На правах рукописи

Латышева Александра Степановна

Исследование противоопухолевой активности оксазолиновых производных андрост-16-ена и 21-норпрегн-17(20)-ена

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории синтеза физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Научный руководитель — доктор биологических наук, профессор **Мишарин Александр Юрьевич**

Официальные оппоненты — **Лесовая Екатерина Андреевна**
доктор биологических наук, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Научно-исследовательский институт канцерогенеза), руководитель группы природных канцерогенов, старший научный сотрудник

Белоглазкина Елена Кимовна,
доктор химических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, заведующая лабораторией биологически активных органических соединений

Ведущая организация – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Институт биохимии имени А.Н. Баха)

Защита диссертации состоится «16» мая 2024 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук — Карпова Е.А.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Рак предстательной железы (РПЖ) – наиболее часто диагностируемое и второе по распространенности онкологическое заболевание мужчин. Во многих случаях проведение простатэктомии и радиотерапии на ранних стадиях заболевания приводит к выздоровлению, однако у части пациентов рак продолжает распространяться. РПЖ – андроген-зависимое заболевание и медикаментозное снижение уровня андрогенов и блокирование активности андрогенового рецептора (AR) является эффективным методом лечения. Тем не менее, в течение 5 лет лечения у 60% пациентов приобретается устойчивость к андроген-депривационной терапии и наблюдаются рецидивы заболевания. Эта стадия заболевания определяется как CRPC (castration resistant prostate cancer).

CRPC характеризуется повышенной активностью ферментов биосинтеза андрогенов (в первую очередь 17α-гидроксилазы-17/20-лиазы, CYP17A1); повышенной экспрессией гена AR и синтезом мутантных форм и сплайс-вариантов AR с отсутствием специфичности к лигандам и повышенной устойчивостью к протеосомальной деградации; мутациями в генах белков-корегуляторов AR; а также множеством андроген-независмых изменений: нарушениями в основных сигнальных путях клетки, мутациями в генах белков-супрессоров опухолей, изменениями в экспрессии ростовых факторов, цитокинов, шаперонов.

С 90-х годов прошлого века в мире проводится масштабный поиск препаратов, способных подавлять биосинтез андрогенов, активность CYP17A1 и развитие РПЖ. Многие синтетические стероиды, модифицированные азотсодержащими гетероциклами оказались эффективными ингибиторами CYP17A1, а два соединения этой серии – 17-(3-пиридил)-андроста-5,16-диен-3β-ол (абиратерон) **1** и 17-(1H-бензимидазол-1-ил)-андроста-5,16-диен-3β-ол (галетерон) **2** – перспективными противораковыми агентами. Ацетат абиратерона в 2011 году был рекомендован в качестве препарата для лечения поздних стадий РПЖ, а галетерон был охарактеризован как комплексный противораковый агент, ингибирующий активность CYP17A1, являющийся антагонистом AR и стимулирующий его протеосомальную деградацию.

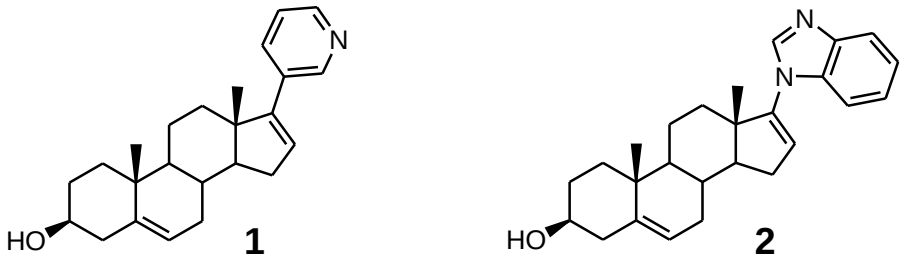


Рисунок 1. *Структуры абиратерона и галетерона*

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований показали, что абиратерон и галетерон, изначально предложенные в качестве специфических ингибиторов CYP17A1, на самом деле являются полифункциональными противоопухолевыми агентами. В настоящее время в мире широко проводятся работы посвященные поиску новых биомишеней, с которыми взаимодействуют абиратерон, галетерон и их аналоги; исследованию молекулярных механизмов, лежащих в основе противоопухолевой активности этих соединений; дизайну и синтезу новых более активных и специфичных стероидных противоопухолевых агентов, а также их изучению

в качестве потенциальных препаратов для лечения поздних стадий РПЖ. Актуальность этих исследований очевидна.

Цель и задачи исследования. В лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ИБМХ, а также в лаборатории Синтеза стероидов ИБОХ НАНБ (Минск, Республика Беларусь) был проведен синтез серии новых производных андростана и прегнана, модифицированных различными азотсодержащими гетероциклами и различающихся структурой заместителей в стероидном фрагменте.

Цель настоящей работы – исследовать противоопухолевую активность и оценить фармакологический потенциал наиболее перспективных соединений из новой серии азотсодержащих стероидов – производных [17(20)*E*]-прегнена и 16-андростена, содержащих оксазолиновый заместитель (190 и 217) (рисунок 2).

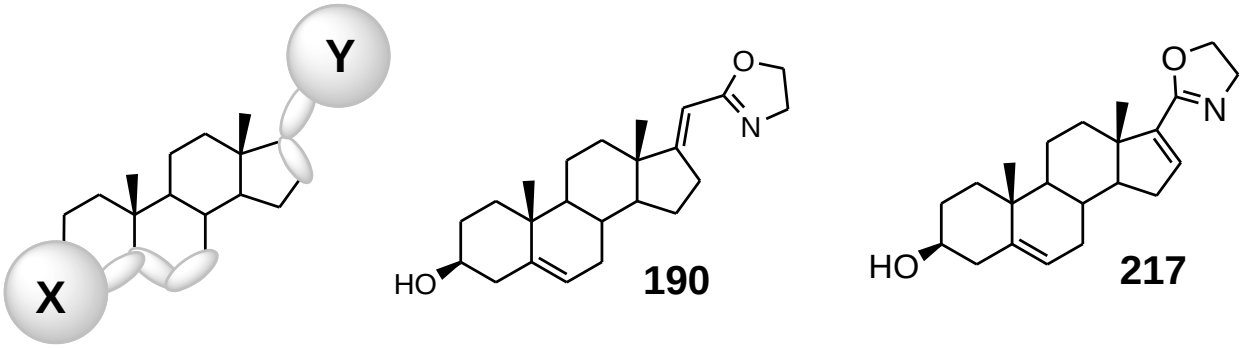


Рисунок 2. *Общая формула исследованных в работе азотсодержащих стероидных производных (X – различные заместители; Y – азотсодержащий гетероцикл; утолщенные линии – варьирующие участки стероидного цикла) и формулы оксазолинов* ***190*** *и* ***217*** *(Нумерация соединений соответствует таковой в диссертации)*

.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы основные задачи:

1) Провести первичный скрининг антипролиферативной активности новых азотсодержащих производных андростана и прегнана в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3; найти корреляцию структура – антипролиферативная активность; выбрать наиболее перспективные соединения для проведения дальнейших исследований.
2) Исследовать влияние выбранных кандидатов – оксазолиновых производных 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена **190** и **217** – на активность CYP17A1 и провести анализ молекулярных моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов.
3) Изучить влияние выбранных кандидатов – оксазолиновых производных 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена **190** и **217** на сигнальные пути, ответственные за апоптоз и онкогенез в клетках карциномы простаты; сравнить противоопухолевый потенциал выбранных кандидатов с таковым для абиратерона.
4) Сравнить эффекты оксазолина **190** с эффектами абиратерона в экспериментах *in vivo*.

Научная новизна. В работе проведена оценка антипролиферативной активности 38 новых азотсодержащих производных андростана и прегнана в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3; найдена корреляция структура–активность; показана высокая антипролиферативная активность производных 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена, содержащих оксазолиновый фрагмент.

В работе установлено, что оксазолиновые производные 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена **190** и **217** являются эффективными ингибиторами CYP17A1; анализ

молекулярных моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов показал существенные различия в структуре комплексов.

В работе установлено, что оксазолиновые производные 21-норпрегн-17(20)-ена и андрост-16-ена **190** и **217** подавляют рост и пролиферацию клеток карциномы простаты стимулируя апоптоз и деградацию ДНК, повышая экспрессию проапоптотических и подавляя экспрессию антиапоптотических факторов. В клетках PC-3 и DU-145 оксазолины **190** и **217** оказались более активными проапоптотическими агентами, чем абиратерон.

В работе показано, что оксазолиновое производное 21-норпрегн-17(20)-ена **190** обладает более высокой биодоступностью и улучшенными фармакокинетическими характеристиками по сравнению с абиратероном; что оксазолин **190** снижает уровень тестостерона у мышей и подавляет рост ксенографтов опухолей 22Rv1 и DU-145 у мышей Balb/c nude не менее эффективно, чем абиратерон.

Практическая значимость. Исследованные в работе стероидные оксазолины **190** и **217** проявляли значительную противоопухолевую активность, вследствие чего могут рассматриваться в качестве перспективных кандидатов для разработки новых противораковых препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1) Антипролиферативная активность производных андростана и прегнана, модифицированных азотистыми гетероциклами, в клетках карциномы простаты; корреляция структура – активность.
2) Ингибирование активности CYP17A1 стероидными оксазолинами **190** и **217**; анализ молекулярных моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов.
3) Влияние оксазолинов **190** и **217** на сигнальные пути, ответственные за апоптоз и онкогенез в клетках карциномы простаты PC-3 и DU-145.
4) Фармакокинетика и биодоступность стероидного оксазолина **190** при пероральном введении мышам C57BL/6; сравнение эффектов оксазолина **190** и абиратерона **1** на уровень тестостерона и рост ксенографтов у мышей.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на Всероссийской молодежной конференции «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (16 – 19 ноября, 2016, Уфа), Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2016» (27 июня – 1 июля, 2016, Санкт-Петербург), Междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике (28-31 мая, 2017, Севастополь), XIII Международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (15 марта, 2018, Москва), 24-й Конференции по изопреноидам (9 -12 сентября 2018, Белосток, Польша); V Международной конференции «Постгеном 2018» (29 октября – 2 ноября 2018, Казань), V Междисциплинарной конференции «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», (15-18 сентября, 2019, Судак, Крым), 26-й Конференции EAU (секция Исследования в урологии) (10-12 октября 2019, Порту, Португалия), VIII Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» (4-6 декабря, 2019, Санкт-Петербург).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы, из которых 14 статей (10 в индексируемых международными базами данных Web of Science, Scopus и

РИНЦ, и рекомендованными ВАК), и 10 в сборниках материалов российских и международных научных конференций.

Личный вклад автора Автором были выполнены эксперименты по оценке антипролиферативной активности новых азотсодержащих стероидных производных в клетках карциномы простаты; самостоятельно синтезированы 6 новых оксазолиновых производных андрост-16-ена **217**, **223** – **227**; исследовано ингибирование CYP17A1 оксазолинами **190** и **217**, проанализированы модели соответствующих фермент-ингибиторных комплексов. Совместно с коллегами автор исследовала влияние оксазолинов **190** и **217** на пролиферацию и апоптоз в клетках карциномы простаты, а также эффекты оксазолина **190** в экспериментах *in vivo*. Автор собрала литературные данные о современном состоянии исследований в области стероидных противораковых агентов и обобщила их в литературном обзоре. Вместе с коллегами автор подготовила к публикации статьи по теме диссертации.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из 6 разделов: "1. Введение", "2. Обзор литературы" (посвященный современному состоянию исследований азотсодержащих стероидных производных в качестве противоопухолевых агентов), "3. Материалы и методы", "4. Результаты и их обсуждение", “5. Заключение”, "6. Выводы". Работа изложена на 119 страницах, иллюстрирована 53 рисунками, содержит 3 таблицы, список литературы включает 157 источников.

Данная диссертационная работа выполнена в рамках Государственной Программы фундаментальных исследований и при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10008), РФФИ (гранты № 15-04-02939, 15-34-04090_бел_мол_а) и МИНОБРНАУКИ РФ (Государственный контракт № 14.N08.11.0107).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Первичный скрининг антипролиферативной активности новых азотсодержащих стероидных производных в клетках карциномы простаты

Первой задачей работы явился первичный скрининг антипролиферативной активности 38 новых азотсодержащих стероидных производных, синтезированных в лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ИБМХ, а также в лаборатории Синтеза стероидов ИБОХ НАНБ (Минск, Республика Беларусь), проводимый с целью нахождения корреляции структура – активность и выбора наиболее перспективных кандидатов – потенциальных агентов для предклинических испытаний. Структуры исследованных соединений представлены на рисунке 3.

Оценка способности синтезированных соединений подавлять рост и пролиферацию клеток карциномы простаты LNCaP и PC-3 (стандартных клеточных моделей для исследования андроген-зависимых и андроген-независимых форм РПЖ, соответственно) была проведена методом МТТ [*Mossmann,1983*]. Все исследованные соединения незначительно влияли на жизнеспособность клеток PC-3 и LNCaP при 24 ч инкубации даже в высокой концентрации, что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности. Однако при 96-часовой инкубации ряд соединений достоверно подавлял рост и пролиферацию клеток.

Соединения **190 – 195** являются производными [17(20)*E*]-3β-гидрокси-21-норпрегна-5,17(20)-диена, различающиеся структурой гетероцикла. Оксазолин **190** и бензоксазол **195** проявляли значительную антипролиферативную активность, изоксазол **191** и оксадиазол **194** – слабую активность, триазол **192** и тетразол **193** были неактивны.

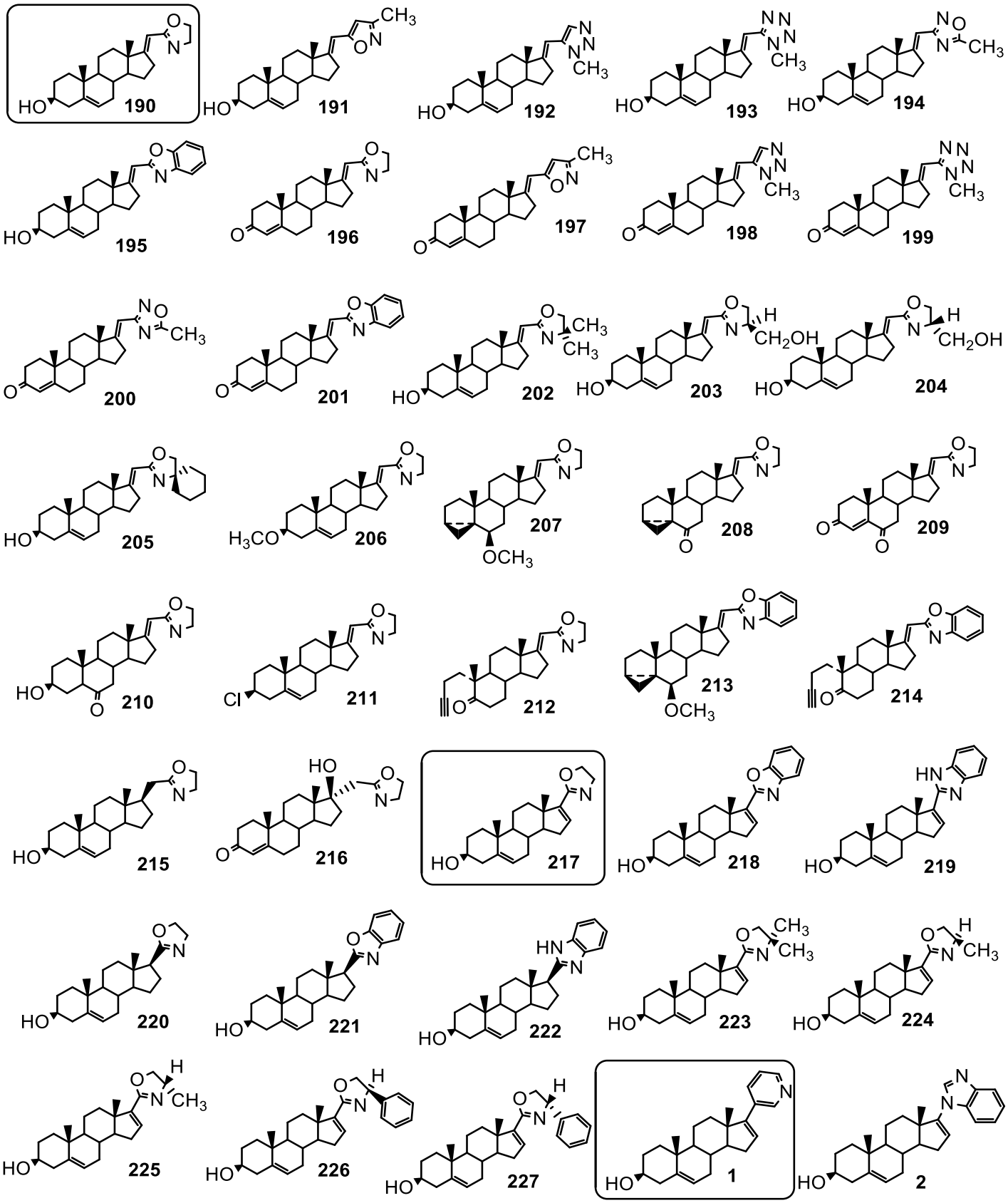


Рисунок 3. *Структуры исследованных соединений (формулы выбранных кандидатов – соединений **190** и **217**, а также соединения сравнения – абиратерона **1** выделены рамкой)*

Активность аналогичных производных [17(20)*E*]-3-оксо-21-норпрегна-4,17(20)-диена **196 – 201** была достоверно слабее, однако оксазолин **196** и бензоксазол **201** заметно подавляли рост и пролиферацию клеток LNCaP и PC-3.

Введение метильных, гидроксиметильных или циклогексильного заместителей в положение 4’ оксазолинового цикла приводила к неактивным соединениям **202 - 205**.

Оксазолиновые производные [17(20)*E*]-21-норпрегн-17(20)-ена, содержащие 3β-метокси-5-ен- (**206**), 6β-метокси-3α,5α-цикло- (**207**), 6-оксо-3α,5α-цикло- (**208**), 3,6-диоксо-4-ен- (**209**), 3β-гидрокси-6-оксо- (**210**) и 3β-хлор-5-ен- (**211**) - заместители проявляли слабую антипролиферативную активность, или были неактивными, а оксазолиновое секо-А-производное 21-норпрегн-17(20)-ена **212** – существенную антипролиферативную активность. Производное бензоксазола, содержащее 6β-метокси-3α,5α-цикло-фрагмент **213**, проявляло слабую активность, а секо-А-производное **214** – умеренную активность.

Таким образом, наибольшую антипролиферативную активность в ряду [17(20)*E*]-21-норпрегн-17(20)-ена проявляли 3β-гидрокси-5-ен- производные оксазолина и бензоксазола. Наличие 17(20)-двойной связи существенно для проявления активности – оксазолиновые производные 21-норпрегнана, не содержащие 17(20)-двойной связи – **215** и **216** – были неактивными.

17-Азотсодержащие производные андрост-16-ена, содержащие оксазолиновый (**217**) и бензимидазоловый (**219**) фрагменты, эффективно ингибировали пролиферацию клеток LNCaP и PC-3; бензоксазоловое производное **218** проявляло умеренную активность. 17β-Замещенные производные андростана **220 – 222**, не содержащие 16-двойной связи, сопряженной с гетероциклом, были значительно менее активны, чем производные **217 – 219**. Производные андрост-16-ена, содержащие оксазолиновый и бензимидазоловый фрагменты (соединения **217** и **219**) значительно превосходили по антипролиферативной активности в клетках LNCaP и PC-3 абиратерон и галетерон. Метильные и фенильные заместители в положении 4’ оксазолинового цикла производных андрост-16-ена (соединения **223 – 227**) незначительно снижали антипролиферативную активность этих соединений (по сравнению оксазолином **217**). Корреляция структура–активность для исследованных соединений схематически представлена на рисунке 4.

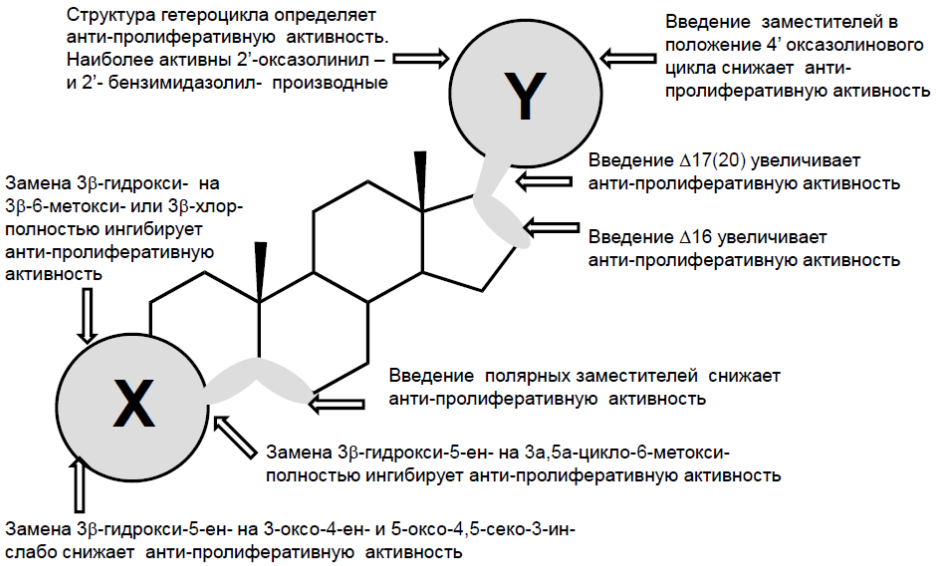


Рисунок 4. *Корреляция структура-антипролиферативная активность в ряду азотсодержащих производных андростана и прегнана*

Для дальнейших исследований мы выбрали два новых соединения, содержащих оксазолиновый цикл - 2'-{[*(E)*-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол **190** и 2′-(3β-гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4′,5′-дигидро-1′,3′-оксазол **217**. Значения IC_{50} для оксазолина **190** составляли 19,9 ± 8.3 и 14,4 ± 4,9 мкМ, а для оксазолина **217** – 2,2 ± 0,6 и 2,3 ± 0,6 мкМ (в клетках LNCaP и PC-3, соответственно). Соответствующие значения IC_{50} для абиратерона **1** составляли 22,6 ± 4,9 и 17,2 ± 5,2 мкМ

2. Взаимодействие оксазолинов 190 и 217 с CYP17A1

Второй задачей работы было изучение взаимодействия оксазолин-содержащих производных **190** и **217** с основной потенциальной мишенью – 17α-гидроксилазой/17,20-лиазой – CYP17A1 и оценка ингибиторной активности этих соединений. Оценка ингибиторной активности соединений **190** и **217** проводилась с использованием частично очищенной микросомальной фракции тестикул крысы в качестве источника фермента [*Nnane, 2001*]; об активности CYP17A1 судили по скорости превращения прогестерона в 17α-гидроксипрогестерон и андростендион (рис. 5); абиратерон **1** был использован в качестве соединения сравнения.

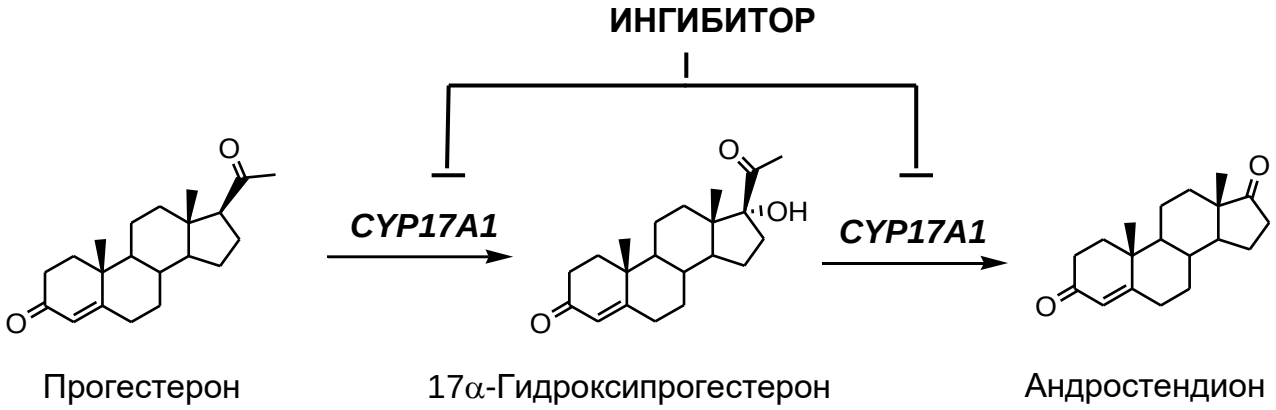


Рисунок 5. *CYP17A-катализируемая реакция превращения прогестерона в 17α-гидроксипрогестерон и андростендион*

Микросомы инкубировали с прогестероном в присутствии NADPH+ (в отсутствии или в присутствии исследуемого ингибитора в концентрации 5 мкМ), затем, после остановки реакции, проводили экстракцию стероидов. Суммарную фракцию стероидов анализировали ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором.

Чтобы оценить влияние заместителей в оксазолиновом фрагменте на способность соединения ингибировать активность CYP17A1 мы провели аналогичные эксперименты с соединениями **223 – 227**, отличающимися от соединения **217** тем, что в положение 4' оксазолинового цикла были введены дополнительные метильные или фенильные группы. Вследствие этого, соединения **224 – 227** содержали дополнительный хиральный центр в положении 4' оксазолинового цикла (рис. 6). Результаты оценки ингибиторной активности соединений **190**, **217, 223 – 227** представлены в таблице 1.

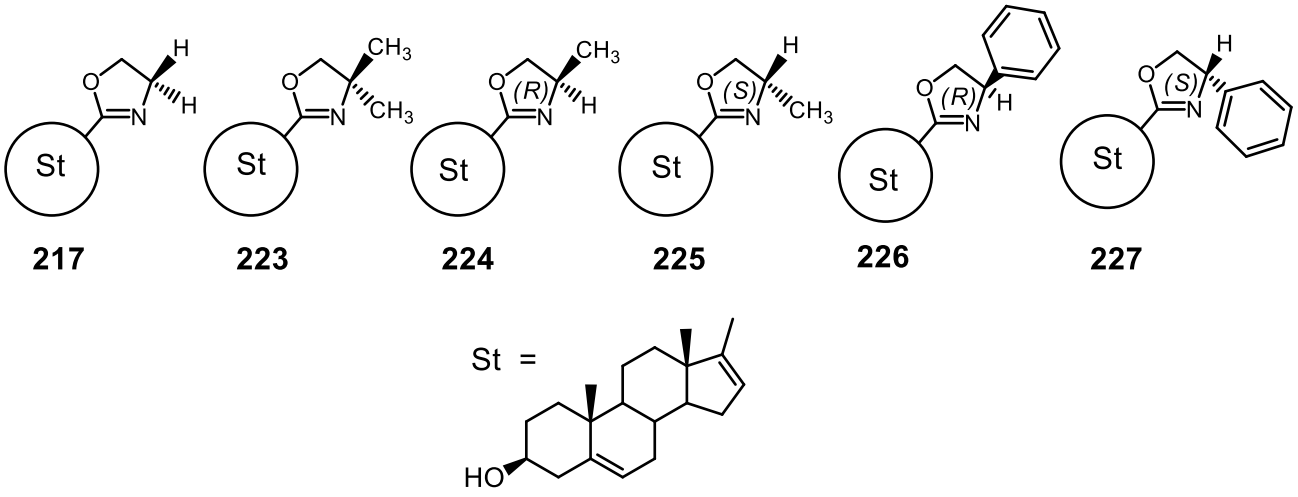


Рисунок 6. *Оксазолиновые фрагменты соединений **217, 223 – 227***

ТАБЛИЦА 1
ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ CYP17A1 ОКСАЗОЛИНАМИ 190, 217, 223 – 227 И АБИРАТЕРОНОМ 1

Соединение №	**190**	**217**	**223**	**224**	**225**	**226**	**227**	**1**
Ингибирование 17-гидроксилазной активности CYP17A1 (%)	**70 ± 4**	**77 ± 3**	**< 5**	**21 ± 3**	**< 5**	**12 ± 3**	**< 5**	**67 ± 5**

Оксазолины **190** и **217** оказались не менее активными ингибиторами каталитической активности CYP17A1 чем абиратерон **1**, а ингибиторная активность соединений, содержащих метил- и фенил- замещенные оксазолиновые циклы оказалась значительно слабее. 4’(*R*)-Метил- и 4’(*R*)-фенил- оксазолины **224** и **226** обладали умеренной, но достоверной ингибиторной активностью, а соответствующие 4’(*S*)-изомеры **225** и **227**, также как и 4’,4’-диметилзамещенный оксазолин **223**, были неактивны**.** Очевидно, что введение дополнительных заместителей в оксазолиновый цикл производных андрост-16-ена сильно снижает ингибиторную активность.

Модель фермент-ингибиторного комплекса CYP17A1 с оксазолиновым производным андрост-16-ена **217** была построена с использованием молекулярного докинга. Структура оксазолина **217** была успешно помещена в кристаллическую структуру CYP17A1 (PDB id 3RUK). Контрольный докинг абиратерона воспроизвел фермент-ингибиторный комплекс со значением RMSD равным 0.51 Å. Детальный анализ связывания показал, что в фермент-ингибиторных комплексах стероидные фрагменты абиратерона и соединения **217** расположены практически одинаково; оксазолиновый цикл соединения **217** располагается над плоскостью гема, а значение двугранного угла $\Theta_{C17\text{-}C2'}$ легко позволяет атому N оксазолинового цикла войти в координационную сферу Fe гема.

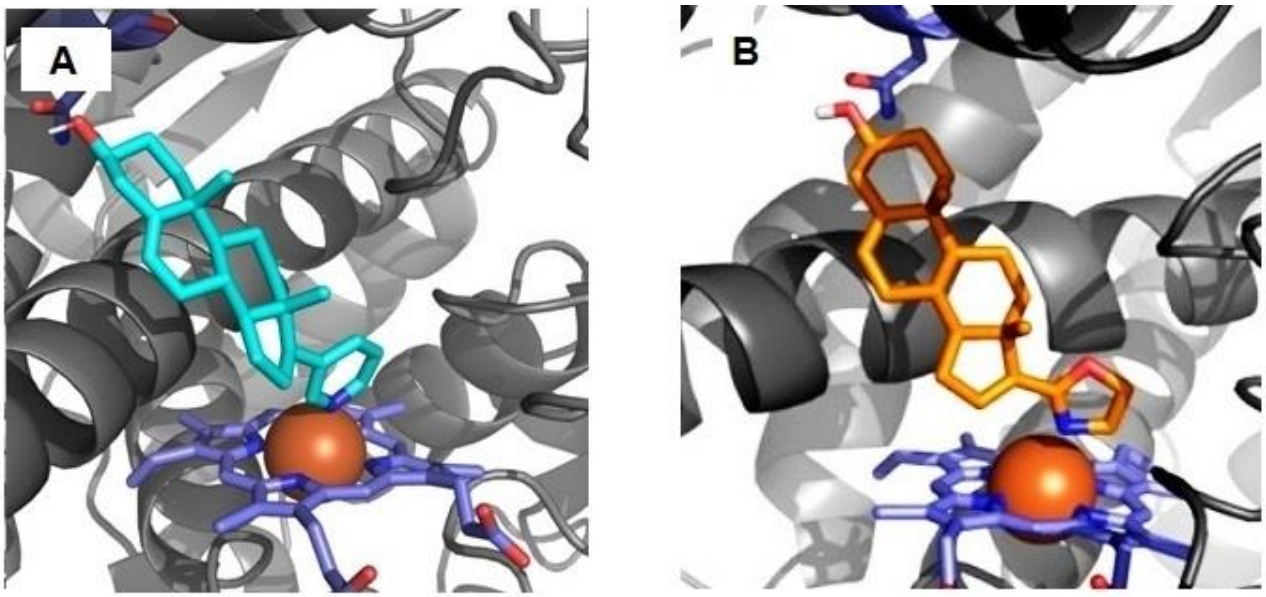


Рисунок 7. *Модели комплексов CYP17A1-абиратерон **1** (A) и CYP17A1 - оксазолин **217** (B), построенные методом молекулярного докинга*

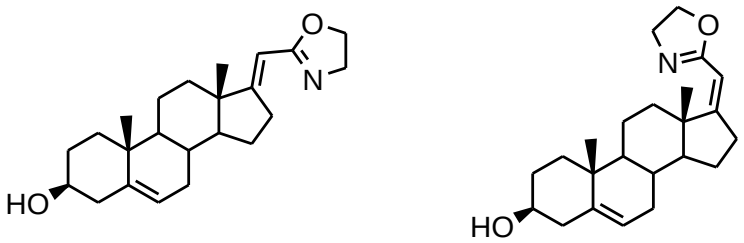
ТАБЛИЦА 2
ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕКСОВ CYP17A1 С СОЕДИНЕНИЕМ 217 И АБИРАТЕРОНОМ, РАССЧИТАННЫЕ ИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОКИНГА

Соединение	Оценочная функция (AutoDock Vina, ккал /моль)	Значение двугранного угла $\Theta_{C17\text{-}C2'}$ в комплексе (º)	Расстояние между N3' и Fe(III) гема, (Å)	Расстояние между 3βOH- и атомом O карбоксамидной группы Asn202 (Å)
217	**-10.2**	**13.2**	**3.1**	**3.0**
Абиратерон 1	**-11.3**	**39.6**	**2.0**	**2.8**

Построение модели фермент-ингибиторного комплекса для оксазолинового производного [17(20)*E*]-21-норпрегнена **190** методом молекулярного докинга привело к неожиданным результатам. Оказалось, что оксазолин **190** (имеющий *E*-конфигурацию 17(20)-двойной связи) по данным докинга не может связаться в активном центре CYP17A1 несмотря на то, что экспериментальные данные [*Kuzikov, 2014, Kostin, 2016*] указывали на такое связывание.

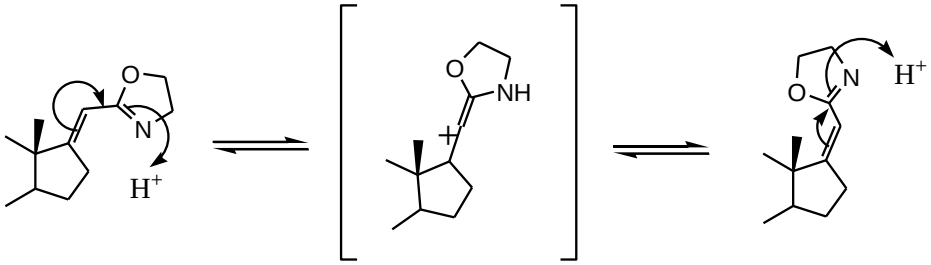
Чтобы объяснить это противоречие мы предположили, что при связывании оксазолина **190** в активном центре возможно его превращение в соответствующий виртуальный изомер – 2'-{[(*Z*)-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол **190a** (рис. 8.), способный образовать комплекс с ферментом.

Формально, интерконверсия 17(20)*E*- и 17(20)*Z*- оксазолинов может проходить через обратимое протонирование азота оксазолинового цикла (по схеме, рис. 9) при условии, что энергетически менее выгодный 17(20)*Z*-изомер при связывании в активном центре стабилизируется за счет взаимодействия с белком и гемом.



190 **190a**

Рисунок 8. *Структуры изомерных оксазолинов **190** и **190a***



E-изомер *Z*-изомер

Рисунок 9. *Возможная схема кислотно-катализируемой интерконверсии оксазолинов **190** и **190a***

Докинг соединения **190a** в активный центр CYP17A1 представлен на рисунке 10B.

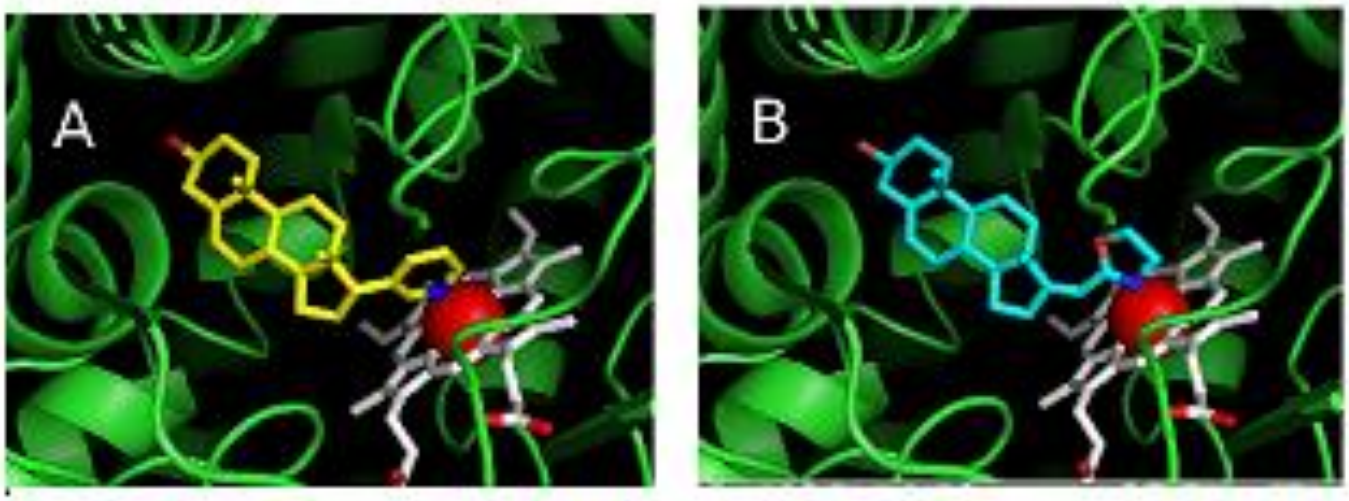


Рисунок 10. *Модели комплексов CYP17A1 - абиратерон **1** (A) и CYP17A1 - **190a** (B), построенные методом молекулярного докинга*

В литературе отсутствуют данные об оксазолиновых производных [17(20)*Z*]-21-норпрегнена; расчет значений полной энергии для изомеров **190** и **190a** (проведенный с использованием силового поля Tripos) дал значения полной энергии для этих изомеров 13.1 и 16.6 ккал/моль, соответственно. Это различие в значениях полной энергии указывает на абсолютное преобладание 17(20)*E*-изомера (в условиях равновесной интерконверсии изомеров содержание 17(20)*Z*-изомера **190a** не превышает 0.3% при 300 K).

Однако, модель комплекса 17(20)*E*-изомера **190** с CYP17A1 может быть построена методом равновесной молекулярной динамики. В этой модели молекула ингибитора **190** не может располагаться в активном центре фермента таким образом, чтобы образовать

координационную связь между атомом N и оксазолинового цикла и атомом Fe гема, вытесняя молекулу воды из координационной сферы (как для абиратерона и оксазолина **217**). Напротив, результаты моделирования методом молекулярной динамики показывают, что тройной комплекс CYP17A1-**190**-H_2O (рис. 11B) должен быть весьма стабилен. Стабильность этого комплекса обеспечивается дополнительными водородными связями между молекулой воды, атомом N оксазолинового цикла (среднее расстояние 2.88 Å) и гидроксильной группой остатка Thr-306 (среднее расстояние 2.82 Å).

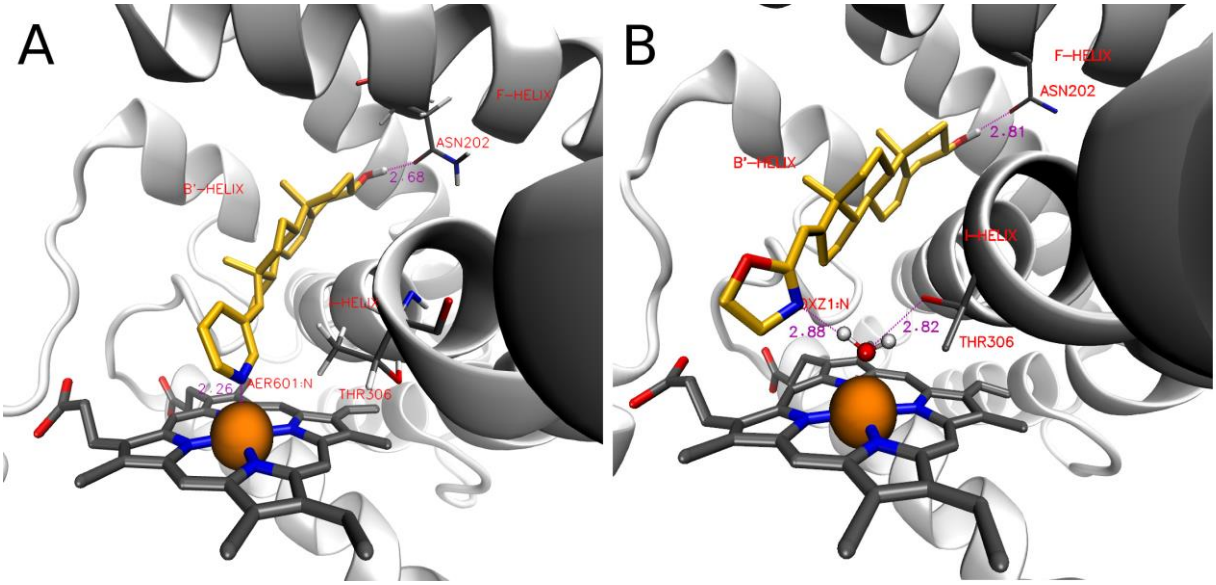


Рисунок 11. *Модели комплексов CYP17A1-абиратерон **1** (A) и CYP17A1-**190**-H_2O (B) построенные методом молекулярной динамики.*

Связывание атома N оксазолиновой группы с атомом Fe гема через молекулу воды объясняет наблюдаемый в оптических спектрах комплекса CYP17A1 с оксазолином **190** меньший сдвиг полосы Соре по сравнению с абиратероном.

Таким образом, для фермент-ингибиторного комплекса CYP17A1 с оксазолином **190** мы получили две альтернативные модели. Первая модель (рис. 10B) предусматривает превращение 17(20)*E*-изомера **190** в 17(20)*Z*-изомер **190a** в активном центре фермента, происходящее при связывании лиганда. Вторая модель (рис. 11B) предусматривает образование фермент-ингибиторного комплекса, в стабилизации которого участвует молекула воды. В этих моделях фермент-ингибиторного комплекса взаимное расположение атомов N оксазолинового цикла и Fe гема должно существенно различаться. Кроме того, разумно полагать, что в комплексе оксазолин **190a** - CYP17A1 (рис. 10B, в котором лиганд имеет 17(20)*Z*-конфигурацию) взаимное расположение атомов N оксазолинового цикла и Fe гема должно быть близким к таковому для комплекса оксазолин **217** – CYP17A1 (рис 7B).

3. Сравнение эффектов оксазолинов 190, 217 и абиратерона 1 на жизнеспособность и апоптоз клеток карциномы простаты

Известно, что стероидные ингибиторы CYP17A1, в частности абиратерон, способны подавлять рост и пролиферацию клеток карциномы простаты независимо от их влияния на активность ферментов стероидогенеза и AR-зависимых регуляторных путей, а оказывая влияние на сигнальные пути клетки, ответственные за апоптоз и

онкогенез. Чтобы получить информацию о молекулярных механизмах, лежащих в основе антипролиферативных эффектов оксазолинов **190** и **217**, мы предприняли сравнительное исследование влияния этих соединений и абиратерона **1** на жизнеспособность и апоптоз в клетках карциномы простаты.

Известно, что абиратерон слабо подавляет рост и пролиферацию клеток LNCaP и PC-3 при 24 ч инкубации, но при продолжительной (96-часовой или 120-часовой) инкубации оказывает значительный антипролиферативный эффект [*Grossebrummel, 2016*]. Способность оксазолинов **190** и **217** подавлять пролиферацию клеток LNCaP, PC-3, DU-145 и 22Rv1 (по данным MTT теста) также увеличивалась при увеличении времени инкубации.

Мы анализировали жизнеспособность и апоптоз в клетках карциномы простаты PC-3 после 72-х часовой инкубации с оксазолинами **190**, **217** и абиратероном **1** в концентрации 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ и 40 мкМ. После инкубации клетки прокрашивали FITC-меченым аннексином V (связывающимся с фосфатидилсерином, транслоцирующимся при апоптозе на внешней поверхности клеточной мембраны) и пропидиум йодидом (PI, взаимодействующим с фрагментами ДНК), что позволяет оценивать содержание клеток в апоптозе и клеток с фрагментированной ДНК. После обработки реагентами, клетки анализировали методом проточной цитофлуориметри на приборе “MACS Quant Analyzer 10”. Результаты представлены на рисунках 12 и 13.

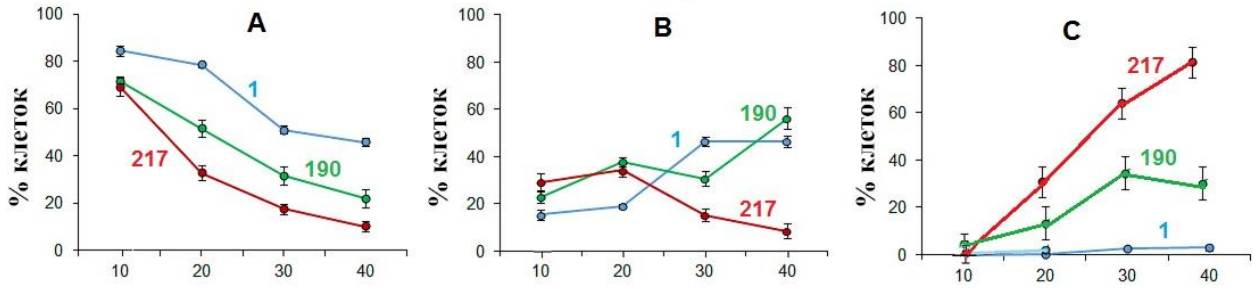


Рисунок 12. *Содержание живых (A), апоптотических (B) и мертвых (C) клеток PC-3, инкубированных с соединениями **1**, **190** и **217** в различных концентрациях*

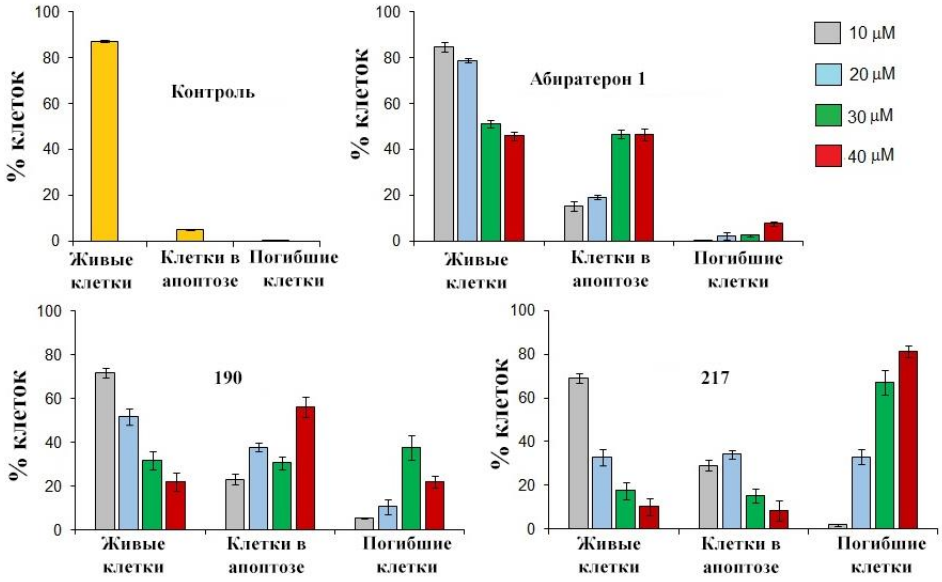


Рисунок 13. *Гистограммы живых, апоптотических и погибших клеток PC-3, инкубированных с соединениями **1**, **190** и **217***

Оксазолины **190**, **217** и абиратерон **1** проявляли дозо-зависимую цитотоксическую активность. Содержание живых клеток (рис. 12A) и клеток с фрагментированной ДНК (рис.12C) доказывает, что цитотоксичность оксазолинов **217** и **190** значительно превышает цитотоксичность абиратерона **1**, причем цитотоксичность соединения **217** достоверно превышает цитотоксичность соединения **190**. Оксазолины **190**, **217** и абиратерон **1** стимулировали апоптоз в клетках PC-3, причем в концентрациях 10 мкМ и 20 мкМ про-апоптотическая активность соединений **190** и **217** была достоверно выше, чем активность абиратерона **1** (рис. 12B). Инкубация клеток с оксазолином **217** в концентрациях 30 мкМ и 40 мкМ приводила к снижению содержания апоптотических клеток и повышению содержания клеток с фрагментированной ДНК.

На рисунке 13 представлены гистограммы, характеризующие содержание живых, апоптотических и мертвых клеток в препаратах контрольных PC-3 клеток и тех же клеток, инкубированных 72 ч с соединениями **1**, **190** и **217** в различных концентрациях. Можно отметить, что содержание апоптотических клеток в препарате клеток инкубированных с оксазолином **217** в высоких концентрациях было существенно ниже, а мертвых клеток существенно выше, чем в препаратах клеток, инкубированных с оксазолином **190**, что может указывать на различия в механизмах проапоптотического и цитотоксического действия этих соединений.

Мы также сравнивали проапоптотические эффекты оксазолина **190** и абиратерона **1** в гормон-независимых клетках карциномы простаты DU-145 при краткосрочной (24 ч инкубации). В этих условиях цитотоксический эффект соединений **1** и **190** (по данным МТТ-теста) был незначителен, что позволило нам проводить инкубацию с высокими концентрациями (60 мкМ) исследуемых соединений. Мы сравнили влияние соединений **1** и **190** на активность каспаз 3 и 7, на активацию сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt и на экспрессию белка Bcl-2 и его фосфорилированной формы Bcl-2-p методом проточной цитофлуориметрии на приборе Muse (Millipore).

Каспазы – цистеиновые протеиназы, играющие ключевую роль в апоптозе. Каспазы 3 и 7 относятся к т.н. эффекторным (экзекуторным) каспазам, разрушающим при апоптозе более 600 клеточных компонентов. Сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt отвечают за связь экстрацеллюлярных сигналов с внутриклеточными механизмами, обеспечивающими рост, пролиферацию, ангиогенез и апоптоз. Bcl-2 – белок, регулирующий апоптоз посредством влияния на активность многих сигнальных белков, вовлеченных в регуляторные каскады. Повышенная экспрессия Bcl-2 усиливает устойчивость клетки к апоптозу, а инактивация, осуществляемая фосфорилированием этого белка – к стимулированию апоптоза.

Влияние оксазолина **190** и абиратерона **1** на активность каспаз 3/7 мы оценивали с использованием стандартного набора Muse™ Caspase-3/7 Assay, позволяющего определять активность каспаз в клетках, находящихся в разных стадиях апоптоза. Метод основан на использовании реагента, специфически расщепляемого этими каспазами. Под действием каспаз реагент гидролизуется с образованием продукта, связывающегося с ДНК с образованием флуоресцирующего комплекса. Результаты представлены на рисунке 14.

Оксазолин **190** и абиратерон **1** увеличивали активность каспаз 3/7 (37 ± 0.4%, $p < 0.001$ для оксазолина **190**; 34 ± 0.1%, $p < 0.001$ для абиратерона **1**; 13 ± 0.7% для контрольных клеток). Хотя влияние оксазолина **190** и абиратерона **1** на активность каспаз 3/7 было практически одинаковым, в присутствии оксазолина **190** клетки гибли быстрее, чем в присутствии абиратерона – соответствующее содержание погибших клеток различалось в два раза.

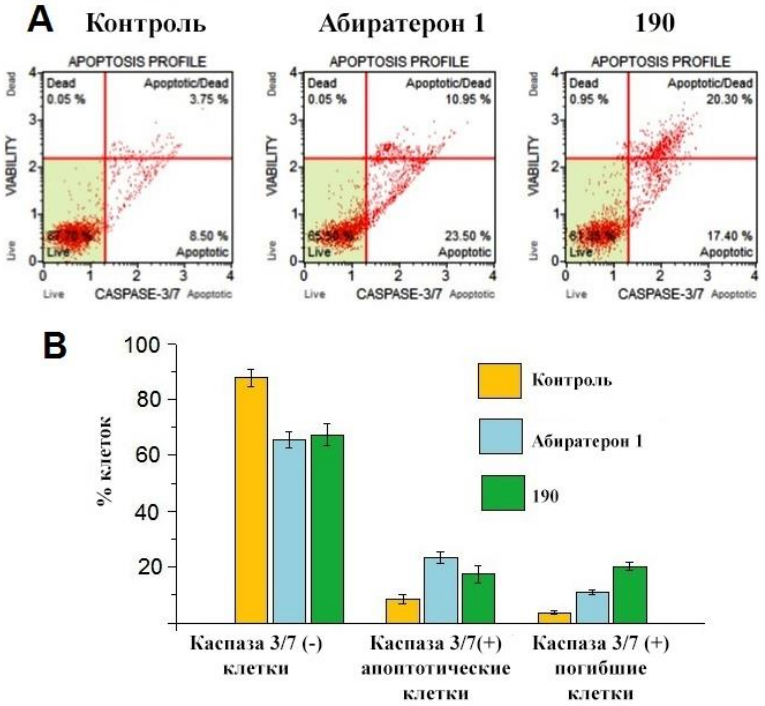


Рисунок 14. *Влияние абиратерона **1** и оксазолина **190** на активацию каспаз 3 и 7 в клетках DU-145. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями **1** и **190***

Влияние оксазолина **190** и абиратерона **1** на активацию MAPK- и PI3K/Akt-сигнальных путей мы оценивали с использованием стандартного набора Muse™ PI3K/MAPK Dual Pathway Activation Kit, позволяющего одновременно оценивать активность этих путей в тестируемых клетках. Метод основан на использовании флуоресцентно-меченых антител к фосфорилированой Akt и фосфорилированой ERK1/2. Результаты представлены на рисунке 15.

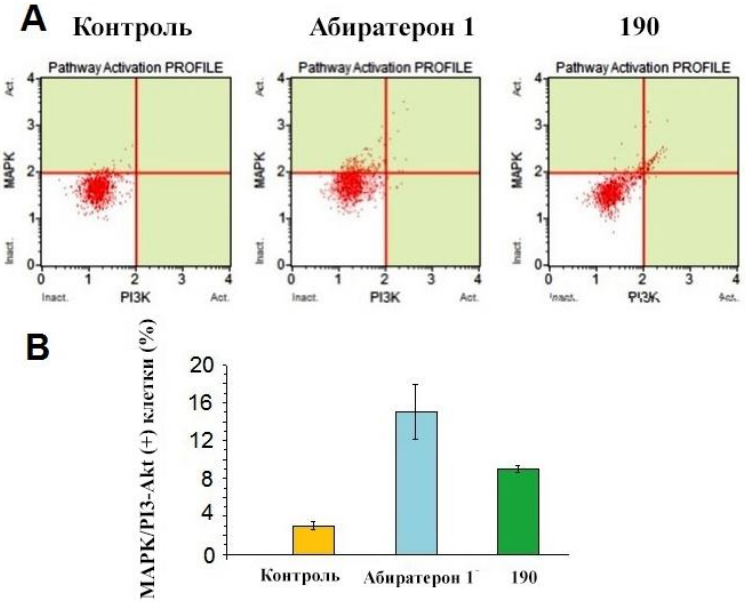


Рисунок 15. *Влияние абиратерона **1** и оксазолина **190** на активацию сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt в клетках DU-145. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями **1** и **190***

Оксазолин **190** и абиратерон **1** увеличивали содержание MAPK/PI3-Akt-положительных клеток (в контроле их содержание составляло 3 ± 0.4%, (p =); в клетках, инкубированных с абиратероном **1** – 15 ± 0.4%; в клетках, инкубированных с оксазолином **190** – 9 ± 0.4%). Эффект абиратерона **1** был достоверно выше, чем эффект оксазолина **190**, однако из рисунка 15 видно, что в присутствии абиратерона активируется только MAPK, а в присутствии оксазолина **190** активируется и MAPK и PI3-Akt.

Влияние оксазолина **190** и абиратерона **1** на экспрессию Bcl-2 мы оценивали при помощи стандартного набора Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit, позволяющего определять содержание Bcl-2 и фосфорилированного Bcl-2 по реакции со специфичными флуоресцентно-меченными антителами. Результаты представлены на рисунке 16.

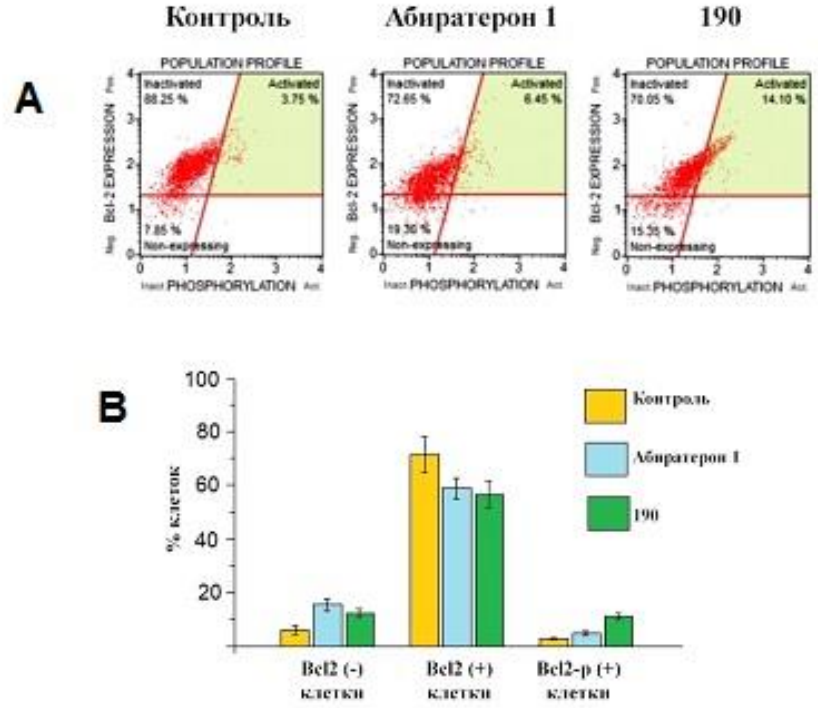


Рисунок 16. *Влияние абиратерона **1** и оксазолина **190** на содержание Bcl-2-отрицательных, Bcl-2-положительных и Bcl-2-p-положительных DU-145 клеток. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями **1** и **190***

Оксазолин **190** и абиратерон **1** незначительно снижали содержание Bcl-2-положительных клеток (в контроле их содержание составляло 93 ± 1.1%, (p=0.009); в клетках, инкубированных с абиратероном **1** – 80 ± 1.0% (p=0.007); в клетках, инкубированных с оксазолином **190** – 85 ± 0.9%, (p=0.018). При этом в присутствии абиратерона **1** и оксазолина **190** достоверно увеличивалось количество клеток, содержащих фосфорилированный Bcl-2. Оксазолин **190** увеличивал содержание фосфорилированного Bcl-2 сильнее, чем абиратерон (рис. 16).

Полученные результаты свидетельствуют, что оксазолины **190** и **217** эффективно подавляют рост и пролиферацию клеток карциномы простаты, стимулируя апоптоз и вызывая фрагментацию ДНК. Проапоптотическая и цитотоксическая активность оксазолинов **190** и **217** существенно превосходит таковые для абиратерона.

4. Сравнение оксазолина 190 и абиратерона 1 в экспериментах *in vivo*.

В данном разделе приведены результаты экспериментов *in vivo,* в которых проводилось прямое сравнение фармакокинетических характеристик оксазолина **190** и абиратерона **1** при пероральном введении, а также эффектов оксазолина **190** и абиратерона **1** на уровень тестостерона и рост привитой опухоли (ксенографта) у мышей.

Плохая растворимость абиратерона в водной среде и его низкая биодоступность – существенные недостатки, ограничивающие применение этого препарата. Лекарственной формой абиратерона является его 3β-ацетильное производное – “Zytiga”, обладающее улучшенными фармакокинетическими характеристиками и более высокой биодоступностью. Сравнение фармакокинетических характеристик оксазолина **190** и абиратерона **1** при пероральном введении мы проводили в экспериментах на самцах мышей линии C57BL/6.

Мыши (разделенные на группы по 3 особи) получили оксазолин **190** и абиратерон **1** перорально в разовой дозе 100 мг/кг; образцы крови из ярёмной вены забирали через определенные промежутки времени; после центрифугирования плазму экстрагировали; экстракты высушивали и анализировали ВЭЖХ. Содержание оксазолина **190** и абиратерона **1** в образцах измеряли с использованием калибровочной зависимости. Результаты представленные на рисунке 17 свидетельствуют, что биодоступность оксазолина **190** превышает биодоступность абиратерона более, чем в 20 раз.

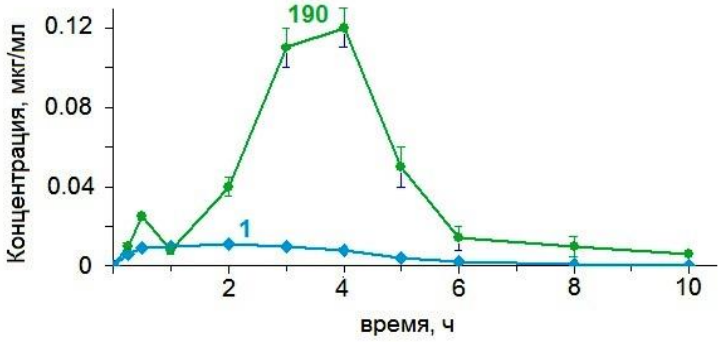


Рисунок 17. *Содержание абиратерона **1** и оксазолина **190** в плазме крови мышей C57BL/6*

Мы сравнили эффекты оксазолина **190** и абиратерона **1** на уровень тестостерона у мышей. Самцы мышей линии C57BL/6 (разделенные на группы по 5 особей) получали окзазолин **190** и абиратерон **1** (перорально, 100 мг/кг, 1 раз в сутки, в течение 10 суток); образцы крови из ярёмной вены забирали спустя 24 ч после 1-го, 4-го, 7-го и 10-го введения; уровень тестостерона определяли при помощи стандартного набора “Testosterone ELISA Kit” (ab108666, Abcam) по протоколу фирмы-изготовителя. Оксазолин **190** и абиратерон **1** достоверно снижали уровень тестостерона; содержание тестостерона в образцах плазмы крови контрольных мышей и мышей, получавших оксазолин **190** и абиратерон **1** в течение 10 дней, показано на рисунке 18.

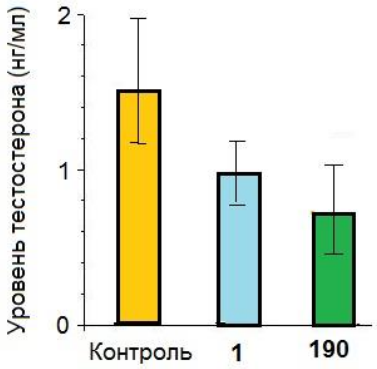


Рисунок 18. *Влияние абиратерона **1** и оксазолина **190** на уровень тестостерона в плазме крови мышей C57BL/6*

Противоопухолевые эффекты оксазолина **190** и абиратерона **1** мы сравнивали в экспериментах на ксенографтах, полученных подкожным введением клеток карциномы простаты человека DU-145 (AR-негативных) и 22Rv1 (экспрессирующих множественные варианты AR) мышам линии Balb/c nude, разделенные на группы по 6-10 животных. После того, как размер опухоли достигал 80 мм^3, животные получали абиратерон **1** (150 или 300 мг/кг, *per os*, 1 раз в день, в течение 10 дней) или оксазолин **190** (150 или 300 мг/кг, *per os*, 1 раз в день, в течение 10 дней). Размер опухоли измеряли на 3-й, 7-й, 10-й день эксперимента и на 3-й день после окончания эксперимента. Размеры опухолей в контрольных группах на 3-й день после окончания эксперимента составляли 242 ± 94 мм^3 и 688 ± 130 мм^3 для DU-145- и 22Rv1- ксенографтов, соответственно.

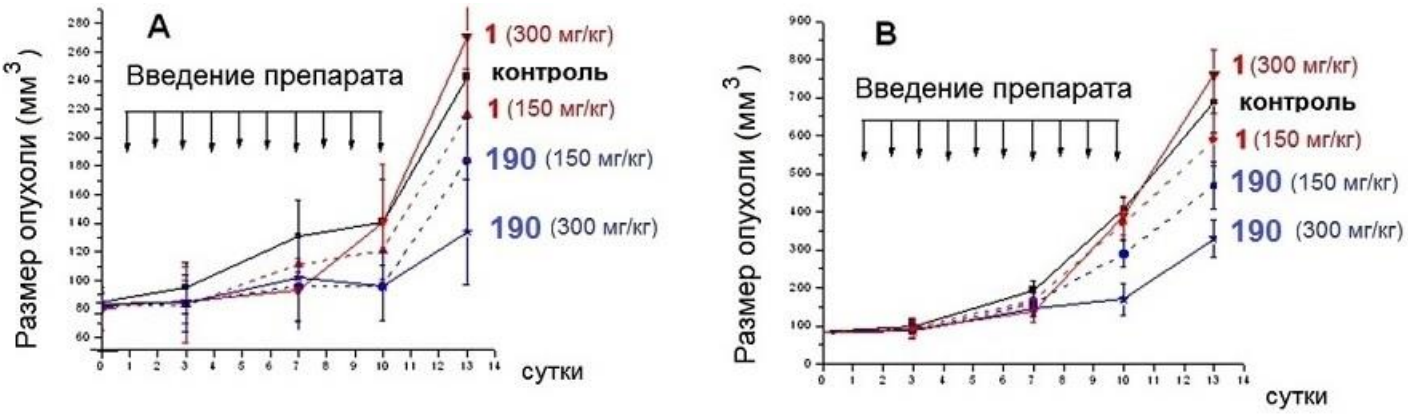


Рисунок 19. *Влияние абиратерона **1** и оксазолина **190** на рост привитой опухоли у мышей Balb/c nude: A – DU-145-ксенографты; B – 22Rv1-ксенографты*

В DU-145-ксенографтах оксазолин **190** (в дозе 300 мг/кг) достоверно подавлял рост опухоли – на 3-й день после окончания эксперимента размер опухоли составлял 133 ± 50 мм^3, TGI = 45%. В дозе 150 мг/кг оксазолин **190** также снижал размер опухоли – на 3-й день после окончания эксперимента размер опухоли составлял 183 ± 70 мм^3, TGI = 24%, однако эффект не был статистически достоверным (рис. 19A). В 22Rv1-ксенографтах оксазолин **190** (в дозах 150 мг/кг и 300 мг/кг) подавлял рост опухоли – на 3-й день после окончания эксперимента размер опухоли составлял 460 ± 50 мм^3 и 330 ± 60 мм^3 (TGI = 33% и 52%) для доз 150 мг/кг и 300 мг/кг, соответственно (рис. 19B). В наших экспериментах абиратерон **1** не влиял на рост опухоли.

Приведенные данные свидетельствуют, что оксазолин **190** характеризуется гораздо более высокой биодоступностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с абиратероном; что оксазолин **190** не менее эффективно снижал уровень тестостерона у мышей при пероральном введении, чем абиратерон; что оксазолин **190** (в отличие от абиратерона) подавлял рост привитой опухоли у мышей (в модели ксенографтов DU-145- и 22Rv1-клеток).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена исследованию биологической активности и оценке фармакологического потенциала новых азотсодержащих стероидных производных, представляющих интерес в качестве потенциальных противораковых агентов.

В первом разделе работы был проведен первичный скрининг анти-пролиферативной активности серии производных андростана и прегнана, модифицированных азотсодержащими гетероциклами в кольце D и различающихся структурой стероидного фрагмента. Для исследованных соединений была установлена корреляция структура – антипролиферативная активность. В результате для дальнейших исследований были выбраны два наиболее перспективных кандидата – 2'-{[*(E)*-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол **190** и 2′-(3β-гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4′,5′-дигидро-1′,3′-оксазол **217,** проявляющих высокую антипролиферативную активность. В отличие от известных азотсодержащих стероидных гибридов, соединения **190** и **217** содержали неароматический оксазолиновый цикл, что обеспечивало более высокую основность атома азота и более высокую полярность соединения. Следует отметить, что соединения **190** и **217** были получены в лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ИБМХ по оригинальным схемам, позволяющим эффективно проводить препаративный синтез целевых стероидных производных.

Во втором разделе работы было установлено, что оксазолины **190** и **217** ингибируют активность CYP17A1 не менее эффективно, чем абиратерон, а аналоги соединения **217**, содержащие заместители в оксазолиновом цикле являются слабыми ингибиторами CYP17A1. Анализ моделей фермент-ингибиторных комплексов, построенных методами молекулярного докинга и молекулярной динамики, показал существенные различия в структуре комплексов CYP17A1-**190** и CYP17A1-**217**.

В третьем разделе работы приведены данные проточной цитофлуориметрии гормон-независимых клеток карциномы PC-3 и DU-145, инкубированных с оксазолинами **190**, **217** и абиратероном **1** в различных условиях. В клетках PC-3 при 72-ч инкубации все исследованные соединения индуцировали апоптоз, а цитотоксичность соединений убывала в **217** > **190** > **1**. В клетках DU-145 при 24-ч инкубации оксазолин **190** стимулировал апоптоз эффективнее, чем абиратерон **1**, активируя каспазы 3/7 и сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt, стимулируя фосфорилирование Bcl-2 и вызывая фрагментацию ДНК. Результаты свидетельствуют о значительных проапоптотических эффектах оксазолинов **190** и **217**.

В четвертом разделе работы в экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что оксазолин **190** обладает гораздо более высокой биодоступностью и улучшенными фармакокинетическими характеристиками по сравнению с абиратероном; что оксазолин **190** при пероральном введении снижает уровень тестостерона у мышей C57BL/6 и

подавляет рост ксенографтов у мышей Balb/c nude в опытах, где абиратерон был неэффективен.

Полученные в работе результаты показали высокий фармакологический потенциал оксазолинов **190** и **217** и продемонстрировали, что оксазолины **190** и **217** являются перспективными кандидатами для разработки на их основе новых противораковых препаратов. Кроме того, одной из быстро развивающихся тенденций современной медицинской химии является дизайн новых противораковых агентов на основе бифункциональных стероидных гибридов. Примерами такого подхода являются новые противораковые агенты, полученные оптимизацией структур галетерона и абиратерона [*Purushottamachar, 2013, 2016; Wang, 2022*]. Можно полагать, что оптимизация структуры оксазолин-содержащих стероидных производных также может привести к созданию новых противораковых агентов.

ВЫВОДЫ

1) Исследована антипролиферативная активность 38 новых азотсодержащих стероидных производных в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3; в ряду вышеуказанных соединений установлена корреляция структура–антипролиферативная активность и выявлены перспективные кандидаты для разработки новых противоопухолевых агентов – 2’-{[(*E*)-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4’,5’-дигидро-1’,3’-оксазол (**190**) и 2′-(3β-гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4′,5′-дигидро-1′,3′- оксазол (**217**)
2) Оксазолины **190** и **217** эффективно ингибировали активность ключевого фермента биосинтеза андрогенов – 17α-гидроксилазы/17,20-лиазы (CYP17A1); анализ моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов, построенных методами молекулярного докинга и молекулярной динамики, показал существенные различия в структуре комплексов CYP17A1-**190** и CYP17A1-**217**.
3) В клетках карциномы простаты оксазолины **190** и **217** индуцировали апоптоз увеличивая содержание Аннексин V-положительных клеток, активируя каспазы 3/7, стимулируя фосфорилирование Bcl-2 и вызывая фрагментацию ДНК. Проапоптотическая активность оксазолинов **190** и **217** превышала таковую для абиратерона.
4) В опытах *in vivo* оксазолин **190** обладал более высокой биодоступностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с абиратероном; оксазолин **190** снижал уровень тестостерона у мышей C57BL/6 и подавлял рост DU-145- и 22Rv1-ксенографтов более эффективно, чем абиратерон.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Zolottsev V.A. Comparison of [17(20)*E*]-21-norpregnene oxazolinyl and benzoxazolyl derivatives as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells growth / Zolottsev V. A., Tkachev Y.V., **Latysheva A.S.**, Kostin V.A., Novikov R.A., Timofeev V.P., Morozevich G.E., Kuzikov A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. // *Steroids* – 2018 – V. 129 – P. 24-34.

2. а) Костин В.А. Оксазолиновые производные [17(20)*E*]-21-норпрегнена – ингибиторы активности CYP17A1 и пролиферации клеток карциномы простаты / Костин В.А., **Латышева А.С.**, Золотцев В.А., Ткачев Я.В., Тимофеев В.П.,

Кузиков А.В., Шумянцева В.В., Морозевич Г.Е., Мишарин А.Ю. // *Известия Академии наук. Серия химическая* – 2018 – Т. 67 – №4, С. 682-687.

б) Kostin V.A. Oxazoline derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene - inhibitors of CYP17A1 activity and proliferation of prostate carcinoma cells /Kostin V.A., Latysheva A.S., Zolottsev V.A., Tkachev Ya.V., Timofeev V.P., Kuzikov A.V., Shumyantseva V.V., Morozevich G.E., Misharin A.Yu.// Russian Chemical Bulletin, 2018, 67(4), 682-687

3. **Латышева А.С.** Стероидные ингибиторы CYP17A1 – платформа для разработки новых противоопухолевых агентов / **Латышева А.С.**, Мишарин А.Ю // Biomedical Chemistry: Research and Methods – 2018 – Т. 64 – №2, e0020.
4. Dalidovich T.S. et al. New azole derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene: synthesis and inhibition of prostate carcinoma cell growth / Dalidovich T.S., Hurski A.L., Morozevich G.E**.,** **Latysheva A.S.**, Sushko T.A., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Misharin A.Y., Zhabinskii V.N., Khripach V.A. // *Steroids* – 2019 – V. 147 – P. 10-18
5. **Latysheva A.S**. New steroidal oxazolines, benzoxazoles and benzimidazoles related to abiraterone and galeterone / **Latysheva A.S**., Zolottsev V.A., Veselovsky A.V., Scherbakov K.A., Morozevich G.E., Pokrovsky V.S., Novikov R.A., Timofeev V.P., Tkachev Y.V., Misharin A.Y. // *Steroids* – 2020 – V. 153 – P. 108534
6. Pokrovsky V.S. Alsevirone-NF Reduces Serum Testosterone and Inhibits Prostate Cancer Xenograft Growth in Balb/c Nude Mice / Pokrovsky V.S., Zolottsev V.A., **Latysheva A.S.**, Kudinov V.A., Anisimova N.Yu., Almanza R.L.M., Alekseeva O.Yu., Baskaev K.K., Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Ipatova O.M. // *Clinical Cancer Drugs* – 2020 – V. 7 – P. 1-6
7. Zolottsev V.A. Promising applications of steroid conjugates for cancer research and treatment / Zolottsev V.A., **Latysheva A.S**., Pokrovsky V.S., Khan I.I., Misharin A.Y. // *European Journal of Medicinal Chemistry* – 2021 – V. 210 – P.113089
8. **Latysheva A.S**. Novel nitrogen containing steroid derivatives for prostate cancer treatment / **Latysheva A.S**., Zolottsev V.A., Pokrovsky V.S., Khan I.I., Misharin A.Yu. // *Current Medicinal Chemistry* – 2021 – V. 28 – P. 8416-8432
9. Khan I.I. Antiproliferative, proapoptotic, and tumor-suppressing effects of the novel anticancer agent alsevirone in prostate cancer cells and xenografts / Khan I.I., Karshieva S.S., Sokolova D.V., Spirina T.S., Zolottsev V.A., **Latyshev**a **A.S.**, Anisimova N.Y., Komarova M.V., Yakunina M.N., Nitetskaya T.A., Misharin A.Y., Pokrovsky V.S. // *Archiv der Pharmazie* – 2021 – V. 355, e2100316
10. Zolottsev V.A. Design and Synthesis of New Agents for Prostate Cancer Treatment Inspired by Steroidal CYP17 A1 Inhibitors/ Zolottsev V.A., **Latysheva A.S**., Khan I.I., Pokrovsky V.S., Misharin A.Y. // *ChemistrySelect* – 2022 – V. 7, e202203393
11. **Latysheva A.S.** Oxazolinyl derivatives of androst-16-ene as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells proliferation: effects of substituents in oxazolinyl moiety / **Latysheva A.S.**, Zolottsev V.A., Veselovsky, A.V., Scherbakov K.A., Morozevich G.E., Zhdanov D.D, Novikov R.A., Misharin A.Y. *// The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2023 – V. 230 – P. 106280
12. а) Золотцев В.А. и др. Синтез азотсодержащих производных 17(20)-прегненовой, 17α-гидроксипрегнановой и 17β-гидроксипрегнановой кислот – новых

потенциальных антиандрогенов / Золотцев В.А., Костин В.А., Новиков Р.А., Ткачев Я.В., Завьялова М.Г., Таратынова М.О., **Латышева А.С.**, Зазулина О.В., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю. // *Известия Академии наук. Серия химическая* – 2018 – Т. 67 – №4, С. 667-681.

б) Zolottsev V.A. Synthesis of nitrogen-containing derivatives of 17(20)-pregnenoic, 17 beta-hydroxypregnanoic, and 17 alpha-hydroxypregnanoic acids as new potential antiandrogens /Zolottsev V.A., Kostin V.A., Novikov R.A., Tkachev Ya.V., Zavialova M.G., Taratynova M.O., Latysheva A.S., Zazulina O.V., Timofeev V.P., Misharin A.Yu.//Russian Chemical Bulletin, 2018, 67(4), 667-681.

13. Золотцев В.А. Стероидные конъюгаты как потенциальные противоопухолевые агенты / Золотцев В.А., **Латышева А.С,** Покровский В.С., Хан И.И., Алманза Р.Л.М., Мишарин А.Ю. // *Российский биотерапевтический журнал* – 2020 – Т. 19 – №1, С. 22-52.
14. Pokrovsky V.S. Cytotoxic and apoptotic effects of new CYP17A1 inhibitor in prostate cancer cell lines/ Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu. Sokolova D.V., Zolottsev V.A., **Latysheva A.S.**, Khan I.I., Misharin A.Yu. // *European Urology Suppliments* – **2019** – V. 18, e3103.

Работы, опубликованные в сборниках материалов научных конференций:

15. Костин В.А., **Латышева А.С.**, Золотцев В.А., Щербинин Д.С., Кузиков А.В., Мишарин А.Ю., Синтез и биологическая активность новых азотсодержащих производных [17(20)E]-прегнена // *Всероссийская молодежная конференция «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений». Сборник докладов.* г. Уфа. 16 ноября – 19 ноября 2016 – С. 106
16. Костин В.А. Синтез азотсодержащих производных [17(20)E]-прегнена, различающихся структурой стероидного фрагмента / Костин В.А., Золотцев В.А., **Латышева А.С.**, Николаев Д.И., Завьялова М.Г., Новиков Р.А., Мишарин А.Ю. // *Кластер конференций по органической химии "ОргХим-2016". Сборник тезисов докладов.* г. Санкт-Петербург. 27 июня – 1 июля 2016 – С. 589
17. Костин В.А. Новые оксазолиновые производные [17(20)E]-21-норпрегнена как ингибиторы пролиферации клеток карциномы простаты / Костин В.А., **Латышева А.С.**, Золотцев В.А., Морозевич Г.Е., Кузиков А.В., Новиков Р.А., Ткачев Я.В., Мишарин А.Ю. // *Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике (МОБИ-ХИМФАРМА 2017). Сборник тезисов докладов.* г. Севастополь. 28 мая – 31 мая 2017 – С. 32
18. **Латышева А.С.** Оксазолиновые и бензоксазоловые производные [17(20)E]-21-норпрегнена – новые ингибиторы активности CYP17A1 и пролиферации клеток карциномы простаты / **Латышева А.С.**, Костин В.А., Золотцев В.А., Кузиков А.В. // *XIII Международная (XXII Всероссийская) Пироговская научная медицинской конференция студентов и молодых ученых. Сборник тезисов докладов.* г. Москва. 15 марта 2018 – С. 248
19. Dalidovich T.S. New azole derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene: synthesis and inhibition of prostate carcinoma cell growth / Dalidovich T.S., Gilep A.A., Hurski A.L., Khripach V.A., **Latysheva A.S.**, Misharin A.Y., Morozevich G.E., Strushkevich N.V.,

Sushko T.I., Zhabinskii V.N. // *24th Conference on Isoprenoids. Book of abstracts.* Białystok, Poland. – 9 September – 12 September, 2018 – P. 194

20. **Латышева А.С.** Подавление пролиферации клеток карциномы простаты новыми азотсодержащими производными прегнанового ряда. Корреляция структура – активность / **Латышева А.С.**, Костин В.А., Золотцев В.А., Морозевич Г.Е., Мишарин А.Ю. // *V Международная конференция "ПОСТГЕНОМ'2018" В ПОИСКАХ МОДЕЛЕЙ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ. Сборник научных трудов.* г. Казань. 29 октября – 2 ноября 2018 – С. 161

21. Золотцев В.А. Возможности традиционного синтеза в конструировании стероидных противораковых агентов/ Золотцев В.А., Костин В.А., **Латышева А.С.**, Новиков Р.А., Ткачев Я.В., Мишарин А.Ю. // *V Международная конференция "ПОСТГЕНОМ'2018" В ПОИСКАХ МОДЕЛЕЙ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ. Сборник научных трудов.* г. Казань. 29 октября – 2 ноября 2018 – С. 137

22. Масамрех Р.А. Взаимодействие противоопухолевых соединений – ингибиторов CYP17A1 – со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома Р450 / Масамрех Р.А., **Латышева А.С.**, Завьялова М.Г., Кузиков А.В // *Пятая Междисциплинарная конференция «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». Сборник тезисов.* г. Судак. 15 сентября – 18 сентября 2019 – С. 149

23. Pokrovsky V.S. Cytotoxic and apoptotic effects of new CYP17A1 inhibitor in prostate cancer cell lines / Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu., Sokolova D.V., Zolottsev V.A., **Latysheva A.S.**, Khan I.I., Misharin A.Yu. // *26th Meeting of the EAU Section of Urological Research. Book of Abstracts.* Porto, Portugal 10 October –12 October 2019 – P. 38

24. Хан И.И.**.** Оценка цитотоксической активности и противоопухолевого эффекта алсевирона — нового стероидного антиандрогена / Хан И.И., **Латышева А.С.**, // *VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019». Сборник тезисов конференции.* г. Санкт-Петербург. 4 декабря – 6 декабря 2019 – С. 98