

©Коллектив авторов

Н-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЦИТОХРОМА Р450 17А1

Я.В. Панада^{1,2}, Я.В. Фалетров^{1,2}, Н.С. Фролова², В.М. Шкуматов^{1,2*}

¹Химический факультет, Белорусский государственный университет,
Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14

²Научно-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, экпрессируемого 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 Р450 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 абираптероном, 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 абираптерона, 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 Р450 могут подвергаться суицидному ингибированию терминальными или метилированными алкинами [6]. Предполагается, что механизм действия состоит в окислении алкинового фрагмента до кетена либо α -алкинилкетона. Оба продукта обладают выраженным электрофильными свойствами и способны ковалентно модифицировать как амино- и тиольные группы, так и сам гем [6]. Другой потенциальный механизм заключается в окислении тиольных групп белка до тиильных 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 получен и исследован ряд аминостероидов, содержащих алкиновую боковую цепь (рис. 1).

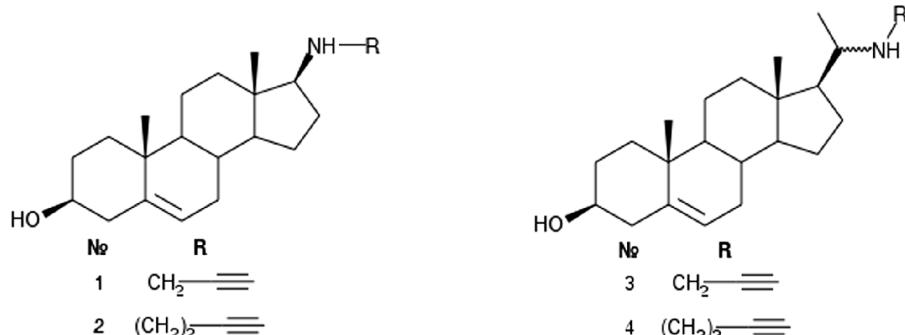


Рисунок 1. Строение исследованных N-алкиниламиностероидов. Цифрами обозначены: 1 – 3 β -гидроксиандрост-5-ен-17 β -(2-пропинил)амин; 2 – 3 β -гидроксиандрост-5-ен-17 β -(3-бутинил)амин; 3 – [20(R,S)]-3 β -гидроксипрегн-5-ен-20-(2-пропинил)амин; 4 – [20(R,S)]-3 β -гидроксипрегн-5-ен-20-(3-бутинил)амин.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реагенты: "Sigma" (США) – проп-2-ин-1-амин (содержание основного вещества 98%), бут-3-ин-1-амин (95%), прогненолон (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⁻¹. Спектры ¹H ЯМР были получены с помощью прибора Bruker Avance (400 МГц) с использованием CDCl₃ (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 абиатероном (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 прогненолона соответствующим алкинамином с выходом 70–95%, согласно методике из работы [8]. В общем случае, 34 мг триацетоксиборогидрида натрия ($1,6 \times 10^{-4}$ моль) прибавляли в виде небольших порций на протяжении 48 ч к раствору кетостероида ($1,0 \times 10^{-4}$ моль) и алкинамина ($3,0 \times 10^{-4}$ 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 Na₂CO₃ и проэкстрагирован CHCl₃ (6 раз по 3 мл). Органический экстракт был объединён, промыт водой и насыщенным раствором NaCl, высушен над безводным Na₂SO₄ и сконцентрирован под вакуумом. Полученные N-алкиниламиностероиды были очищены путём колоночной хроматографии (силикагель, элюент CHCl₃–C₂H₅OH (19:1).

3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(2-пропинил)амин (1). Выход 68%. TCX: Rf = 0,25. ESI-MS: рассчитано для C₂₂H₃₄NO (M+H)⁺: 328.264, найдено: 328.105. ИК (плёнка): 3100–3500 (O-H), 3288 (C-H, алкин), 2830–2950 (C-H), 2115 (тройная связь C-C), 1637 (C=C), 1450 (симметричная деформация CH₃-группы), 1366 (асимметричная деформация CH₃-группы), 1146 (C-N), 1058 (C-O), 954 см⁻¹ (анг

- ангулярная CH₃-группа). ¹H ЯМР: δ = 5,40 (1 H, m, C₆-H), 3,49 (1 H, m, C₃-H), 2,83 (2 H, m, N-CH₂), 1,89 (1 H, t, J = 2,8 Гц, C-H, алкин), 1,03 (3 H, s, C₁₉-H), 0,77 (3 H, s, C₁₈-H).

3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(3-бутинил)амин (2). Выход 95%. Rf = 0,21. ESI-MS: рассчитано для C₂₃H₃₆NO (M+H)⁺: 342.280, найдено: 342.102. TCX: Rf = 0,25. ИК (плёнка): 3344 (O-H), 3307 (C-H, алкин), 2830–2950 (C-H), 2116 (тройная связь C-C), 1637 (C=C), 1458 (симметричная деформация CH₃-группы), 1374 (асимметричная деформация CH₃-группы), 1152 (C-N), 1058 (C-O), 954 см⁻¹ (анг

- ангулярная CH₃-группа). ¹H ЯМР: δ = 5,37 (1 H, m, C₆-H), 3,55 (1 H, m, C₃-H), 2,86, 2,83 (2 H, m, J = 9,2 Гц, 6,8 Гц, 6,4 Гц, N-CH₂), 2,43 (2 H, m, J = 3,2 Гц, N-CH₂-CH₂), 2,02 (1 H, t, J = 2,5 Гц, C-H, алкин), 1,03 (3 H, s, C₁₉-H), 0,77 ppm (3 H, s, C₁₈-H).

[20(R,S)]-3β-гидроксипрегн-5-ен-20-(2-пропинил)амин (3). Выход 78% в виде смеси энантиомеров. ESI-MS: рассчитано для C₂₄H₃₈NO (M+H)⁺: 356.295, найдено: 356.150. TCX: Rf = 0,17, 0,32. ИК (плёнка): 3370 (O-H), 3288 (C-H, алкин), 2830–2980 (C-H), 2106 (тройная связь C-C), 1668 (C=C), 1466 (симметричная деформация CH₃-группы), 1376 (асимметричная деформация CH₃-группы), 1133 (C-N), 1056 (C-O), 954 см⁻¹ (анг

- ангулярная CH₃-группа). ¹H ЯМР: δ = 5,35 (1 H, m, C₆-H), 3,55 (1 H, m, C₃-H), 3,46 (1 H, q, J = 3,2 Гц, C₂₀-H), 2,25 (2 H, m, N-CH₂), 2,06 (1 H, t, J = 3,2 Гц, C-H, алкин), 1,45 (1 H, s, N-H), 1,01 (3 H, s, C₁₉-H), 0,80 (3 H, s, C₁₈-H), 0,75, 0,73 ppm (3 H, d, J = 6,8 Гц, N-CH₂). Литературные данные: ИК (KBr): ν_{max} = 3475, 3363, 3279, 2936, 2882, 2361, 1729, 1450, 1376 см⁻¹. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): 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. Rf = 0,15, 0,28. ESI-MS: рассчитано для C₂₅H₄₀NO (M+H)⁺: 370.311, найдено: 370.250. ИК (плёнка): 3344 (O-H), 3307 (C-H, алкин), 2830–2950 (C-H), 2116 (тройная связь C-C), 1637 (C=C), 1458 (симметричная деформация CH₃-группы), 1374 (асимметричная деформация CH₃-группы), 1152 (C-N), 1058 (C-O), 954 см⁻¹ (анг

- ангулярная CH₃-группа). ¹H ЯМР: δ = 5,35 (2140 Гц, 1 H, m, C₆-H), 3,55 (1409 Гц, 1 H, m, C₃-H), 2,93 (957 Гц, 1 H, q, J = 3,2 Гц, C₂₀-H), 2,01 ppm (802 Гц, 1 H, t, J = 3,2 Гц, C-H, алкин), 1,02 (3 H, s, C₁₉-H), 0,77 (3 H, s, C₁₈-H), 0,72 ppm (2 H, m, N-CH₂-CH₂).

Превращение 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

N-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ CYP17A1

стериоидов 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 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 ($4,6 \times 75$ мм, средний размер частиц сорбента 2,7 мкм). Элюирование производили при 30°C с детекцией при 240 нм и следующим градиентом бидистилированной воды (A) и ацетонитрила (B): 0-5 мин: 20% B; 5-8 мин: постепенное увеличение с 20% B до 75% B; 8-14 мин: 75% B; 14-15 мин: постепенное снижение с 75% B до 20% B; 15-20 мин: 20% B. 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 Δ^4 -3-кетостероидов в дрожжевых экстрактах было исследовано с помощью ВЭЖХ. В случае прогестерона единственным наблюдаемым метаболитом был 17 α -гидроксипрогестерон (рис. 2, 3). Поскольку 3 β -гидрокси-5-ен-стериоиды 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 гибелю 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 абиатерона 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%.

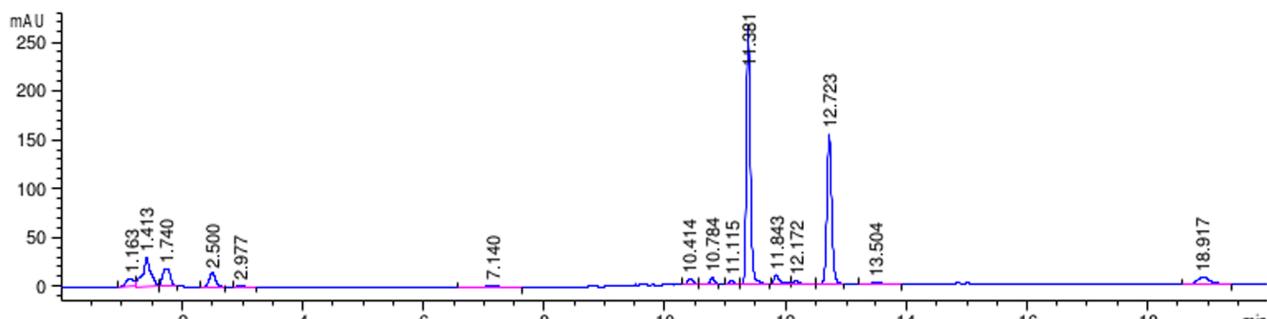


Рисунок 2. Репрезентативная хроматограмма экстракта из дрожжей *Y. lipolytica* 8.84-1, инкубированных на протяжении 6 ч в отсутствие ингибитора. Сигналы при 11,4 и 12,7 мин соответствуют 17 α -гидроксипрогестерону и прогестерону.

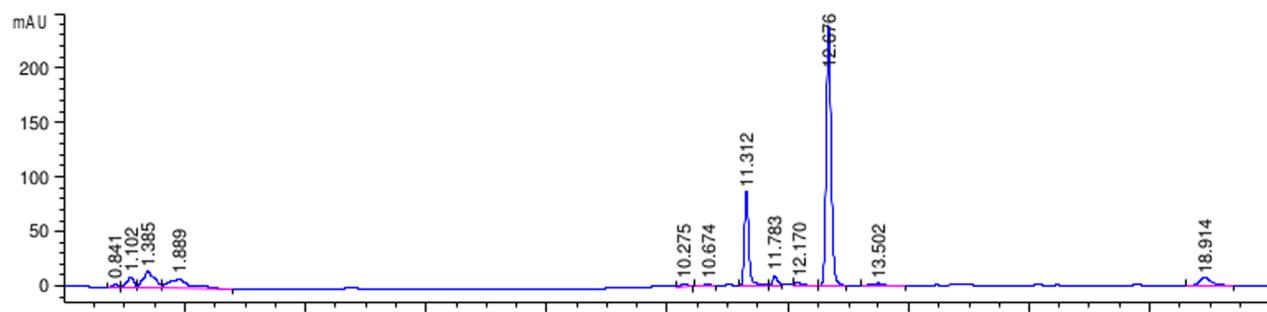


Рисунок 3. Репрезентативная хроматограмма экстракта из дрожжей *Y. lipolytica* 8.84-1, инкубированных на протяжении 6 ч с ингибитором 3 (концентрация 50 мкМ). Сигналы при 11,4 и 12,7 мин соответствуют 17 α -гидроксипрогестерону и прогестерону.

Панада и др.

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

Состав образца	Концентрация ингибитора, μM	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, абиатерона ацетат	50	0,42 \pm 0,02	87,8 \pm 4,3

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

Состав образца	Концентрация ингибитора, μM	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, абиатерона ацетат	50	0,55 \pm 0,04	85,1 \pm 5,7

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

Ингибитор	Концентрация ингибитора, μM	Площадь сигнала (17α -гидрокси-прогестерон), $\text{mA} \cdot \text{с}$	Площадь сигнала (прогестерон), $\text{mA} \cdot \text{с}$	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
Абиатерона ацетат	50	0	2916 \pm 55	0,0	100,0

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

Ингибитор	Концентрация ингибитора, μM	Площадь сигнала (17α -гидрокси-прогестерон), $\text{mA} \cdot \text{с}$	Площадь сигнала (прогестерон), $\text{mA} \cdot \text{с}$	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
Абиатерона ацетат	50	0	2810 \pm 58	0,0	100,0

N-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ CYP17A1

По сравнению со штаммом 5.54-1, дрожжи, экспрессирующие лишь CYP17A1 (штамм *Y. lypolytica* 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 ингибиции для двух исследованных штаммов. Предположительно, наличие CYP11A1 приводит к уменьшению концентрации ингибиторов за счёт связывания алкиноостероидов; 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 амино- 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 метabolитом, 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)
		4,3 (N – Fe)
2	9,0	4,3 (C терм. алкин. – Fe)
		5,5 (N-CH2 – Fe)
20R-3	10,6	5,4 (N – Fe)
		2,9 (C терм. алкин. – Fe)
20S-3	9,7	6,1 (N-CH2 – Fe)
		4,8 (N – Fe)
20R-4	9,1	6,2 (N-CH2 – Fe)
		4,1 (N – Fe)
20S-4	9,7	5,1 (N-CH2 – Fe)
		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. Расчёты 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 абиаратерона, 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

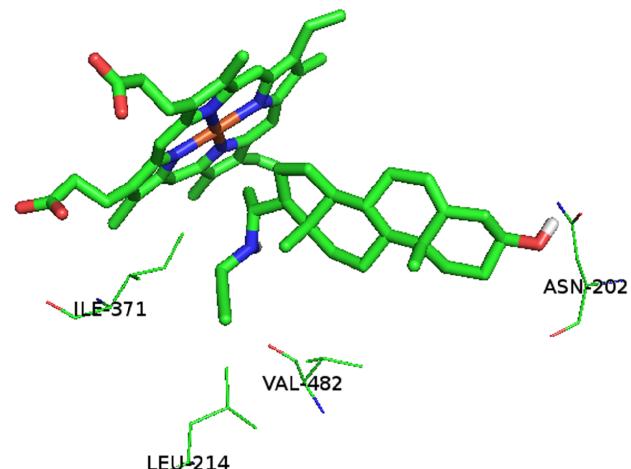


Рисунок 4. Расчётное расположение алкиноостероида **3** (20R-изомер) в активном центре CYP17A1 (код PDB ID 3RUK). Жирными линиями обозначены гем и лиганд, тонкими – аминокислотные остатки.

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 бутинаминовой 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, предпочтаемая 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 простетической 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	r (атом лиганда - атом простетической группы), Å
Прегненолон	11,1	4,2 (O20-Fe)
		4,2 (C17-Fe)
1	9,2	4,1 (N-CH ₂ – Fe)
2	9,1	4,6 (N-CH ₂ – Fe)
20R-3	9,7	4,6 (N-CH ₂ – Fe)
20S-3	8,7	5,9 (N-CH ₂ – Fe)
20R-4	9,2	4,3 (N-CH ₂ – Fe)
20S-4	8,9	4,8 (N-CH ₂ – 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	r (атом лиганда - атом простетической 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 алкинсодержащих аминостероидов, исследованных на предмет ингибирования CYP17A1-зависимого гидроксилирования 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 алкиностероидов 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

- Miller WL., Auchus R.J. (2011) Endocr. Rev., **32**, 81-151.
- Novikova L.A., Faletrov Y.V., Kovaleva I.E., Mauersberger S., Luzikov V.N., Shkumatov V.M. (2009) Biochemistry (Moscow), **74**, 1482-1504.
- Porubek D. (2013) Curr. Top. Med. Chem., **13**, 1364-1384.
- Njar V.C.O., Brodie A.M. (2015) J. Med. Chem., **58**, 2077-2087.
- 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].
- Wright A.T., Song J.D., Cravatt B.F. (2009) J. Am. Chem. Soc., **131**, 10692-10700.

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., Audí 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^{1,2}, Y.V. Faletrov^{1,2}, N.S. Frolova², V.M. Shkumatov^{1,2*}

¹Faculty of Chemistry, Belarusian State University,
14 Leningradskaya str., Minsk, 220030 Belarus

²Research 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.