-17 $\beta$ -(3-бутинил)амин; **3** – [20(R,S)]-3 $\beta$ -гидроксипрегн-5-ен-20-(2-пропинил)амин; **4** – [20(R,S)]-3 $\beta$ -гидроксипрегн-5-ен-20-(3-бутинил)амин.

## МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реагенты: “Sigma” (США) – проп-2-ин-1-амин (содержание основного вещества 98%), бут-3-ин-1-амин (95%), прегненолон (98%), дегидроэпиандростерон (99%), прогестерон (99%), 17-гидроксипрогестерон (95%), триацетоксиборогидрид натрия (98%), силикагель (размер пор 60 Å, “Sigma”); нитротетразолиевый синий (98%, “Lachema”, Чехия). Все растворители были перегнаны перед использованием. Тонкослойная хроматография проводилась с использованием пластинок на алюминиевой подложке (“Merck”, Германия) в системе бензол-этанол-уксусная кислота (4:1:0.1). Для проявления хроматограммы опрыскивали 53%-й серной кислотой с последующими прогреванием и просматриванием под УФ-светом (длина волны 365 нм). Спектры ESI-MS записывали на приборе Shimadzu LCMS-2020. ИК-спектры снимали на приборе Bruker Alpha (ATR-DI) в диапазоне 4000-400 см<sup>-1</sup>. Спектры <sup>1</sup>H ЯМР были получены с помощью прибора Bruker Avance (400 МГц) с использованием CDCl<sub>3</sub> (99,8%, “Sigma”) в качестве растворителя и внутреннего стандарта. Для докинга низкомолекулярных лигандов к белкам была использована программа AutoDock Vina 1.1.2. Структура человеческого белка CYP17A1 в комплексе с абиратероном (PDB ID 3RUK) и человеческого белка CYP11A1 в комплексе с холестерином (PDB ID 3MZS) были взяты из базы RCSB Protein Data Bank.

*Общая процедура восстановительного аминирования*

Соединения были получены восстановительным аминированием дегидроэпиандростерона либо прегненолона соответствующим алкинамином с выходом 70-95%, согласно методике из работы [8]. В общем случае, 34 мг триацетоксиборогидрида натрия (1,6×10<sup>-4</sup> моль) прибавляли в виде небольших порций на протяжении 48 ч к раствору кетостероида (1,0×10<sup>-4</sup> моль) и алкинамина (3,0×10<sup>-4</sup> моль) в 1 мл 1,2-дихлорэтана. Смесь выдерживали при комнатной температуре и постоянном перемешивании 48 ч (бутинамин) или 144 ч (пропинамин). Продукт был обработан охлаждённым до 5°C разбавленным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и проэкстрагирован CHCl<sub>3</sub> (6 раз по 3 мл). Органический экстракт был объединён, промыт водой и насыщенным раствором NaCl, высушен над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сконцентрирован под вакуумом. Полученные N-алкиниламиностероиды были очищены путём колоночной хроматографии (силикагель, элюент CHCl<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (19:1)).

**3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(2-пропинил)амин (1).** Выход 68%. ТСХ: R<sub>f</sub> = 0,25. ESI-MS: рассчитано для C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>NO (M+H)<sup>+</sup>: 328.264, найдено: 328.105. ИК (плёнка): 3100-3500 (О-Н), 3288 (С-Н, алкин), 2830-2950 (С-Н), 2115 (тройная связь С-С), 1637 (С=С), 1450 (симметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1366 (асимметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1146 (С-Н), 1058 (С-О), 954 см<sup>-1</sup> (ангулярная СН<sub>3</sub>-группа). <sup>1</sup>H ЯМР: δ = 5,40 (1 H, m, C<sub>6</sub>-H), 3,49 (1 H, m, C<sub>3</sub>-H), 2,83 (2 H, m, N-CH<sub>2</sub>), 1,89 (1 H, t, J = 2,8 Гц, С-Н, алкин), 1,03 (3 H, s, C<sub>19</sub>-H), 0,77 ppm (3 H, s, C<sub>18</sub>-H).

**3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(3-бутинил)амин (2).** Выход 95%. R<sub>f</sub> = 0,21. ESI-MS: рассчитано для C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>NO (M+H)<sup>+</sup>: 342.280, найдено: 342.102. ТСХ: R<sub>f</sub> = 0,25. ИК (плёнка): 3344 (О-Н), 3307 (С-Н, алкин), 2830-2950 (С-Н), 2116 (тройная связь С-С), 1637 (С=С), 1458 (симметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1374 (асимметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1152 (С-Н), 1058 (С-О), 954 см<sup>-1</sup> (ангулярная СН<sub>3</sub>-группа). <sup>1</sup>H ЯМР: δ = 5,37 (1 H, m, C<sub>6</sub>-H), 3,55 (1 H, m, C<sub>3</sub>-H), 2,86, 2,83 (2 H, m, J = 9,2 Гц, 6,8 Гц, 6,4 Гц, N-CH<sub>2</sub>), 2,43 (2 H, m, J = 3,2 Гц, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,02 (1 H, t, J = 2,5 Гц, С-Н, алкин), 1,03 (3 H, s, C<sub>19</sub>-H), 0,77 ppm (3 H, s, C<sub>18</sub>-H).

**[20(R,S)]-3β-гидроксипрегн-5-ен-20-(2-пропинил)амин (3).** Выход 78% в виде смеси энантиомеров. ESI-MS: рассчитано для C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>NO (M+H)<sup>+</sup>: 356.295, найдено: 356.150. ТСХ: R<sub>f</sub> = 0,17, 0,32. ИК (плёнка): 3370 (О-Н), 3288 (С-Н, алкин), 2830-2980 (С-Н), 2106 (тройная связь С-С), 1668 (С=С), 1466 (симметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1376 (асимметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1133 (С-Н), 1056 (С-О), 954 см<sup>-1</sup> (ангулярная СН<sub>3</sub>-группа). <sup>1</sup>H ЯМР: δ = 5,35 (1 H, m, C<sub>6</sub>-H), 3,55 (1 H, m, C<sub>3</sub>-H), 3,46 (1 H, q, J = 3,2 Гц, C<sub>20</sub>-H), 2,25 (2 H, m, N-CH<sub>2</sub>), 2,06 (1 H, t, J = 3,2 Гц, С-Н, алкин), 1,45 (1 H, s, N-Н), 1,01 (3 H, s, C<sub>19</sub>-H), 0,80 (3 H, s, C<sub>18</sub>-H), 0,75, 0,73 ppm (3 H, d, J = 6,8 Гц, N-CH<sub>2</sub>). Литературные данные: ИК (КBr): ν<sub>max</sub> = 3475, 3363, 3279, 2936, 2882, 2361, 1729, 1450, 1376 см<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,33; 3,50; 3,48; 3,35; 2,84, 2,74; 2,26; 2,18; 1,98; 1,97, 1,55; 1,84, 1,10; 1,82; 1,80, 1,30; 1,60, 1,05; 1,50; 1,43; 1,30; 1,06; 1,00; 0,98; 0,96; 0,76 ppm [8].

**[20(R,S)]-3β-гидроксипрегн-5-ен-20-(3-бутинил)амин (4).** Выход 90% в виде смеси энантиомеров. R<sub>f</sub> = 0,15, 0,28. ESI-MS: рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>NO (M+H)<sup>+</sup>: 370.311, найдено: 370.250. ИК (плёнка): 3344 (О-Н), 3307 (С-Н, алкин), 2830-2950 (С-Н), 2116 (тройная связь С-С), 1637 (С=С), 1458 (симметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1374 (асимметричная деформация СН<sub>3</sub>-группы), 1152 (С-Н), 1058 (С-О), 954 см<sup>-1</sup> (ангулярная СН<sub>3</sub>-группа). <sup>1</sup>H ЯМР: δ = 5,35 (2140 Гц, 1 H, m, C<sub>6</sub>-H), 3,55 (1409 Гц, 1 H, m, C<sub>3</sub>-H), 2,93 (957 Гц, 1 H, q, J = 3,2 Гц, C<sub>20</sub>-H), 2,01 ppm (802 Гц, 1 H, t, J = 3,2 Гц, С-Н, алкин), 1,02 (3 H, s, C<sub>19</sub>-H), 0,77 (3 H, s, C<sub>18</sub>-H), 0,72 ppm (2 H, m, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

*Преобразование стероидов и влияние на активность CYP17A1*

Для данной цели были использованы два штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующих гены цитохромов P450 из надпочечников быка с использованием гена *ICL1* в качестве промотора [9]. Штамм 5.54-1 содержал CYP11A1 и CYP17A1, в то время как штамм 8.84-1 экспрессировал только CYP17A1. Для выращивания культур была использована стандартная среда YPD (“Sigma”); культивацию проводили согласно методике из работы [10]. К 10 мл суспензии дрожжей, содержащей прогестерон в концентрации 50 мкМ, были добавлены растворы необходимых

стероидов в этаноле, затем объёмную долю последней доводили до 1%. Пробы, отобранные после 3 ч, 6 ч и 24 ч инкубации, экстрагировали путём последовательного добавления 1 мл  $\text{CHCl}_3$  и 2 мл этилацетата и центрифугирования при 1000 g (центрифуга Sigma 3-30KS, ротор 12157). Остаток после упаривания повторно растворяли в 0,5 мл этанола и анализировали с помощью масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии. В последнем случае использовали прибор 1220 Infinity LC ("Agilent", США) с колонкой Poroshell 120 EC-C18 (4,6×75 мм, средний размер частиц сорбента 2,7 мкм). Элюирование производили при 30°C с детекцией при 240 нм и следующим градиентом бидистиллированной воды (А) и ацетонитрила (В): 0-5 мин: 20% В; 5-8 мин: постепенное увеличение с 20% В до 75% В; 8-14 мин: 75% В; 14-15 мин: постепенное снижение с 75% В до 20% В; 15-20 мин: 20% В. Для оценки влияния синтетических стероидов на рост и жизнеспособность клеток были использованы фотометрия суспензии клеток при 600 нм и тест по восстановлению красителя нитротетразолиевый синий соответственно.

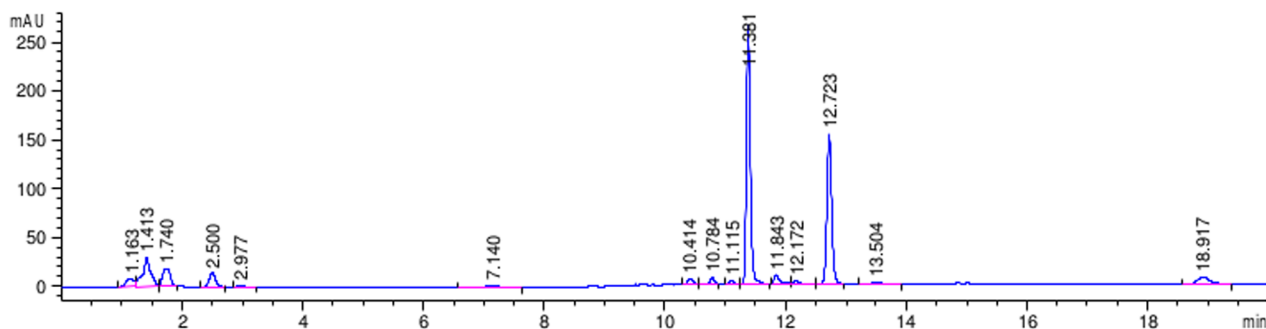
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание  $\Delta^4$ -3-кетостероидов в дрожжевых экстрактах было исследовано с помощью ВЭЖХ. В случае прогестерона единственным наблюдаемым метаболитом был 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерон (рис. 2, 3). Поскольку 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен-стероиды характеризуются слабым поглощением света при 240 нм, для их анализа

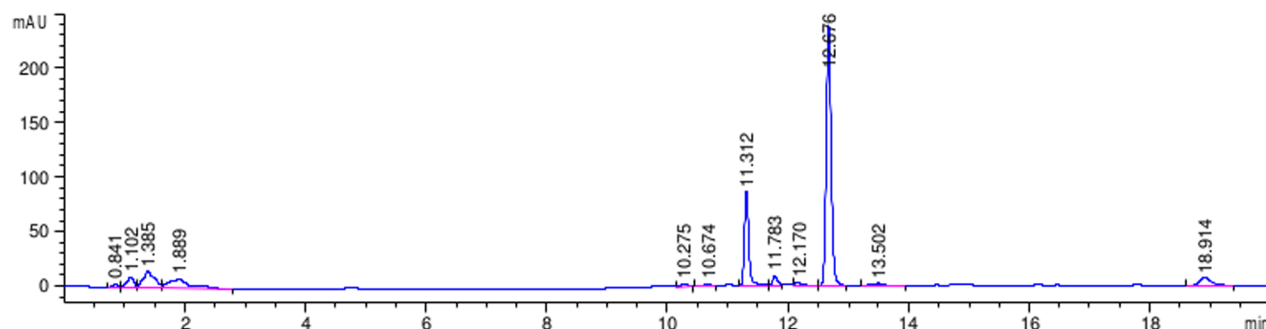
в экстрактах использовали метод масс-спектрометрии; данный метод показал отсутствие превращения N-алкиниламиностероидов на протяжении 24 ч инкубации. В отдельных случаях также были обнаружены минорные сигналы, соответствующие ацилированным производным алкиностероидов.

Поскольку наблюдаемое снижение превращения прогестерона может быть также вызвано гибелью клеток, экспрессирующих CYP17A1, было проведено исследование влияния N-алкиниламиностероидов на рост и жизнеспособность клеток. В случае штамма 5.54-1 наличие стероидов в образце приводило к снижению роста клеток на 5-10% (табл. 1, 2). Несмотря на то, что различия являются статистически значимыми, токсичность N-алкиниламиностероидов сопоставима с таковой для прогестерона либо его сочетания с абиратерона ацетатом. Следует отметить, что увеличение концентрации ингибитора до 100 мкМ незначительно влияло на рост клеток либо восстановление тетразолиевого красителя. Аналогичный эффект наблюдался и для штамма 8.84-1 вплоть до 6 ч инкубации (данные не приведены), тогда как на этапе 24 ч было обнаружено значительное снижение роста клеток на 20%. Как и в предыдущем случае, эффект сопоставим с действием чистого прогестерона.

Степень превращения прогестерона в контрольных образцах варьировала в пределах 40-60%, и в присутствии ингибиторов она практически не изменялась. При проведении расчётов, результаты которых представлены в таблицах 3 и 4, за основу была взята минимальная наблюдаемая конверсия 38%.



**Рисунок 2.** Репрезентативная хроматограмма экстракта из дрожжей *Y. lipolytica* 8.84-1, инкубированных на протяжении 6 ч в отсутствие ингибитора. Сигналы при 11,4 и 12,7 мин соответствуют 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерону и прогестерону.



**Рисунок 3.** Репрезентативная хроматограмма экстракта из дрожжей *Y. lipolytica* 8.84-1, инкубированных на протяжении 6 ч с ингибитором **3** (концентрация 50 мкМ). Сигналы при 11,4 и 12,7 мин соответствуют 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерону и прогестерону.

Таблица 1. Влияние алкиностероидов на относительный рост клеток (штамм *Y. lipolytica* 5.54-1, 6 ч инкубации)

Состав образца	Концентрация ингибитора, $\mu\text{M}$	OD600	Рост клеток относительно контрольного образца, %
Контроль	0	0,47 $\pm$ 0,02	100,0 $\pm$ 3,2
Прогестерон	0	0,45 $\pm$ 0,04	95,4 $\pm$ 8,8
Прогестерон + стероид 1	50	0,43 $\pm$ 0,04	90,9 $\pm$ 7,4
	100	0,48 $\pm$ 0,02	100,8 $\pm$ 5,4
Прогестерон + стероид 2	50	0,44 $\pm$ 0,04	92,0 $\pm$ 7,7
	100	0,44 $\pm$ 0,02	92,4 $\pm$ 3,3
Прогестерон + стероид 3	50	0,44 $\pm$ 0,02	93,3 $\pm$ 4,0
	100	0,44 $\pm$ 0,02	93,2 $\pm$ 4,8
Прогестерон + стероид 4	50	0,46 $\pm$ 0,02	96,4 $\pm$ 2,3
	100	0,43 $\pm$ 0,02	91,1 $\pm$ 4,7
Прогестерон, абиратерона ацетат	50	0,42 $\pm$ 0,02	87,8 $\pm$ 4,3

Таблица 2. Влияние алкиностероидов на относительный рост клеток (штамм *Y. lipolytica* 8.84-1, 24 ч инкубации)

Состав образца	Концентрация ингибитора, $\mu\text{M}$	OD600	Рост клеток относительно контрольного образца, %
Контроль	0	0,64 $\pm$ 0,02	100,0 $\pm$ 3,8
Прогестерон	0	0,56 $\pm$ 0,02	87,0 $\pm$ 4,6
Прогестерон + стероид 1	50	0,51 $\pm$ 0,04	80,1 $\pm$ 4,9
	100	0,51 $\pm$ 0,04	78,7 $\pm$ 7,6
Прогестерон + стероид 2	50	0,47 $\pm$ 0,08	73,5 $\pm$ 11,4
	100	0,48 $\pm$ 0,06	74,4 $\pm$ 8,0
Прогестерон + стероид 3	50	0,54 $\pm$ 0,04	84,5 $\pm$ 5,5
	100	0,53 $\pm$ 0,04	81,8 $\pm$ 6,3
Прогестерон + стероид 4	50	0,50 $\pm$ 0,04	78,3 $\pm$ 5,5
	100	0,47 $\pm$ 0,04	72,6 $\pm$ 7,6
Прогестерон, абиратерона ацетат	50	0,55 $\pm$ 0,04	85,1 $\pm$ 5,7

Таблица 3. Влияние синтезированных стероидов на превращение прогестерона дрожжами *Y. lipolytica* 5.54-1 после 6 ч инкубации

Ингибитор	Концентрация ингибитора, $\mu\text{M}$	Площадь сигнала (17 $\alpha$ -гидрокси-прогестерон), мА·с	Площадь сигнала (прогестерон), мА·с	Превращение прогестерона, %	Минимальное относительное ингибирование, %
-	0	987 $\pm$ 76	1610 $\pm$ 74	38,0 $\pm$ 3,0	-
1	50	1009 $\pm$ 54	1697 $\pm$ 63	37,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 2,2
	100	1234 $\pm$ 59	2042 $\pm$ 56	38,0 $\pm$ 1,8	6,0 $\pm$ 1,9
2	50	1039 $\pm$ 82	1674 $\pm$ 94	38,0 $\pm$ 3,0	0,0 $\pm$ 2,0
	100	636 $\pm$ 51	1773 $\pm$ 46	26,0 $\pm$ 2,1	28,1 $\pm$ 3,0
3	50	274 $\pm$ 63	2350 $\pm$ 66	10,0 $\pm$ 2,4	71,9 $\pm$ 4,0
	100	217 $\pm$ 60	2794 $\pm$ 68	7,0 $\pm$ 2,0	80,6 $\pm$ 3,0
4	50	1347 $\pm$ 63	1802 $\pm$ 57	43,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 2,1
	100	1320 $\pm$ 57	1518 $\pm$ 61	47,0 $\pm$ 2,0	0,0 $\pm$ 2,3
Абиратерона ацетат	50	0	2916 $\pm$ 55	0,0	100,0

Таблица 4. Влияние синтезированных стероидов на превращение прогестерона дрожжами *Y. lipolytica* 8.84-1 после 24 ч инкубации

Ингибитор	Концентрация ингибитора, $\mu\text{M}$	Площадь сигнала (17 $\alpha$ -гидрокси-прогестерон), мА·с	Площадь сигнала (прогестерон), мА·с	Превращение прогестерона, %	Минимальное относительное ингибирование, %
-	0	1125 $\pm$ 51	1714 $\pm$ 61	39,6 $\pm$ 1,8	-
1	50	387 $\pm$ 47	1938 $\pm$ 53	17,5 $\pm$ 2,0	54,2 $\pm$ 3,5
	100	492 $\pm$ 58	1827 $\pm$ 56	19,0 $\pm$ 2,5	41,0 $\pm$ 8,1
2	50	283 $\pm$ 51	2226 $\pm$ 57	9,6 $\pm$ 1,9	66,4 $\pm$ 5,5
	100	221 $\pm$ 63	2626 $\pm$ 55	8,1 $\pm$ 2,2	77,3 $\pm$ 1,6
3	50	375 $\pm$ 61	2270 $\pm$ 54	13,0 $\pm$ 2,3	65,0 $\pm$ 4,0
	100	373 $\pm$ 60	2474 $\pm$ 62	13,0 $\pm$ 2,1	63,0 $\pm$ 4,4
4	50	424 $\pm$ 56	2225 $\pm$ 60	18,9 $\pm$ 2,1	67,2 $\pm$ 12,0
	100	559 $\pm$ 63	2047 $\pm$ 66	17,5 $\pm$ 2,4	76,9 $\pm$ 13,4
Абиратерона ацетат	50	0	2810 $\pm$ 58	0,0	100,0

По сравнению со штаммом 5.54-1, дрожжи, экспрессирующие лишь CYP17A1 (штамм *Y. lipolytica* 8.84-1), осуществляют метаболизм прогестерона со значительно меньшей скоростью; это может быть связано с ранее обнаруженными особенностями штамма 8.84-1 [11]. Было установлено, что сверхэкспрессия как CYP17A1, так и собственной цитохром P450 редуктазы дрожжей приводит к трансформации эндоплазматического ретикулума. При этом первый белок вызывает образование преимущественно трубчатой структуры, тогда как синтез последнего приводит к наслоению мембран. Одновременная сверхэкспрессия вышеуказанных белков сопровождается образованием обеих форм эндоплазматического ретикулума [11]. Данное явление, по-видимому, может затруднять процесс 17-гидроксилирования стероидов.

В случае штамма, экспрессирующего оба стероидогенных цитохрома P450, соединения **1** и **4** практически не оказывают влияния на гидроксилирование прогестерона. В то же время, стероид **2** сохраняет слабые ингибиторные свойства, в то время как соединение **3** проявляет одинаково высокий уровень ингибирующей активности для двух исследованных штаммов. Предположительно, наличие CYP11A1 приводит к уменьшению концентрации ингибиторов за счёт связывания алкиностероидов; для проверки данной гипотезы был предпринят молекулярный докинг лигандов в активный центр CYP11A1, результаты которого представлены далее.

В контексте возможного механизма ингибирования следует отметить, что цитохромы P450, в том числе CYP3A4 и CYP17A1, способны вызывать N-деалкилирование липофильного красителя Нильского красного [10, 12]. В случае N-пропиниламиностероидов, аналогичный процесс привёл бы к образованию ненасыщенного альдегида, обладающего высокой реакционной способностью по отношению к amino- и тиольным группам белков, и первичных стероидных аминов. Тем не менее, масс-спектрометрический анализ экстрактов не выявил образования таких соединений. По-видимому, наблюдаемое ингибирование 17-гидроксилирования имеет конкурентную природу, либо оно вызвано метаболитом, который не может быть экстрагирован в условиях опыта. С учётом расположения атома азота в N-пропинилпроизводных не исключено, что кроме конкурентного ингибирования, соединение **3** подвержено окислению до активного электрофила.

Из данных таблицы 3 также видно, что максимальная ингибиторная активность соответствует соединениям с 5 атомами в боковой цепи (**2** и **3**), что особенно выражено в случае штамма 5.54-1. Возможная причина этого заключается в конформационных изменениях активного центра белка при связывании лиганда, либо невыгодных взаимодействиях с боковыми цепями аминокислотных остатков. Для проверки этого предположения было проведено молекулярное моделирование в приближении неподвижного рецептора с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2 [13]. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты моделирования для стероид 17-гидроксилазы/17,20-лиазы

Субстрат	-ΔG, ккал/моль	г (атом лиганда - атом простетической группы), Å
Прегненолон	11,1	4,2 (O20 – Fe)
		4,2 (C17 – Fe)
1	10,5	5,1 (N-CH2 – Fe)
	9,0	4,3 (N – Fe)
		4,3 (C терм. алкин. – Fe)
2	10,6	5,5 (N-CH2 – Fe)
	9,6	5,4 (N – Fe)
		2,9 (C терм. алкин. – Fe)
20R-3	10,1	6,1 (N-CH2 – Fe)
		4,8 (N – Fe)
20S-3	9,7	6,2 (N-CH2 – Fe)
		4,1 (N – Fe)
20R-4	9,1	5,1 (N-CH2 – Fe)
20S-4	9,7	4,7 (N-CH2 – Fe)

Для синтезированных аминостероидов был получен ряд конформаций, положение стероидного остатка которых совпадало с таковым для рентгеноструктур комплексов CYP17A1 с физиологическими субстратами и известными ингибиторами (например, для структур PDB ID 4NKW [14], PDB ID 3RUK). В каждом случае возможно образование водородной связи между 3-гидроксильной группой и остатком Asn-202, что способствует расположению стероида относительно спирали I. Расчётные энергии взаимодействия с CYP17A1 в целом коррелируют с ингибиторной активностью. Тем не менее, только для стероидов **2** и 20S-изомера **4** предсказана возможность сближения алкиновой группы с гемом. Следует отметить, что боковая цепь стероидов расположена вблизи двух подвижных неполярных остатков Leu-214 и Ile-371 (рис. 4), предположительно участвующих в связывании абиратерона, галетерона и в меньшей степени ориентировании природных субстратов [15, 16]. Несмотря на то, что в обычном состоянии Leu-214 и Ile-371 ориентированы в другую

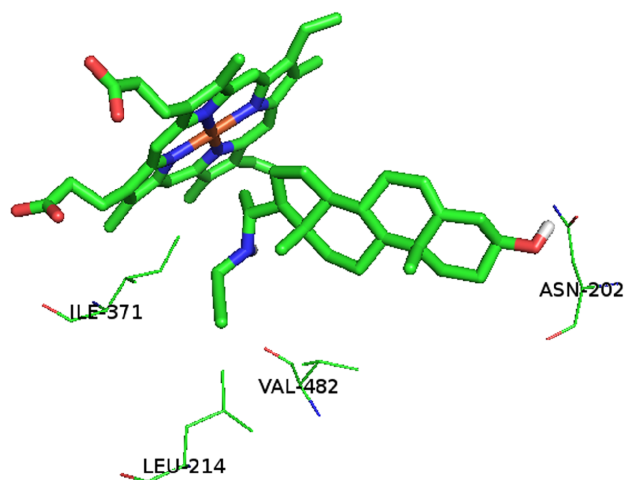


Рисунок 4. Расчётное расположение алкиностероида **3** (20R-изомер) в активном центре CYP17A1 (код PDB ID 3RUK). Жирными линиями обозначены гем и лиганд, тонкими – аминокислотные остатки.

сторону, при вращении относительно одинарных углеродных связей терминальные метильные группы оказываются рядом с алкиновой группой. В случае стероидов **2** и **3**, расстояние между алиновыми группами и указанными аминокислотными остатками составляет 1,5 Å, тогда как в случае соединения **1** длины цепи для такого взаимодействия недостаточно. Соответственно, в случае стероида **4** с бутиламиновой боковой цепью следует ожидать усиления стерического отталкивания, что и приводит к уменьшению аффинности. Результаты моделирования в приближении подвижности боковых цепей Leu-214 и Ile-371 коррелируют с данной гипотезой и показывают возможность дополнительного сближения стероида с гемом (см. табл. 6). Тем не менее, предпочитаемая ориентация лигандов остается неизменной по сравнению с данными докинга в предположении неподвижных боковых цепей, что свидетельствует в пользу отсутствия специфичных взаимодействий между алкиновым фрагментом исследуемых соединений и протестической группой CYP17A1.

Таблица 6. Результаты моделирования для стероид 17-гидроксилазы/17,20-лиазы с подвижными боковыми цепями Leu-214 и Ile-371

Субстрат	-ΔG, ккал/моль	г (атом лиганда - атом протестической группы), Å
Прегненолон	11,1	4,2 (O20-Fe)
		4,2 (C17-Fe)
1	9,2	4,1 (N-CH2 – Fe)
2	9,1	4,6 (N-CH2 – Fe)
20R-3	9,7	4,6 (N-CH2 – Fe)
20S-3	8,7	5,9 (N-CH2 – Fe)
20R-4	9,2	4,3 (N-CH2 – Fe)
20S-4	8,9	4,8 (N-CH2 – Fe)
		5,1 (N – Fe)

Чтобы проверить предположение о конкуренции за пул лигандов со стороны CYP11A1, были проведены аналогичные расчёты для указанного белка (PDB ID 3MZS). Результаты, представленные в таблице 7, позволяют предположить, что каждое соединение может связываться с CYP11A1 с сопоставимой аффинностью. Отметим, что стероиды, обладающие средней длиной боковой цепи (**2** и **3**), демонстрировали *in vitro* ингибирующее действие в случае штамма, экспрессирующего CYP11A1.

Таблица 7. Результаты моделирования для CYP11A1 (холестерин-20,22-гидроксилазы/лиазы)

Субстрат	-ΔG, ккал/моль	г (атом лиганда - атом протестической группы), Å
Холестерин	11,9	3,4 (C22-Fe)
1	9,8	4,5 (N-Fe)
2	10,1	4,4 (N-Fe)
20R-3	9,6	4,7 (N-Fe)
20S-3	9,0	5,8 (N-Fe)
20R-4	11,1	5,0 (N-Fe)
20S-4	11,3	4,7 (N-Fe)

Таким образом, в ходе работы был получен ряд алкинодержащих аминостероидов, исследованных на предмет ингибирования CYP17A1-зависимого гидроксигенирования в трансгенных дрожжах. В штамме, содержащем только CYP17A1, умеренную активность проявляли все соединения, снижая превращение прогестерона на 40-70%. В то же время, при использовании штамма, экспрессирующего также и CYP11A1, данный эффект сохранялся только у конъюгата прегненолона, содержащего N-пропинильный остаток. Было установлено, что токсичность новых соединений по отношению к клеткам дрожжей сопоставима с эффектами прогестерона и его комбинации с абиратероном в концентрациях до 100 мкМ и не влияет на ферментативное превращение стероидов за счёт снижения количества живых клеток. Хотя полученные стероиды обладают меньшей активностью, чем абиратерон, обнаруженная закономерность между структурой и ингибиторной способностью алкинодержащих стероидов может представлять интерес для рационализации дизайна ингибиторов CYP17A1.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам совместного белорусско-голландского предприятия ОАО “Фармлэнд” за предоставленный образец абиратерона ацетата, сотрудникам кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий и кафедры органической химии (химический факультет, Белорусский государственный университет) за предоставленную возможность спектроскопического анализа.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ “Химические технологии и материалы”, задание 2.39.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Miller W.L., Auchus R.J. (2011) *Endocr. Rev.*, **32**, 81-151.
2. Novikova L.A., Faletrov Y.V., Kovaleva I.E., Mauersberger S., Luzikov V.N., Shkumatov V.M. (2009) *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1482-1504.
3. Porubek D. (2013) *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 1364-1384.
4. Njar V.C.O., Brodie A.M. (2015) *J. Med. Chem.*, **58**, 2077-2087.
5. Латышева А.С., Мишарин А.Ю. (2018) *Biomed. Chem: Res. Methods*, **1**(2), DOI: 10.18097/BMCRM00020 [Latysheva A.S., Misharin A.Yu. (2018) *Biomed. Chem: Res. Methods*, **1**(2), DOI: 10.18097/BMCRM00020].
6. Wright A.T., Song J.D., Cravatt B.F. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10692-10700.

## N-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ CYP17A1

7. Subramanian R., Tam J., Aidasani D., Reid D.L., Skiles G.L. (2011) *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 677-686.
8. Porta E.O.J., Carvalho P.B., Avery A.M., Tekwani B.L., Labadie G.R. (2014) *Steroids*, **79**, 28-36.
9. Shkumatov V.M., Usova E.V., Frolova N.S., Barth G., Mauersberger S. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomed. Chem.*, **1**, 87-94.
10. Faletrov Y.V., Frolova N.S., Hlushko H.V., Rudaya E.V., Edimecheva I.P., Mauersberger S., Shkumatov V.M. (2013) *FEBS J.*, **280**, 3109-3119.
11. Mauersberger S., Novikova L.A., Shkumatov V.M. (2013) in: *Biotechnological applications* (Barth G, ed.) Springer, Berlin, pp. 171-226.
12. Lampe J.N., Fernandez C., Nath A., Atkins W.M. (2008) *Biochemistry*, **47**, 509-516.
13. Trott O., Olson A.J. (2010) *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461.
14. Petrunak E.M., DeVore N.M., Porubsky P.R., Scott E.E. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 32952-32964.
15. Xiao F., Yang M., Xu Y., Vongsagnal W. (2015) *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **13**, 520-527.
16. Fernández-Cancio M., Camats N., Flück C.E., Zalewski A., Dick B., Frey B.M., Monné R., Torán N., Audi L., Pandey A.V. (2018) *Pharmaceuticals (Basel)*, **11**, DOI: 10.3390/ph11020037.

Поступила в редакцию: 17. 05. 2019.  
После доработки: 11. 06. 2019.  
Принята к печати: 14. 06. 2019.

### SYNTHESIS AND EVALUATION OF N-ALKYNYLAMINOSTEROIDS AS POTENTIAL CYP450 17A1 INHIBITORS

*J.U. Panada<sup>1,2</sup>, Y.V. Faletrov<sup>1,2</sup>, N.S. Frolova<sup>2</sup>, V.M. Shkumatov<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, Belarusian State University,  
14 Leningradskaya str., Minsk, 220030 Belarus

<sup>2</sup>Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,  
14 Leningradskaya str., Minsk, 220030 Belarus; \*e-mail: biopharm@bsu.by

Four isomeric dehydroepiandrosterone- and pregnenolone-based N-alkynylaminosteroids were synthesized and tested *in vitro* for inhibition of heterologously expressed CYP17A1. The highest inhibitory activity was observed when the optimal number of side chain atoms was met. The conjugate based on pregnenolone containing an N-propynyl moiety was found to interfere with enzymatic activity most effectively and consistently in the micromolar range.

**Key words:** alkyne steroid; steroid 17-hydroxylase/17,20-lyase inhibition; yeast steroid transformation; molecular docking; androgen-dependent prostate cancer therapy

**Funding.** This investigation was supported by State Program of Scientific Research “Chemical technologies and materials”, project 2.39.

Received: 17.05.2019, revised: 11.06.2019, accepted: 14.06.2019.