

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

Латышева Александра Степановна

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

1.5.4. – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.х.н., д.б.н., профессор Мишарин А.Ю.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ.....	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
2.1. ВВЕДЕНИЕ.....	14
2.2. СТЕРОИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ СУР17A1 И СТЕРОИДОГЕНЕЗ	15
2.3. СТЕРОИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ СУР17A1 И AR СИГНАЛИНГ.....	22
2.4. ВЛИЯНИЕ АБИРАТЕРОНА, ГАЛЕТЕРОНА И ЕГО С-3 ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ.....	28
2.5. НАРУШЕНИЕ ПРОЧИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ КЛЕТКИ ПРИ РПЖ.....	33
2.6. НОВЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СТЕРОИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ	38
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
3. 1. МАТЕРИАЛЫ	48
3.1.1. Реактивы, растворители и стандартные соединения.....	48
3.1.2. Синтез оксазолинов 190 и 217	48
3.1.3. Синтез оксазолинов 223 – 227	50
3.2. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ	53
3.3. РАСЧЕТНЫЕ МЕТОДЫ	53
3.3.1. Молекулярный докинг.....	53
3.3.2. Молекулярная динамика	54
3.4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	55
3.5. ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СУР17A1 СОЕДИНЕНИЯМИ 1, 190, 217, 223 – 227 [146]	55
3.5.1. Получение микросом	55
3.5.2. Проведение анализа	56
3.6. ЭКСПЕРИМЕНТЫ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ.....	56
3.6.1. Клетки.....	56

3.6.2. Оценка антипролиферативной активности соединений 190 – 227 в клетках LNCaP и PC-3 методом МТТ [147].....	56
3.6.3. Оценка влияния соединений 190, 217 и абиратерона 1 на апоптоз в клетках карциномы простаты.....	57
3.7. ОПЫТЫ НА ЖИВОТНЫХ	58
3.7.1. Животные.....	58
3.7.2. Фармакокинетика оксазолина 190 и абиратерона при пероральном введении мышам	58
3.7.3. Влияние оксазолина 190 и абиратерона на уровень тестостерона у мышей	59
3.7.4. Влияние оксазолина 190 и абиратерона на рост ксенографтов клеток 22Rv1 и DU-145 у мышей Balb/c nude	59
3.8. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ	59
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	61
4.1. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СТЕРОИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ.....	61
4.1.1. Антипролиферативная активность новых азотсодержащих стероидных производных в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3	61
4.1.2. Корреляция структура – антипролиферативная активность в ряду новых азотсодержащих стероидных производных	67
4.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОКСАЗОЛИНОВ 190 И 217 С СУР17А1	71
4.2.1. Ингибирование активности СУР17А1 оксазолинами 190, 217, 223 – 227. 71	
4.2.2. Модели фермент-ингибиторных комплексов СУР17А1 с оксазолинами 190, 217, 223 – 227.....	74
4.3. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ОКСАЗОЛИНОВ 190, 217 И АБИРАТЕРОНА 1 НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И АПОПТОЗ AR-НЕЗАВИСИМЫХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ.....	81
4.3.1. Влияние оксазолинов 190, 217 и абиратерона 1 на жизнеспособность и апоптоз клеток PC-3 при 72 ч инкубации.....	82

4.3.2. Сравнение про-апоптотических эффектов оксазолина 190 и абиратерона 1 в клетках DU-145 при 24 ч инкубации.....	85
4.4. СРАВНЕНИЕ ОКСАЗОЛИНА 190 И АБИРАТЕРОНА 1 В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO	90
4.4.1. Фармакокинетика оксазолина 190 и абиратерона 1 при пероральном введении мышам C57BL/6	90
4.3.2. Влияние оксазолина 190 и абиратерона 1 на уровень тестостерона в плазме крови мышей C57BL/6.....	91
4.3.3. Влияние оксазолина 190 и абиратерона 1 на рост привитой опухоли у мышей.....	92
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 5 α -/5 β -SR – 5 α -/5 β -стероид редуктаза;
- AR – андрогеновый рецептор;
- ARDA – агенты, деградирующие андрогеновый рецептор;
- ARE – андрогенчувствительный элемент;
- ATF2 – активирующий транскрипционный фактор 2;
- BMP – костный морфогенетический белок;
- BSA – бычий сывороточный альбумин;
- CRPC – кастрационно-устойчивый рак предстательной железы;
- CYP19 – ароматаза;
- CYP1A2 – цитохром P450 1A2;
- CYP3A4 – цитохром P450 3A4;
- CYP3A5 – цитохром P450 3A5;
- CYP17A1 – 17- α -гидроксилаза/17,20-лиаза;
- CYP21A2 – стероид 21 α -гидроксилаза;
- CYP2B6 – цитохром P450 2B6;
- CYP11B1 – стероид 11 β -монооксигеназа;
- CYP11B2 – стероид 18-гидроксилаза;
- CYP2C8 – цитохром P450 2C8;
- CYP2C9 – цитохром P450 2C9;
- CYP2C19 – цитохром P450 C19;
- CYP2D6 – цитохром P450 2D6;
- DBD – ДНК-связывающий домен рецептора;
- DTT – дитиотреитол;
- EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- EGF – эпидермальный фактор роста;
- EGFR – рецептор эпидермального фактора роста;
- ERK – экстрацеллюлярно регулируемая киназа;

eIF4F – эукариотический инициаторный фактор 4F;
FGF – фактор роста фибробластов;
FKBP5 – FK506 связывающий белок 5;
GPCR – рецептор ассоциированный с G-белком;
HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
3 β -HSD1/-2 – 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 1/-2;
JIP – JNK-регуляторный белок;
JNK – c-Jun N-терминальная киназа;
IL – интерлейкин;
IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1;
IGF-1R – рецептор инсулиноподобного ростового фактора 1;
KGF – фактор роста кератиноцитов;
KSR – супрессор киназы Ras;
LBD – лиганд-связывающий домен;
MAP – митоген-активируемая протеинкиназа;
MAPK – митоген-активируемая протеин киназа;
MAP3K – киназа киназы митоген-активируемой протеинкиназы;
MNK1/-2 – регулиляторная протеинкиназа MAP-киназы-1/-2;
MST1 – белок-стимулятор макрофагов;
mTOR – мишень рапамицина млекопитающих;
MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид;
NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
NTD – N-концевой домен белка рецептора, активирующий транскрипцию;
PBS – фосфатно-солевой буфер;
Ph₃P – трифенилфосфин;
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа;
PIP3 – фосфатидилинозитол-(3, 4, 5)-трифосфат;
PMSF – фенилметилсульфонилфторид;
PSA – простатспецифический антиген;
PTEN – фосфатаза PIP3;

STAT – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции;
SULT2A1 – гидроксистероид сульфотрансфераза;
SULT1E1 – эстроген сульфотрансфераза;
TGF- β – фактор роста опухоли β ;
TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2;
TNF – фактор некроза опухоли;
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;
USP – убиквитин специфическая протеаза;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
КЖХ – колоночная жидкостная хроматография;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
РПЖ – рак предстательной железы;
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТРО – торможение роста опухоли.

1. ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы (РПЖ) – наиболее часто диагностируемое и второе по распространенности онкологическое заболевание у мужчин. Во многих случаях проведение простатэктомии и радиотерапии на ранних стадиях заболевания приводит к выздоровлению. Однако у части пациентов рак имеет агрессивную природу и активно метастазирует; в этих случаях рекомендуется медикаментозное снижение уровня системных андрогенов и подавление активности андрогенового рецептора (AR). Тем не менее, в течение 5 лет такого лечения 60% пациентов приобретают резистентность 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-независимых изменений: нарушениями в основных сигнальных путях клетки, мутациями в генах белков-супрессоров опухолей, изменениями в экспрессии ростовых факторов, цитокинов, шаперонов [1-6].

С 90-х годов прошлого века в мире проводится масштабный поиск препаратов, способных подавлять биосинтез андрогенов, активность CYP17A1 и развитие РПЖ. Было установлено, что синтетические стероиды, модифицированные азотсодержащими гетероциклами, являются эффективными ингибиторами CYP17A1 [7-15], а два соединения такой химической структуры – 17-(3-пиридил)-андроста-5,16-диен-3 β -ол (абиратерон) 1 и 17-(1H-бензимидазол-1-ил)-андроста-5,16-диен-3 β -ол (галетерон) 2 – оказались перспективными противораковыми агентами (Рисунок 1).

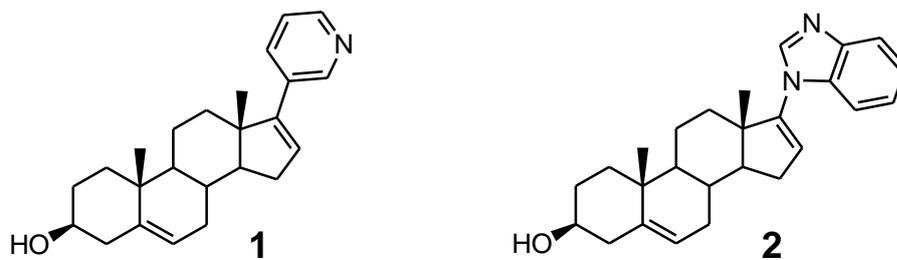


Рисунок 1 – Структуры абиратерона и галетерона

В 2011 году ацетат абиратерона был рекомендован в качестве препарата для лечения РПЖ с возможностью применения на всех стадиях заболевания, а галетерон охарактеризован как комплексный противоопухолевый агент, ингибирующий активность CYP17A1, подавляющий AR и стимулирующий его протеосомальную деградацию [16,17].

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 молекулярные механизмы противоопухолевой активности абиратерона, галетерона и их аналогов интенсивно исследуются. Кроме того, в мире идет поиск новых более активных и более специфичных стероидных противоопухолевых агентов [18-22]. В настоящее время в публикациях явно прослеживается тенденция к изучению молекулярных механизмов действия стероидных противоопухолевых агентов на сигнальные и регуляторные пути, патологически измененные при CRPC и других гормон-зависимых онкологических заболеваниях.

В лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ИБМХ в рамках Государственной Программы фундаментальных исследований на 2013-2020 гг (№051820140003) проводились работы по дизайну, химическому синтезу, структурному исследованию и изучению биологической активности новых стероидных производных, обладающих фармакологическим потенциалом, в

частности – противоопухолевой активностью. Настоящая диссертационная работа является составной частью этих исследований.

Цель и задачи работы. 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).

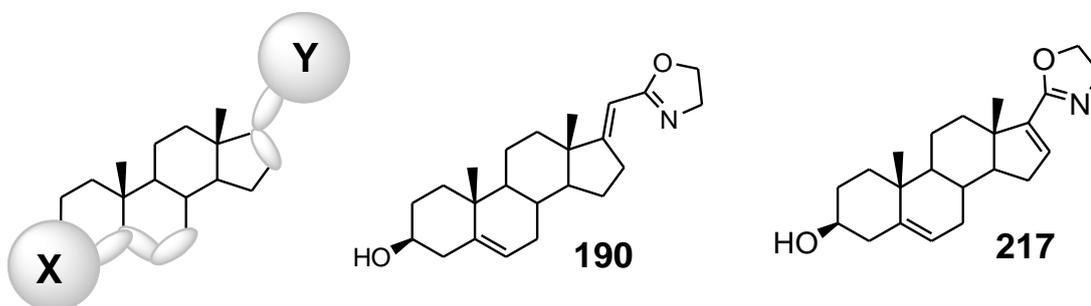


Рисунок 2 – Общая формула исследованных в работе азотсодержащих стероидных производных (X – различные заместители; Y – азотсодержащий гетероцикл; утолщенные линии – варьирующие участки стероидного цикла) и формулы оксазолинов 190 и 217

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 – азотсодержащих 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 – азотсодержащих 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; 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.

На защиту выносятся следующие **положения:**

Антипролиферативная активность производных андростана и прегнана, модифицированных азотистыми гетероциклами, в клетках карциномы простаты; корреляция структура – активность.

Ингибирование активности CYP17A1 стероидными оксазолинами 190 и 217; анализ молекулярных моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов.

Влияние оксазолинов 190 и 217 на сигнальные пути, ответственные за апоптоз и онкогенез в клетках карциномы простаты PC-3 и DU-145.

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. Основные результаты работы докладывались на 6 всероссийских и 5 международных научных конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 статей в ведущих международных и отечественных научных журналах (10 в индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus и

РИНЦ, рекомендованных ВАК)). Также опубликовано 10 тезисов докладов в сборниках всероссийских и международных научных конференциях.

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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Исследованию стероидных ингибиторов CYP17A1 и возможности их использования в качестве потенциальных препаратов для лечения РПЖ посвящено огромное число экспериментальных работ, обобщенных в обзорах [8-15,17,23]. Синтезированный Поттером и соавторами [24] абиратерон 1, а также галетерон 2 (Рисунок 1), полученный Хандраттой и соавторами [25] являются наиболее изученными представителями стероидных ингибиторов CYP17A1.

Стероидные ингибиторы CYP17A1 были с успехом использованы для структурных и биохимических исследований их основных биомишеней – ферментов стероидогенеза и AR. Для стероидных ингибиторов CYP17A1 был разработан фармакофор, позволяющий предсказывать активность новых соединений этого ряда [26]. В 2012 году была установлена пространственная структура фермент-ингибиторных комплексов CYP17A1 с абиратероном и галетероном [27].

Многочисленные экспериментальные исследования позволили определить фармакологический потенциал абиратерона и галетерона, выяснить их влияние на стероидогенез, осуществить поиск новых онкомаркеров и спрогнозировать возможность применения абиратерона и галетерона при комплексной терапии, а также оценить перспективу поиска, получения и применения их новых структурных аналогов.

На момент написания данного обзора в базе данных Pubmed содержится более 3000 статей посвященных исследованиям абиратерона и 84 статьи посвященных исследованиям галетерона. Такое обилие публикаций обусловлено тем, что абиратерон и галетерон являются полифункциональными препаратами, действующими на многие метаболические, сигнальные и регуляторные процессы в опухолевой клетке, а лабораторные и клинические исследования доказывают нарушения внутриклеточного сигналинга при CRPC.

Очевидно, что действие абиратерона, галетерона, их метаболитов, аналогов и других структурно родственных соединений (в настоящем обзоре обозначенных как “стероидные ингибиторы CYP17A1”) на эти aberrантные сигнальные пути, а также выяснению соответствующих молекулярных механизмов, представляет большой интерес. Настоящий обзор обобщает результаты работ, посвященных исследованию этой проблемы, и опубликованных за последние 10 лет.

2.2. СТЕРОИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ CYP17A1 И СТЕРОИДОГЕНЕЗ

Предшественником всех стероидных гормонов является холестерин, но только определенные клетки надпочечников, яичников, плаценты, тестикул и простаты способны синтезировать достаточное количество прегненолона – исходного соединения для биосинтеза всех стероидных гормонов. Поступающий в системный кровоток прегненолон захватывается гормон-компетентными клетками, где и происходит синтез стероидных гормонов. Синтез стероидных гормонов зависит от активности ферментов, экспрессирующихся в этих клетках, а эффекты стероидных гормонов проявляются именно в этих клетках и незначительно зависят от концентрации стероидов в циркуляции. Упрощенная схема биосинтеза стероидных гормонов [28] представлена на Рисунке 3.

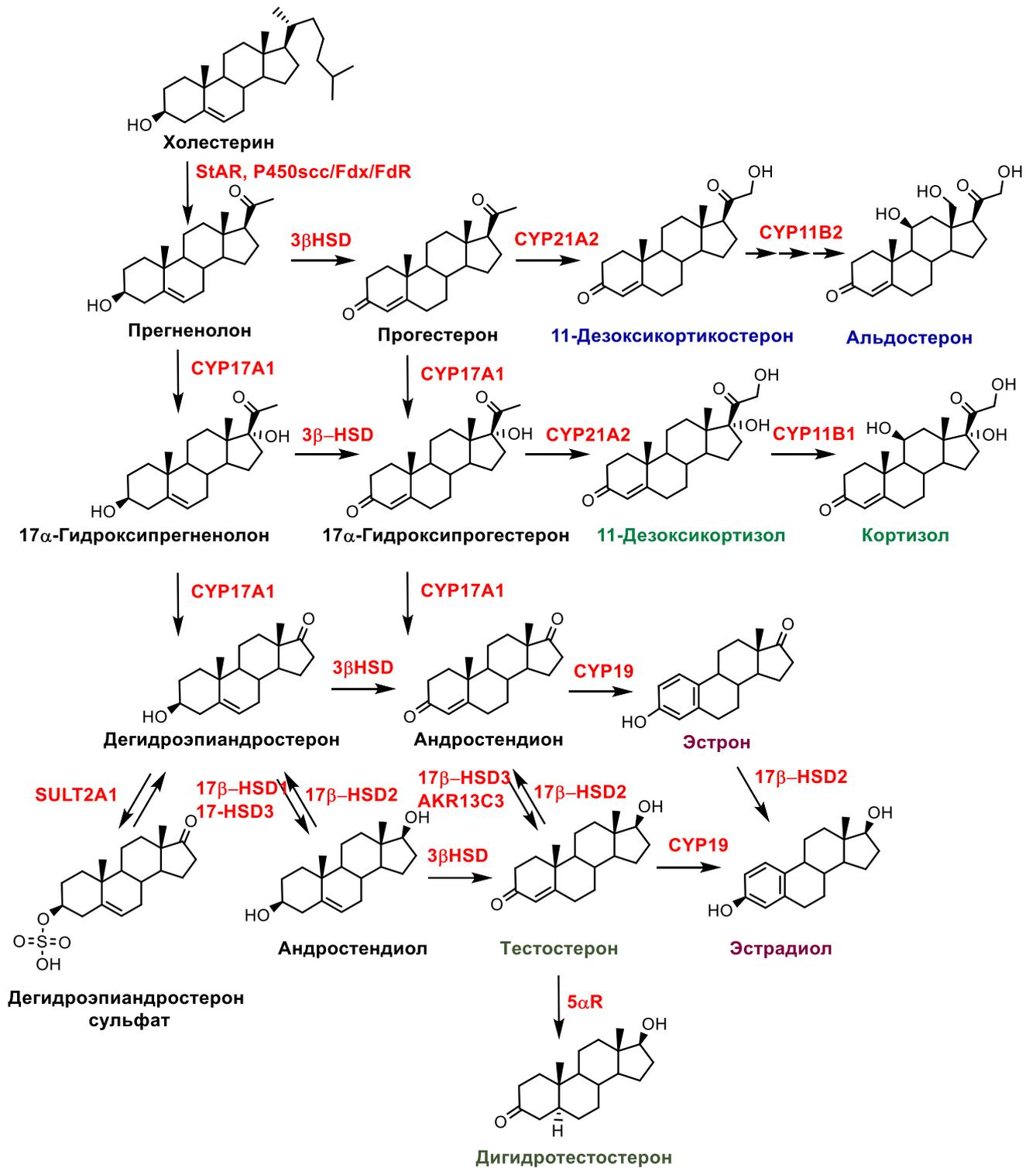


Рисунок 3 – Основные пути синтеза стероидов. Ферменты, катализирующие реакции биосинтеза стероидов (см. список сокращений) обозначены красным, названия основных глюкокортикоидов – синим, минералокортикоидов – зеленым, эстрогенов – фиолетовым, андрогенов – темно-серым

17 α -Гидроксилаза-17/20-лиаза (CYP17A1) – фермент, принадлежащий к суперсемейству цитохромов P450 [29] играет ключевую роль в биосинтезе андрогенов и глюкокортикоидов. Субстратами CYP17A1 являются прегненолон и прогестерон. CYP17A1 катализирует две последовательно протекающие реакции: 1) 17 α -гидроксилирование прегненолона и прогестерона; 2) 17/20-лиазную реакцию этих 17 α -гидроксистероидов с образованием дегидроэпиандростерона и андростендиона, соответственно (Рисунок 3). Подавление 17 α -гидроксилазной реакции блокирует синтез и глюкокортикоидов и андрогенов, а 17/20-лиазной реакции – только андрогенов, поэтому в качестве антиандрогенов особое внимание уделяется соединениям, селективно ингибирующим 17/20-лиазную активность [30].

In vivo и абиратерон, и галетерон значительно снижают уровень тестостерона в плазме крови, однако абиратерон снижает также и уровень глюкокортикоидов. Это вызывает системное увеличение концентрации минералокортикоидов, что влечёт побочные эффекты – гипертензию, гипокалемию, отеки. В рамках борьбы с побочными эффектами пациентам предписывается комплексный приём абиратерона и препаратов глюкокортикоидов.

В работе [31] был проведен анализ профиля стероидов (метаболизма) клеток надпочечников NCI-H295R, обработанных ингибиторами CYP17A1, в том числе – абиратероном и галетероном. Абиратерон и галетерон (в концентрации 1 мкМ при 24 ч инкубации) в 2 – 4 раза увеличивали содержание прегненолона и прогестерона; снижали содержание дегидроэпиандростерона, 11-дзоксиортизола и 17 α -гидроксипрогестерона; абиратерон снижал уровень 17 α -гидроксипрегненолона, а галетерон повышал его уровень ~ в 1.5 раза. Абиратерон и галетерон заметно подавляли превращение прегненолона в прогестерон и 17 α -гидроксипрегненолона в 17 α -гидроксипрогестерон, ингибируя активность 3 β -HSD; не влияли на активность ароматазы (CYP19); при этом в этих же условиях абиратерон практически полностью подавлял активность CYP21A2.

Также показано, что абиратерон ингибирует активность ароматазы (CYP19), 11 β -гидроксилазы (CYP11B1), альдостеронсинтазы (CYP11B2), сульфотрансфераз SULT2A1, SULT2B1b и SULT1E1; подавляет экспрессию 21-гидроксилазы (CYP21A2) [32-35]. Абиратерон способен заметно ингибировать активность ферментов печени CYP1A2, CYP2D6, CYP2C8, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 и CYP3A5, играющих важную роль в катаболизме многих лекарств, что может вносить вклад в его гепатотоксичность [36].

С целью поиска новых селективных ингибиторов CYP17A1, не действующих на активность CYP21A2, в работе [37] была получена серия новых аналогов абиратерона – соединений 3 – 9 (Рисунок 4). Все соединения (кроме лактама 9) эффективно ингибировали CYP17A1 (в 1,5 – 4 раза слабее абиратерона), однако 6-замещенные аналоги 4, 5, 6, 7, 8 слабо подавляли активность CYP21A2. Наиболее селективным ингибитором оказался оксим 8 – отношение IC₅₀ CYP21A2/IC₅₀ CYP17A1 для этого соединения составляло 84 (для абиратерона – 6.6).

В клетках карциномы простаты LNCaP и LAPC4 абиратерон подавлял превращение дегидроэпиандростерона в андростендион и андростендиола в тестостерон, ингибируя активность 3 β -HSD. После инкубации абиратерона с препаратом рекомбинантной 3 β -HSD был идентифицирован его метаболит – 17-(3-пиридил)-андроста-4,16-диен-3-он (D4A, соединение 10, Рисунок 5) [38].

Абиратерон и галетерон в организме подвергаются метаболическим превращениям под действием стероидогенных ферментов [39-41]. Основной метаболит абиратерона D4A 10 был идентифицирован в плазме крови подопытных мышей, в плазме крови пациентов, принимавших ацетат абиратерона, и в клетках LNCaP, трансфицированных геном 3 β HSD. Основной метаболит галетерона 17-(1H-бензимидазол-1-ил)-андроста-4,16-диен-3-он 17 (D4G) был идентифицирован в плазме крови подопытных мышей и клетках HEK293, трансфицированных генами стероидогенных ферментов.

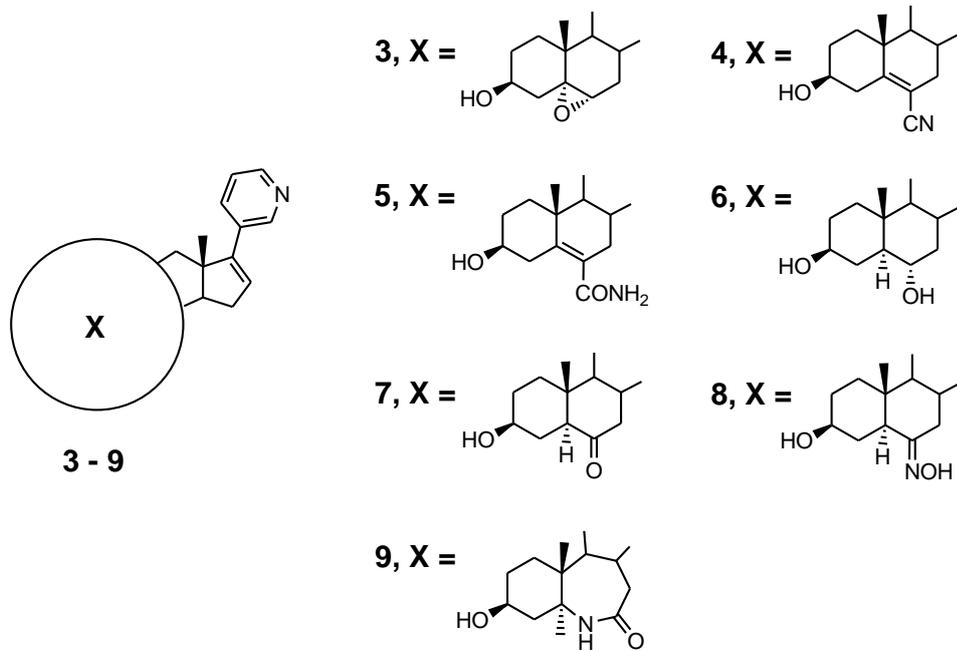


Рисунок 4 – Аналоги абиратерона 3 – 9

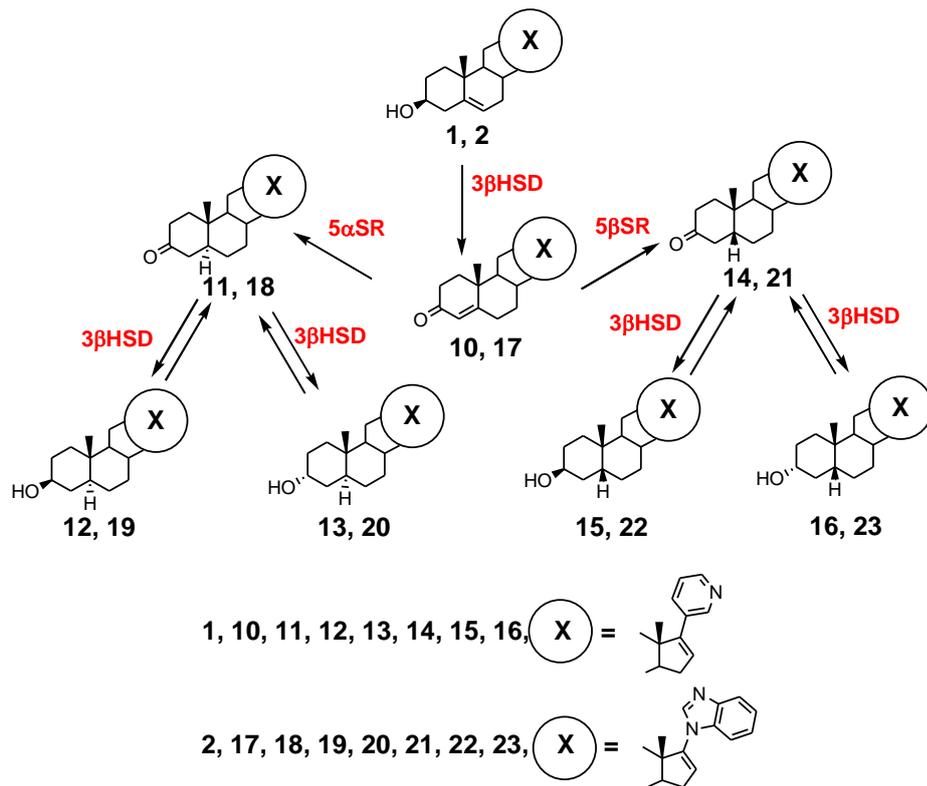


Рисунок 5 – Схема образования основных метаболитов абиратерона и галетерона

Окисление абиратерона в D4A 10 и галетерона в D4G 17 происходит в присутствии 3β HSD. Метаболиты в свою очередь не накапливаются, а превращаются в насыщенные кетопроизводные 11, 14, 18, 21 под действием 5α -SR и 5β -SR, соответственно. Каждый из этих кетостероидов в присутствии 3β -HSD способен восстанавливаться до 3α - или 3β - гидроксистероида (12, 13, 15, 16 и 19, 20, 22, 23, соответственно, Рисунок 4.). Таким образом, при приеме абиратерона или галетерона в каждом случае образуется по крайней мере 6 новых соединений, биологическая активность которых существенно отличается от таковой для абиратерона и галетерона.

D4A 10 подавлял активность 3β -HSD1 и 3β -HSD2 в клетках LNCaP, являясь ингибитором смешанного типа для 3β -HSD1 и неконкурентным ингибитором для 3β -HSD2. В отличие от абиратерона 1 D4A 10 подавлял активность 5α -редуктазы. В работе [42] был осуществлен синтез метаболитов абиратерона 10, 11, 13, нового производного абиратерона 24 (Рисунок 6) и исследовано их взаимодействие с CYP17A1. Метаболиты 10, 11, 13 ингибировали CYP17A1 подобно абиратерону, а соединение 24 слабо связывалось с ферментом и незначительно подавляло его активность (значения K_s для соединения 24 было на три порядка выше, чем для абиратерона 1 и его метаболитов 10, 11, 13). Производное абиратерона 25 (Рисунок. 6) слабо связывалось с CYP17A1 и незначительно ингибировало его каталитическую активность [43].

В работах [44,45] были синтезированы метаболиты галетерона 17, 19 и новые производные галетерона, устойчивые к метаболическим превращениям 26 – 30 (Рисунок 6). 3-Кето-4-ен- производное 17 подавляло стероидогенез аналогично галетерону; 3β -гидрокси- 5α H- производное 19 было практически неактивно; соединения 26 – 29 подавляли активность CYP17A1 слабее, чем абиратерон и галетерон; фторсодержащий аналог 28 показал заметную токсичность; эстрансодержащий аналог галетерона 30 не ингибировал активность CYP17A1.

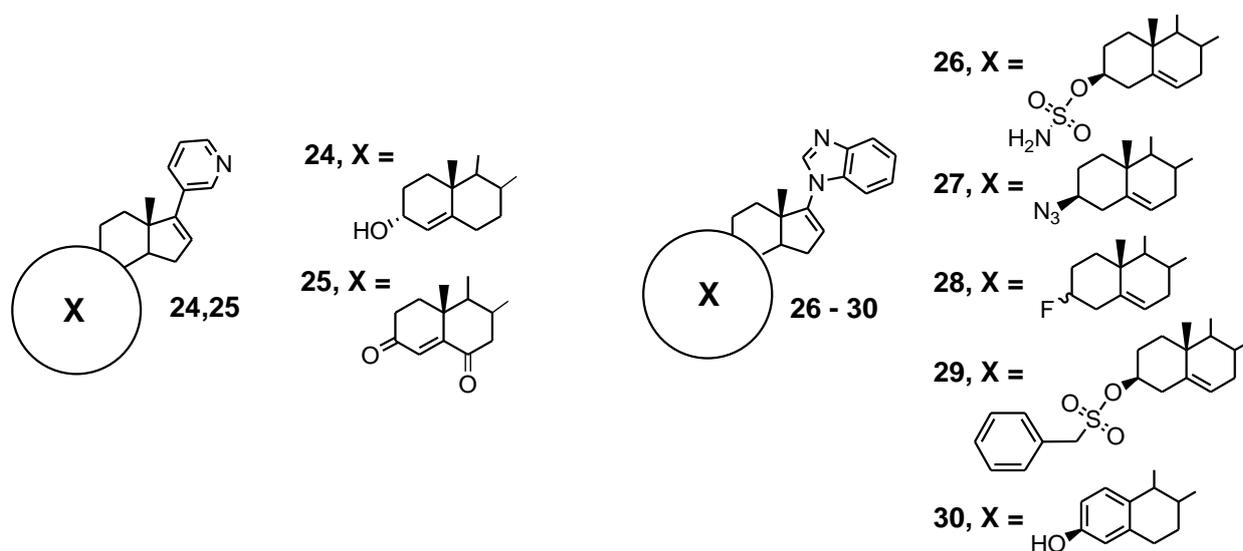


Рисунок 6 – Производные абиратерона и галетерона 24 - 32

В работе [46] были получены производные абиратерона, в которых пиридиновый цикл был модифицирован введением объёмистых заместителей 31 – 39 (Рисунок 7). Среди производных 31 – 39 только соединение 34 избирательно подавляло активность CYP17A1, хотя активность была невысока, а молекулярный докинг показал существенные различия в связывании абиратерона и соединения 34 в активном центре фермента. Соединение 37 избирательно подавляло активность CYP19.

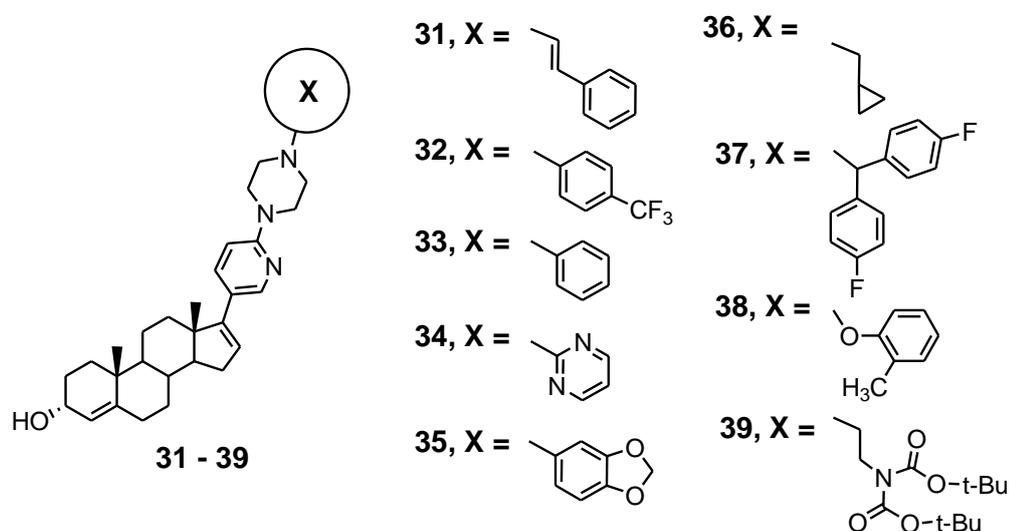


Рисунок 7 – Производные абиратерона 31 - 39

Работы последних лет продемонстрировали, что прием абиратерона и галетерона заметно влияют на метаболизм стероидов, а также что использование абиратерона в качестве противоракового агента сопряжено с побочными эффектами. Последнее в клинической практике требует использования абиратерона только с саплиментацией.

2.3. СТЕРОИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ CYP17A1 И AR СИГНАЛИНГ

Изучение сигнальных путей, инициирующих малигнизацию и онкотрансформацию клеток, а также формирующих устойчивость опухолевых клеток к действию лекарств, необходимо для поиска новых хемотерапевтических агентов и разработки новых стратегий лечения. Важнейшую роль в возникновении и прогрессии РПЖ играет AR-сигналинг (Рисунок 8).

AR – белок из семейства лиганд-активируемых транскрипционных факторов – содержит 4 функциональных домена: N-концевой домен (NTD), активирующий транскрипцию; консервативный ДНК-связывающий домен (DBD); шарнирный (Hinge) домен; лиганд-связывающий домен (LBD). В отсутствие лиганда-активатора (тестостерона или дигидротестостерона) AR локализуется в цитозоле в комплексе с шаперонами и белками цитоскелета. Связывание лиганда вызывает конформационные перестройки в LBD, приводящие к гомодимеризации (по типу “голова к голове“), фосфорилированию и транслокации димера AR в ядро, где он связывается со специфичной последовательностью промоторного участка гена-мишени (ARE, androgen response element) и белками-корегуляторами, модулирующими экспрессию генов-мишеней (в том числе маркеров РПЖ PSA, TMPRSS2 и FKBP5) [47,48].

CRPC характеризуется множественными нарушениями AR-сигналинга: повышенной экспрессией AR, обусловленной амплификациями и мутациями гена, образованием сплайс-вариантов, мутациями коактиваторов и корепрессоров, нарушениями взаимодействий AR-сигналинга с другими сигнальными путями клетки.

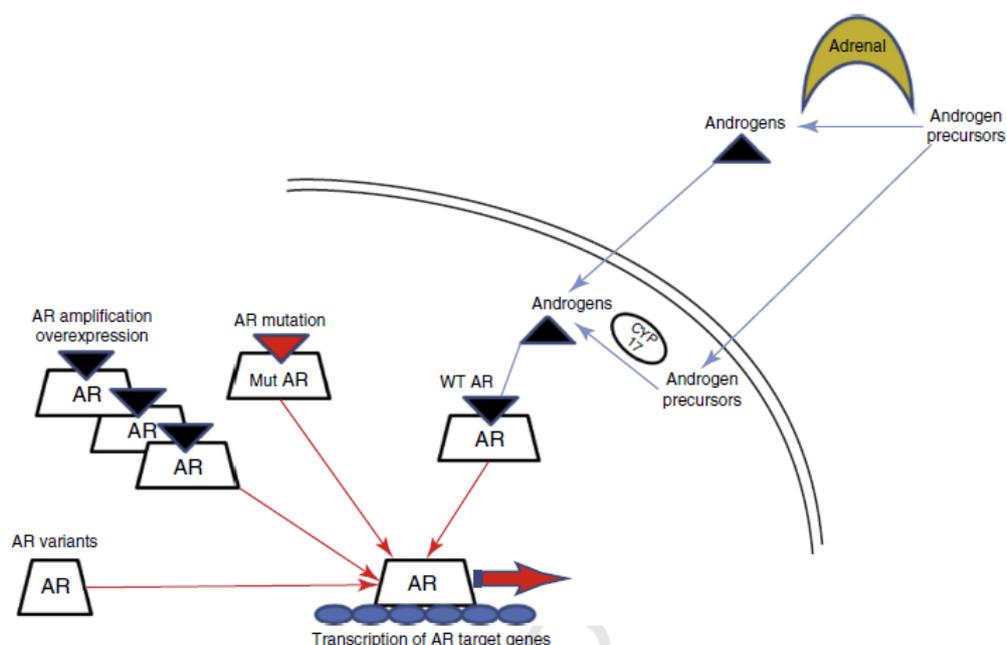


Рисунок 8 – AR сигналинг при CRPC [57]

Точечные мутации AR (найденные в LBD) повышают устойчивость рецептора к действию некоторых лекарств и снижают специфичность по отношению к лигандам, что приводит к повышенной активности AR в раковой клетке [49-51]. Продукт альтернативного сплайсинга AR (AR-V7) не содержит LBD, проявляет гормон-независимую активность, не образует комплекса с шапероном hsp90, свободно проникает в ядро и играет важную роль в развитии ракового перерождения клетки [52,53].

Нарушения в метаболизме стероидов (побочный синтез дигидротестостерона из 5 α -андростандиона надпочечников, мутации в гене 3 β -HSD1, препятствующие деградации этого фермента) стимулируют повышение уровня дигидротестостерона и активность рецептора при CRPC [54-56].

Влияние абиратерона и галетерона на активность AR в клетках LNCaP и LAPC-4 исследовалось в работе [58]. Оба соединения подавляли AR-сигналинг (снижали уровень мРНК и белка AR, подавляли активацию AR-зависимого промотора, индуцированную андрогенами, экспрессию PSA, TMPRSS2 и FKBP5), однако эффекты галетерона проявлялись значительно сильнее. Это объяснялось тем, что галетерон обладал высоким сродством к AR дикого типа и мутантам

(W741C, W741L), взаимодействуя с участком связывания лиганда, а абиратерон практически не связывался с AR.

Расположение галетерона (или D4G 17) в центре связывания лиганда AR (Рисунок 9) обеспечивается образованием водородных связей между кислородсодержащим заместителем в положении 3 и остатком Arg752, атомом N3 бензимидазолового фрагмента и остатком Thr877, а также нахождением фенильного цикла бензимидазолового фрагмента в гидрофобном кармане [17,59]. Такое расположение лиганда в комплексе приводит к изменению положения спирального участка H12 и стабилизирует его в т.н. “антагонистической” конформации (типичной для связывания антиандрогенов) [60,61].

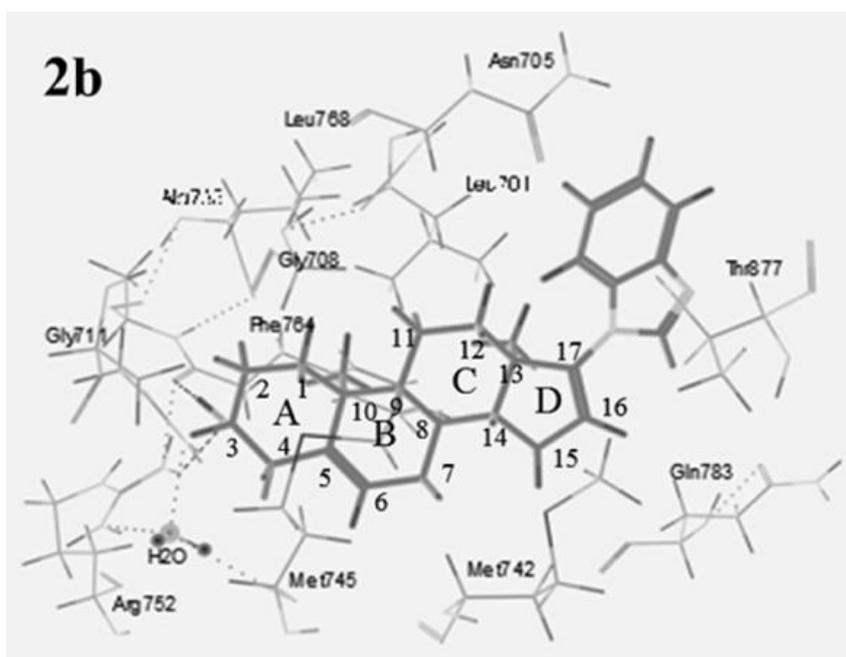


Рисунок 9 – Докинг галетерона в LBD AR [17]

В работе [44] было впервые показано, что обработка клеток карциномы простаты галетероном приводит к снижению уровня белка AR. Эта активность галетерона коррелировала с его способностью подавлять рост опухоли в модели ксенографта клеток LAPC-4 у мышей и позволила характеризовать галетерон как агент, вызывающий деградацию AR (ARDA, androgen receptor degrading agent).

Изучение механизмов деградации AR и участие галетерона в этих процессах продемонстрировало тесную связь между AR сигналингом и другими сигнальными и регуляторными механизмами клетки.

Галетерон 2 (и некоторые его производные, см. ниже) снижали уровень мРНК полноразмерного AR и сплайс-варианта AR-V7, стимулировали протеосомальную деградацию рецепторов на пост-трансляционной стадии и индуцировали апоптоз в трансфицированных клетках LNCaP, CWR22Rv1 и DU145, влияя на сигнальные пути PI3K/Akt, Mdm2/NF- κ B, MAPK (см. раздел 2.5) [62]. Под действием протеинкиназы Akt происходит фосфорилирование остатка Ser210 в AR и фосфорилирование Mdm2, что является необходимыми стадиями деградации комплекса в 26S-протеосоме. Механизм протеосомальной деградации AR-V7 включает образование комплекса AR-V7 с белком CHIP (C-terminus of Hsp70-interacting protein) и участие E3 убиквитин лигазы. Обработка клеток галетероном усиливает прочность комплекса AR-V7-CHIP, способствует его убиквитинилированию и 26S-протеосомальной деградации (Рисунок 10).

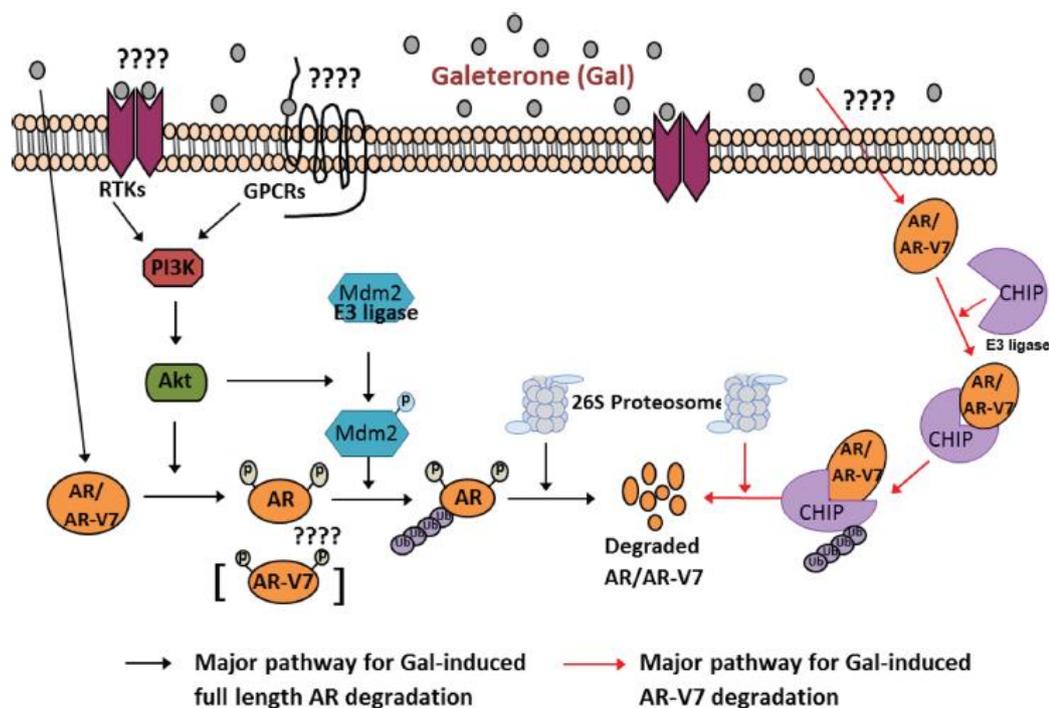


Рисунок 10 – Вероятный механизм участия галетерона в деградации полноразмерного AR и сплайс-варианта AR-V7 [62]

Галетерон избирательно подавлял активность двух гомологичных ферментов системы убиквитинилирования USP12 и USP46, контролирующих AR-Akt-Mdm2/NFκB сигнальный путь, что стимулировало деградацию полноразмерного AR, но не его сплайс-вариантов. [63,64]

Большая серия производных и структурных аналогов галетерона была синтезирована и протестирована на способность ингибировать CYP17A1, связываться с AR, а также влиять на его активность и деградацию в клетках карциномы простаты LNCaP (экспрессирующей мутантный T877A AR) и CWR22Rv1 (экспрессирующей полноразмерный AR и сплайс-вариант AR-V7). [45,65].

Аналоги галетерона 40 – 46 (Рисунок 11), различающиеся структурой гетероцикла слабо ингибировали CYP17A, не проявляли заметного сродства к AR и оказывали различные эффекты на пролиферацию клеток. Индол-содержащий аналог 40 не проявлял антипролиферативной активности и активировал AR; аналоги, содержащие замещенные бензимидазолы 41 – 44 подавляли пролиферацию и активность AR значительно слабее, чем галетерон; аналог 45, содержащий хлорпуриновый заместитель, активно подавлял пролиферацию, но не влиял на активность AR.

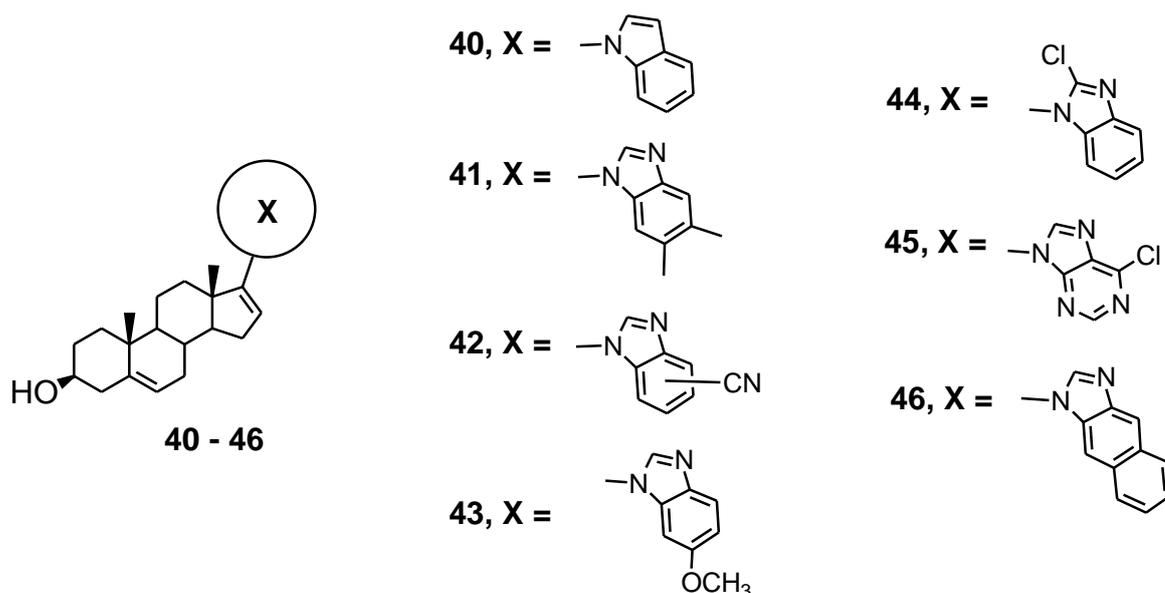


Рисунок 11 – Аналоги галетерона, содержащие различные заместители при C-17
(40 - 46)

16-Замещенные производные галетерона 47 – 49 (Рисунок 12) обладали слабой антипролиферативной активностью, и не влияли на активность CYP17A1 и AR-сигналинг в клетках LNCaP и CWR22Rv1.

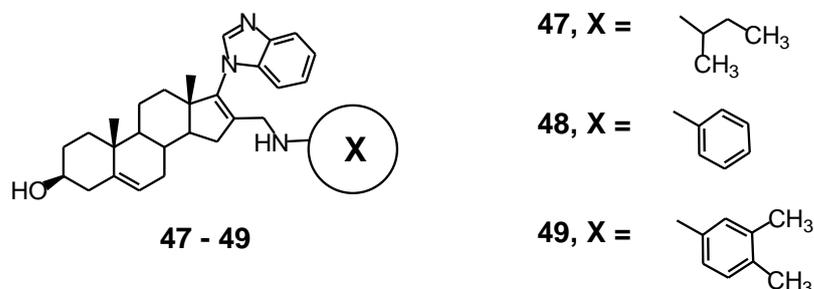


Рисунок 12 – 16-Замещенные аналоги галетерона (47 – 49)

Производные галетерона 50 – 64 (Рисунок 13) слабо подавляли активность CYP17A1, не обладали заметным сродством к AR дикого типа и мутанту T877A AR. Тем не менее, в ряду 3-замещенных производных галетерона были найдены соединения, блокирующие активность AR, стимулирующие его деградацию, эффективно подавляющие пролиферацию клеток и рост опухоли в модели ксенографта: соединения 51 (VNPP-414), 54 (VNPT-178), 57 (VNPT-55), 60 (VNPP433-3β), 61 (VNLG-74A).

Галетерон успешно прошел доклинические исследования и 2 фазы клинических испытаний, но был снят с 3-ей фазы из-за отсутствия достоверного эффекта на деградацию сплайс-вариантов AR. Новое поколение аналогов галетерона – соединения 51, 54, 57, 60 и 61 оказались способными стимулировать деградацию AR-V7 в культуре клеток и *in vivo*; их антипролиферативная и противоопухолевая активность превышала активность галетерона. Исследования этих соединений, проведенные в лаборатории Ньюра, дали новую важную информацию об участии AR-зависимых и AR-независимых сигнальных путей клетки в возникновении и развитии CRPC, об их молекулярных механизмах и о возможном хемотерапевтическом воздействии на эти процессы.

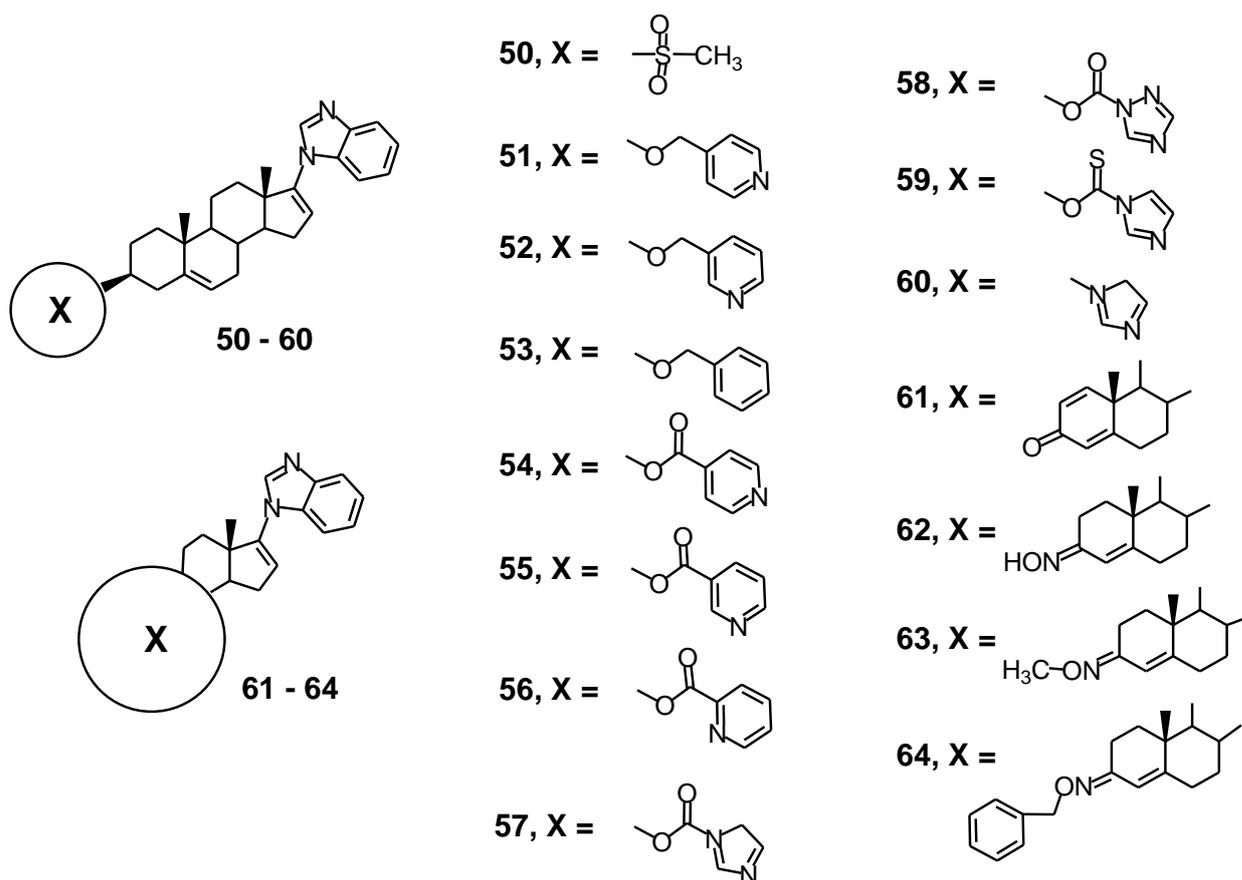


Рисунок 13 – 3-Замещенные аналоги галетерона (50 – 64)

2.4. ВЛИЯНИЕ АБИРАТЕРОНА, ГАЛЕТЕРОНА И ЕГО С-3 ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ

Абиратерон, галетерон и некоторые их производные эффективно подавляли рост и пролиферацию андроген-независимых клеток карциномы простаты PC-3 и DU-145 [46, 58, 66, 67]. Результаты исследований нового поколения аналогов галетерона (соединений 51, 54, 57, 60, 61) убедительно показали, что их антипролиферативная и противоопухолевая активность определяется воздействием на основные сигнальные пути клетки, драматически измененные при РПЖ.

В клетках PC-3 абиратерон 1 подавлял пролиферацию, вызывал фрагментацию ДНК и про-апоптотическую модуляцию p21, каспазы-3, сурвивина и фактора роста TGFβ [66]; галетерон 2 стимулировал экспрессию генов,

участвующих в реакции на стресс и в метаболизме белков; подавлял экспрессию генов, ответственных за прогрессию клеточного цикла, вызывая арест клеточного цикла в G1-G0 фазе; стимулировал выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума [67]. Производные абиратерона 35, 37 и 39 подавляли пролиферацию клеток DU-145 и PC-3, вызывая апоптоз и деградацию каспазы-3, и PARP [46].

В работе [68] было показано, что основной причиной антипролиферативных и анти-AR эффектов производных галетерона VNPT-178 54 и VNLG-74A 61 в клетках LNCaP, 22Rv1 и PC-3 является апоптоз, связанный с нарушениями кальциевого равновесия.

Вероятный механизм действия соединений 2, 54 и 61 (ARDAs) на кальциевый гомеостаз в эндоплазматическом ретикулуме показан на Рисунке 14 и включает связывание соединений 54 и 61 с АТФ-азным доменом шаперонов BiP/Grp78 и Hsp70-1A и нарушением функции Hsp70, что вызывает выход Ca^{2+} из ретикулума и приводит к апоптозу. На Рисунке 15 представлены гипотетические модели взаимодействия ARDAs с АТФ-азными доменами шаперонов BiP/Grp78 и Hsp70-1A [68].

В работе [69] изучалась роль галетерона 2 и VNPT55 57 в регуляции трансляции онкогенных мРНК и процессов миграции и инвазии клеток простаты. Галетерон и VNPT55 подавляли миграцию и инвазию клеток PC-3, DU145, LNCaP и CWR22Rv1, ингибируя экспрессию маркеров трансформации эпителиальных клеток в мезенхимальные – Snail, Slug, N-кадгерина, виментина, MMP-2/-9, и подавляя Mnk-eIF4E сигналинг. Фактор eIF4E играет критическую роль в трансляции онкогенов, ответственных за жизнеспособность, пролиферацию и метастазирование раковой клетки [70]. В присутствии галетерона и VNPT55 уровень белка Mnk1/2 и его фосфорилирование снижались, что ингибировало образование активного трансляционного комплекса.

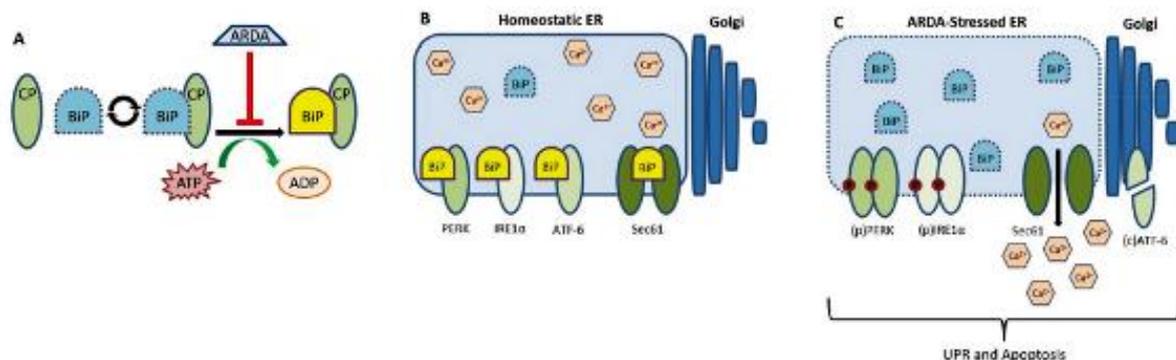


Рисунок 14 – Нарушение функций BiP/Grp78, вызываемое производными галетерона. А) Шапероны BiP/Grp78 в присутствии АТФ образуют нестабильный комплекс с белком CP (client protein), который при гидролизе АТФ до АДФ превращается в стабильный (желтый) комплекс. VNPT-178 и VNLG-74A (ARDA), связываясь с АТФ-азным доменом BiP, препятствуют образованию этого комплекса. В) В отсутствие ингибитора BiP связывается с трансмембранными белками ER PERK, IRE1 α , ATF-6 и Sec61. С) Добавление VNPT-178 и VNLG-74A вызывает апоптоз, обусловленный распадом комплекса BiP-CP, выходом Ca²⁺ через Sec61 транслокон, олигомеризацией и фосфорилированием PERK и IRE1 α , транслокацией и разрывом ATF-6' в аппарате Гольджи

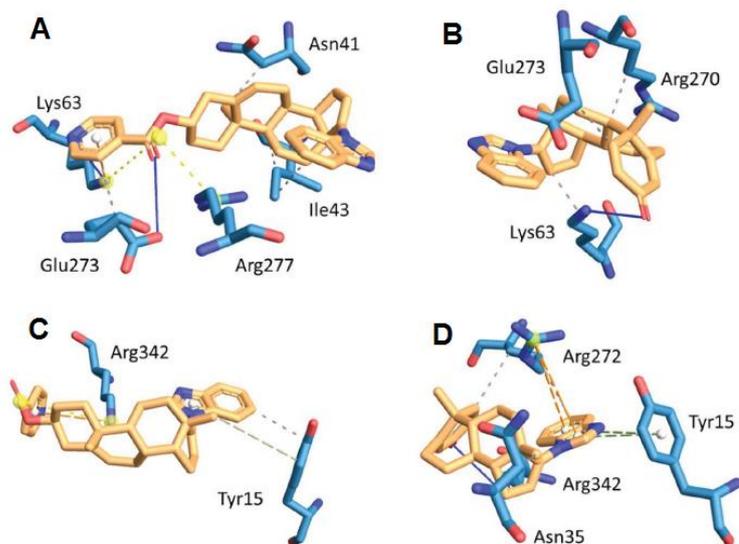


Рисунок 15 – Докинг соединения 54 в АТФ-азный домен BiP/Grp78 (А) и Hsp70-1A (С); докинг соединения 61 в АТФ-азный домен BiP/Grp78 (В) и Hsp70-1A (D)

Галетерон и VNPT55 ингибировали транскрипционную активность NF-κB и Twist1 и экспрессию мРНК Snail и BMI-1. Подавление миграции и инвазии клеток галетероном и VNPT55 может объясняться также повышенным уровнем мРНК и белка E-кадгерина и сниженной экспрессией β-катенина, CD44 и Nanog (Рисунок 16).

В работе [71] было показано, галетерон 2 и его аналоги VNPT55 57, VNPP414 51 и VNPP433-3β 60 эффективно подавляли жизнеспособность клеток аденокарциномы поджелудочной железы PDAC и рост опухоли в модели MiaPaca-2 ксенографта. Соединения 2, 57, 51 и 60 ингибировали пролиферацию, миграцию и инвазию клеток PDAC, вызывали арест клеточного цикла на стадии G1, индуцировали апоптоз, подавляли активность Mnk1/2, pеIF4E и NF-κB (p-p65), факторов метастазирования: N-кадгерина, MMP-1/-2/-9, Slug, Snail, CXCR4; факторов стволовых клеток: β-катенина, Nanog, BMI-1, Oct-4; повышали активность E-кадгерина. Таким образом, соединения 2, 57, 51 и 60 оказывали одинаковые эффекты на модели РПЖ и рака поджелудочной железы.

Галетерон эффективно подавлял MNK-eIF4E сигналинг, снижал уровень β-катенина, что снижало жизнеспособность клеток рака молочной железы; при совместном использовании – усиливал эффект хемотерапевтических агентов в этих клетках, а также препятствовал развитию опухоли в модели ксенографта. Эффект галетерона заключался в подавлении фосфорилирования eIF4E и снижении уровня MNK1/2, а также в снижении уровня β-катенина, обусловленного Akt-зависимым стимулированием его деградации. Эти данные позволяют считать, что комбинация галетерона с хемотерапевтическими агентами может быть использована для лечения рака молочной железы [72]

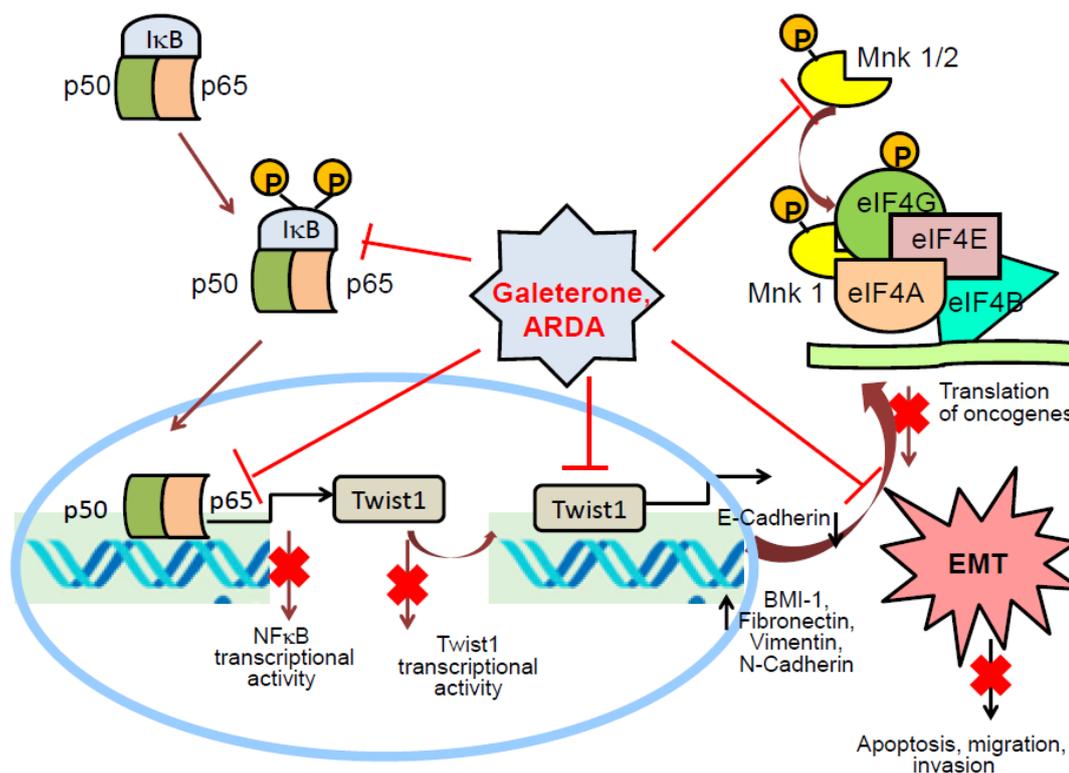


Рисунок 16 – Действие галетерона и VNPT55 (ARDA) на сигнальные процессы, контролируемые EMT. ARDAs препятствуют образованию и функционированию NF-κB комплекса, ингибируя фосфорилирование p65 и препятствуя связыванию с промоторным участком генов-мишеней; ARDA препятствуют связыванию Twist1 с геном BMI-1; ARDA ингибируют связывание Twist1 с промотором E-кадгерина, что усиливает его экспрессию; ARDA ингибируют фосфорилирование Mnk1/2, что препятствует образованию активного комплекса eIF4E и трансляции онкогенных мРНК.

Доклинические исследования аналогов галетерона VNPP414 51 и VNPP433-3 60 [73] в опытах на мышях с привитой опухолью CWR22Rv1 показали, что эти соединения эффективно снижали концентрацию AR/AR-V7 и Mnk1/2, вызывая их деградацию; блокировали прогрессию клеточного цикла, пролиферацию клеток карциномы простаты, индуцировали апоптоз, ингибировали миграцию опухолевых клеток и опухолевую инвазию, снижали содержание маркеров стволовых клеток и препятствовали мезенхимальному переходу. По сравнению с

галетероном 2 соединения 51 и 60 показывали улучшенные фармакокинетические характеристики, а соединение 60 подавляло рост опухоли в модели CWR22Rv1 ксенографта значительно эффективнее чем галетерон, не проявляя токсичности.

Результаты исследований нового поколения аналогов галетерона (соединений 51, 54, 57, 60, 61) продемонстрировали их эффективное воздействие на AR-зависимые и AR-независимые сигнальные пути клетки, измененные при РПЖ. Недавно было показано [74], что VNPP433-3 60 промотирует протеосомальную деградацию полноразмерного AR и его сплайс-варианта AR-V7 усиливая взаимодействие AR с E3-лигазой MDM2/CHIP и ослабляя взаимодействие AR с HSP90. Кроме того, VNPP433-3 60 подавляет фосфорилирование 4EBP1 и связывание eIF4E и eIF4G с 5'-Cap-мРНК, вызванное снижением уровня MNK1/2 и фосфорилированного eIF4E. Таким образом, VNPP433-3 60 проявляет противоопухолевый эффект сразу на трех уровнях регуляции: 1) на уровне транскрипции AR и AR-зависимых онкогенов; 2) на уровне трансляции; 3) на уровне протеосомальной деградации и утилизации AR.

2.5. НАРУШЕНИЕ ПРОЧИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ КЛЕТКИ ПРИ РПЖ

В данном разделе обзора кратко перечислены основные нарушения сигнальных путей клетки, наблюдаемые при возникновении и развитии РПЖ (Рисунок 17) (данные о нарушениях AP-сигналинга приведены в разделах 2.3. и 2.4).

В опухолевой клетке нарушения затрагивают Wnt сигнальный путь. Wnt-сигналинг, играет важную роль в эмбриогенезе, дифференцировке и поляризации клеток, вызывается связыванием экстрацеллюлярных лигандов Wnt с мембранным рецептором Fzd. Такое связывание регулирует содержание полифункционального белка β -катенина в цитоплазме. Связывание Wnt с Fzd приводит к вытеснению β -катенина из сложного комплекса, аккумуляции его в перинуклеарном пространстве, где он связывается с энхансером LEF/TCF и стимулирует транскрипцию генов-мишеней, таких как c-Myc, p300, Foxo, Bcl9-2, c-Jun, CtBP и циклина D1.

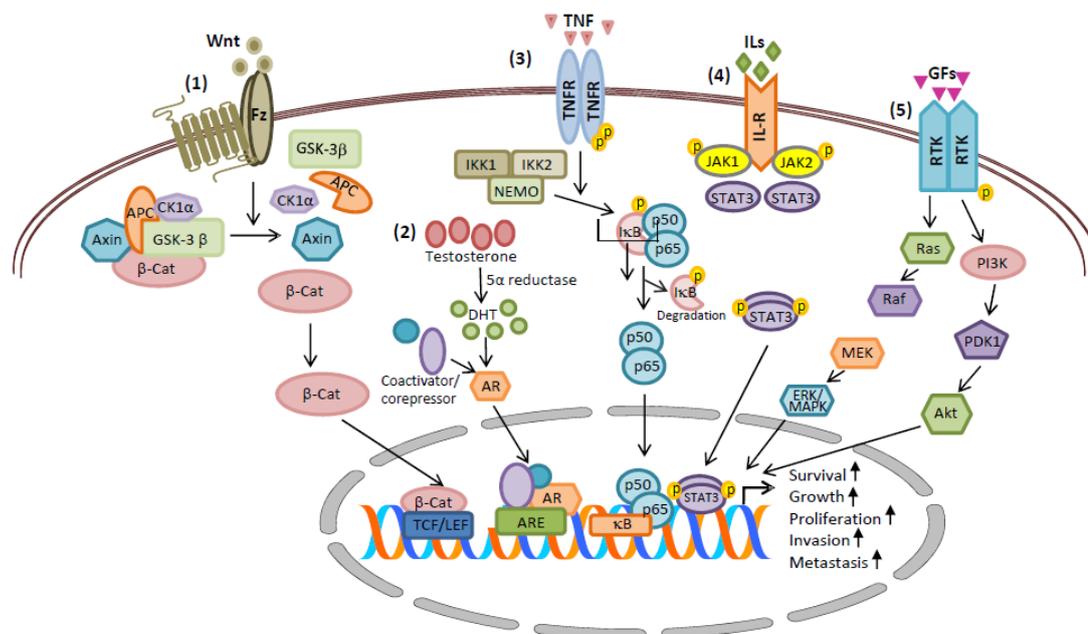


Рисунок 17 – Основные сигнальные пути, участвующие в развитии и прогрессии РПЖ [по данным 61]. (1) – Wnt-сигналинг; (2) – AR-сигналинг; (3) – NF-κB-сигналинг; (4) – JAK/STAT-сигналинг; (5) – сигналинг факторов роста.

При РПЖ наблюдаются характерные изменения в Wnt-сигналинге: 1) повышенная экспрессия Wnt-лигандов и Fzd-рецептора; 2) повышенный уровень β-катенина, обусловленный aberrантным Akt-сигналингом, 3) образование мутаций β-катенина, устойчивых к убиквитинилированию и протеосомальной деградации; 4) повышенная способность β-катенина ассоциироваться с AR, усиливая экспрессию AR-регулируемых генов [6,75-79].

NF-κB-сигналинг тоже играет важную роль в поддержании жизнеспособности и пролиферативного потенциала клеток РПЖ. NF-κB – это внутриклеточный белковый комплекс, регулирующий экспрессию ключевых генов, ответственных за жизнеспособность, пролиферацию, врожденный и приобретенный иммунитет. Семейство NF-κB состоит из пяти белков, образующих гомо- или гетеродимерные комплексы с белком-ингибитором IκB. При активации происходит фосфорилирование IκB под действием киназы IKKα или IKKβ, деградации IκB, освобождению димера NF-κB, его транслокации в ядро, связыванию с κB-энхансером, и активации транскрипции генов,

участвующих в иммунном ответе, росте, адгезии, метастазировании, блокировании апоптоза [80, 81].

При РПЖ активность NF-κB-сигналинга коррелирует с прогрессированием и рецидивами заболевания, ангиогенезом в опухоли, метастазированием, устойчивостью к химиотерапии. Стимуляция NF-κB сигналинга при РПЖ обусловлено повышенным уровнем TNF1 и TNF2-рецепторов; увеличенной экспрессией IL-6; абберрантным AR-сигналингом. Активация NF-κB сигналинга увеличивает экспрессию сплайс-вариантов AR и превращает андроген-чувствительные раковые клетки в андроген-нечувствительные, а блокада этого сигнального пути – к подавлению экспрессии сплайс-вариантов AR и восстановлению чувствительности клеток к действию антиандрогенов соответственно [82–87].

JAK/STAT-каскад – является одним из основных путей проведения сигналов от клеточной мембраны в ядро. Связывание лиганда поверхностного рецептора (интерлейкина) вызывает олигомеризацию субъединиц рецептора, приводя к передаче сигнала через фосфорилирование связанной с рецептором тирозинкиназы JAK. Активированный JAK индуцирует фосфорилирование рецептора и белков STAT, что вызывает их димеризацию, транслокацию в ядро и связывание со специфической последовательностью ДНК, приводящее к изменению транскрипции генов-мишеней [88].

При РПЖ ингибирование JAK/STAT3 сигнального пути вызывает апоптоз и подавляет рост раковых клеток, а активация же вызывает противоположный эффект [89-92].

Сигнальные пути ростовых факторов, нарушения сигналинга и мутации белков каскада играют критическую роль в росте, пролиферации и выживании опухолевых клеток. Ростовые факторы подразделяются на положительные (промотирующие рост и пролиферацию), отрицательные (игибирующие рост, пролиферацию и вызывающие апоптоз) и ангиогенные (стимулирующие прорастание сосудов в опухолевой ткани и снабжение её кислородом в процессе роста). Рецепторы факторов роста – мембранные белки, обладающие активностью

тирозинкиназы. Связывание ростового фактора с его рецептором приводит к фосфорилированию рецептора и запуску сигнального каскада, результатом которого является активация транскрипционных факторов и изменению экспрессии множества генов, ответственных за жизнеспособность, рост и пролиферацию клетки.

CRPC сопровождается повышенной экспрессией ростовых факторов и соответствующих рецепторов. Кроме того, ростовые факторы TGF- β , BMP, IGF-1, EGF, VEGF, FGF, IL являются синергетиками активности AR [93–98].

PI3K/Akt-сигналинг представляет собой основной механизм передачи сигналов от мембранных рецепторов, отвечающий за рост, пролиферацию, дифференцировку и ангиогенез. В клетках человека PI3K комплекс существует в виде гетеродимера из каталитической (110 кДа) и регуляторной (85 кДа) субъединиц. Связывание фактора роста со специфическим мембранным рецептором (EGFR; IGF-1R; GPCRS; Ras) приводит к фосфорилированию рецептора, что PI3K активирует серин/треонин-специфичную протеинкиназу Akt. Активированный Akt способен фосфорилировать другие белки (включая mTOR) и регулируя множество клеточных процессов [99]. Кроме того, активация mTOR ведет к фосфорилированию и инактивации 4E-BP (семейства небольших кислых белков, внутриклеточных ингибиторов фактора трансляции eIF4E). Фосфорилирование 4E-BP1 под действием mTOR разрушает комплекс 4E-BP1-eIF4E, активирует eIF4E и инициирует трансляцию онкогенов [100].

У 30%–50% пациентов с РПЖ наблюдается избыточная активация PI3K/Akt сигналинга, причиной которого является потеря белка PTEN (phosphatase and tensin homolog, фосфатазы дефосфорилирующей PIP3). В раковой клетке aberrантный PI3K/Akt сигналинг способствует росту клеток (как по AR-независимому механизму, так и благодаря Akt-зависимому фосфорилированию AR, см. выше). Кроме того, нарушения в PI3K-сигналинге влияют на активность сигнальных путей Ras/MEK/ERK, IGF, и белков MST1, Ack1, Vmi1, увеличивая их онкогенный потенциал [101, 102], стимулируют экспрессию металлопротеиназ

MT1-MMP, разрушающих внеклеточный матрикс, способствуя инвазии и метастазированию [103].

Митоген-активируемые протеин киназы MAPK – семейство сериновых и треониновых киназ, состоящее из трех подгрупп: киназ, регулируемых экстрацеллюлярным сигналом (ERK), Jun N-терминальных киназ (JNK) и изоформ белка p38. MAPK-сигналинг отвечает за связь экстрацеллюлярных сигналов и внутриклеточных механизмов, контролирующими фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки. MAPK-сигналинг можно представить как трехуровневый структурно-функциональный модуль, состоящий из киназы MAP3K, киназы MAP2K и собственно MAPK. MAP3K фосфорилирует и активирует MAP2K, которая в свою очередь фосфорилирует и активирует MAPK [104–106].

MAPK-сигналинг активируется или взаимодействием компонентов киназного комплекса, или образованием сигнального комплекса киназ с каркасными белками. Такими белками являются KSR и MP1 (для ERK-пути), JIP (для JNK-пути) и β -аррестин 2 (для ERK- и JNK-путей) [107]. Активированные MAPK фосфорилируют различные белки, в том числе транскрипционные факторы c-Jun, c-Fos, ATF2, p53. ERK или p38, а также могут активировать киназы MNK1 и MNK2, играющие важную роль в контроле трансляции мРНК [108]. Фосфорилирование MNK1 и MNK2 под действием MAPK активирует их киназную активность и вызывает образование комплекса eIF4F, инициирующим трансляцию онкогенных белков (циклинов D1 и D3, c-Мус, MDM2, VEGF, сурвивина, Bcl-2 [109, 110].

Повышенная экспрессия ростовых факторов EGF, FGF, IGF, KGF (наблюдаемая при РПЖ) является результатом активации MAPK-сигналинга [111, 112]. Повышенная активность MNK и p-eIF4E (наблюдаемая при РПЖ) промотирует пролиферацию раковых клеток [113, 114]; при метастазируемом раке простаты активность MNK2 увеличивается в 1,5 – 4,4 раза [115]; повышенная активность p38-сигналинга (наблюдаемая на последних стадиях РПЖ)

увеличивает экспрессию аквапоринов – белков, образующих поры и обеспечивающих выживание клеток в условиях гипоксии [116].

Стероидные ингибиторы CYP17A1 оказывают существенное влияние на вышеуказанные сигнальные пути, однако имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные не позволяют идентифицировать новые специфические биомаркеры, с которыми способны взаимодействовать эти ингибиторы, а также судить о соответствующих молекулярных механизмах.

2.6. НОВЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СТЕРОИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

В этой главе обзора приводятся структуры азотсодержащих стероидных производных, синтезированных в течение последних 10 лет и показавших значительную антипролиферативную активность в клетках карциномы простаты. В настоящее время многие из представленных соединений рассматриваются в качестве перспективных кандидатов для разработки новых противоопухолевых препаратов. Однако, имеющиеся в литературе данные о биологической активности ограничены и дальнейшие исследования этих соединений в культуре клеток и *in vivo* необходимы для оценки их потенциала в качестве противораковых агентов.

Бандай и соавт. [117] синтезировали две серии стероидных производных, содержащих арил-замещенный изоксазолиновый (65 – 70) или оксазолиновый (71 – 77) циклы (Рисунок 18). Соединения 65, 69 и 71 продемонстрировали значительную антипролиферативную активность в клетках карциномы простаты LNCaP, PC-3 и DU-145.

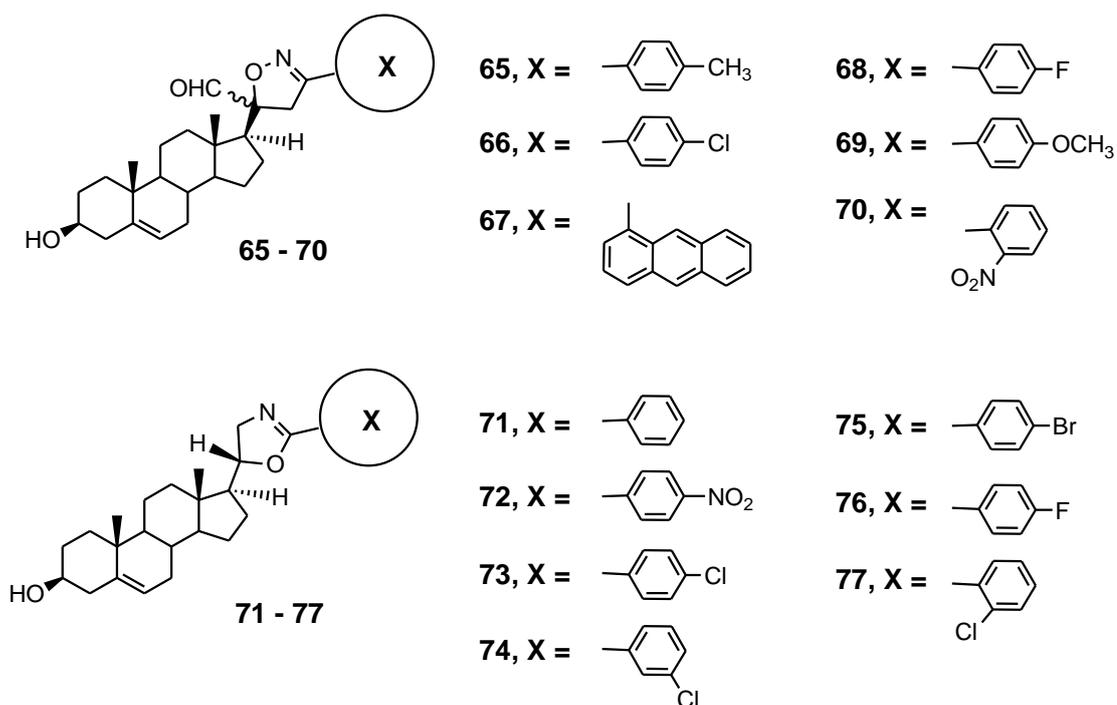


Рисунок 18 – Арилзамещенные изоксазолиновые и оксазолиновые производные 3β-гидроксиандрост-5-ена (65 – 77)

Сильва-Ортиц и соавт. [118-120] синтезировали серию 21-имидазоловых, 21-триазоловых производных 16-дегидропрегненолона и их 3β-ацильных производных 78 – 99 (Рисунок 19).

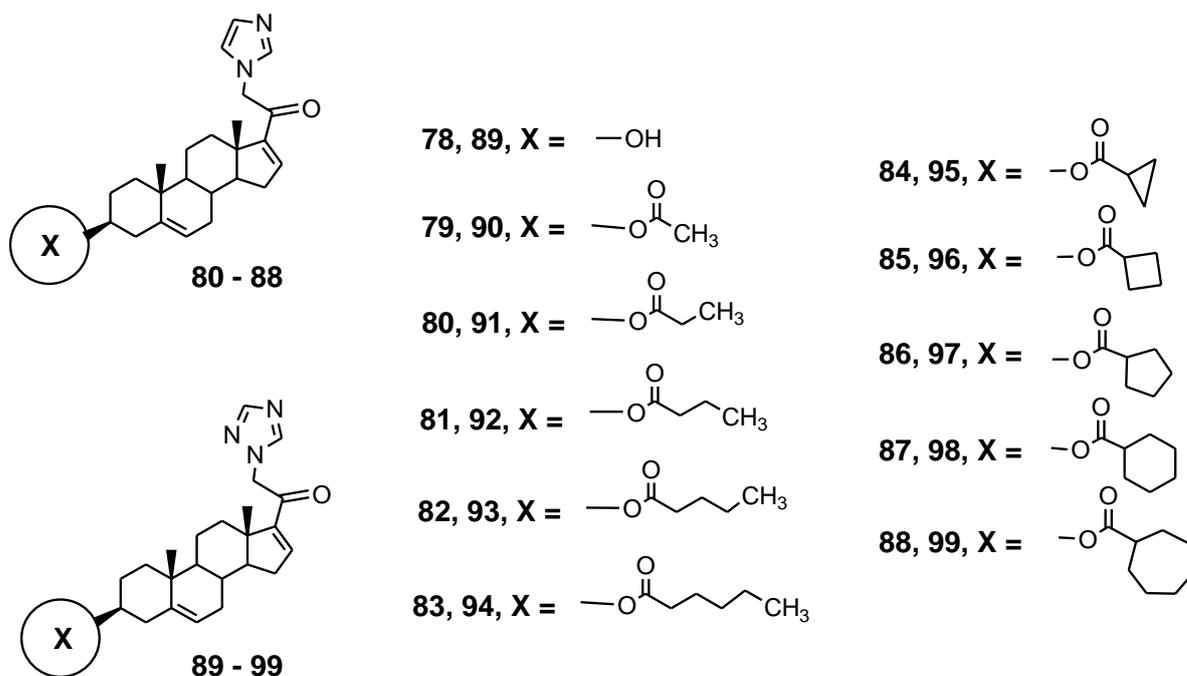


Рисунок 19 – Имидазоловые и триазоловые производные 16-дегидропрегненолона (78 – 99)

Среди 3β -гидроксипроизводных соединения 78 и 89 эффективно подавляли пролиферацию клеток РС-3, причем эффект имидазолида 78 был значительно выше, чем триазолида 89. Имидазолид 78 подавлял активность 5α -редуктазы, экспрессию циклинов D1 и E1, но не проявлял антиандрогенной активности. Ацетат 79 эффективно подавлял пролиферацию клеток РС-3; соединения 80 - 83 и 90 были умеренно активны, соединения 91 – 99 были неактивными.

Бандай и соавт. [121] синтезировали серию 3β -гидрокси-20-кетопрегн-5-енов, содержащих замещенный триазоловый фрагмент 100 – 108 (Рисунок 20). Соединения 100 – 104, 106, 108 подавляли пролиферацию семи линий раковых клеток, в том числе клеток карциномы простаты РС-3 и DU-145. Среди них соединение 104 проявляло наибольшую активность.

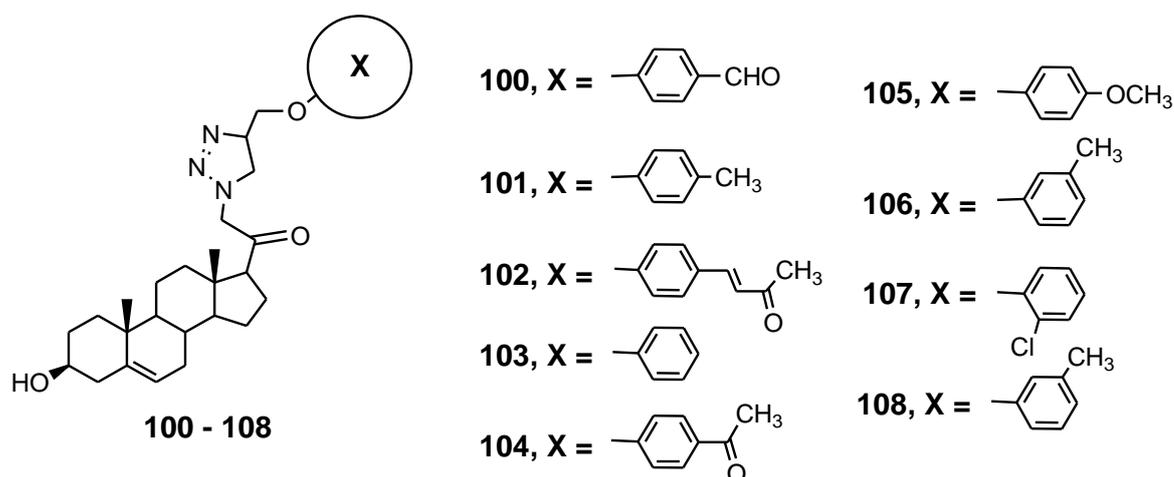


Рисунок 20 – 4-Замещенные 1,2,3-триазоловые производные 3β-гидрокси-20-кетопрегн-5-ена (100 – 108)

Хоу и соавторы [122] синтезировали серию стероидных имидазолидов 109 – 115 (Рисунок 21) и исследовали их эффекты на активность CYP17A1, AR и пролиферацию клеток LNCaP. 16,17-Насыщенные соединения 109 – 112 были активнее, чем их ненасыщенные аналоги 113 – 115; оксим 112 показал наибольшую активность.

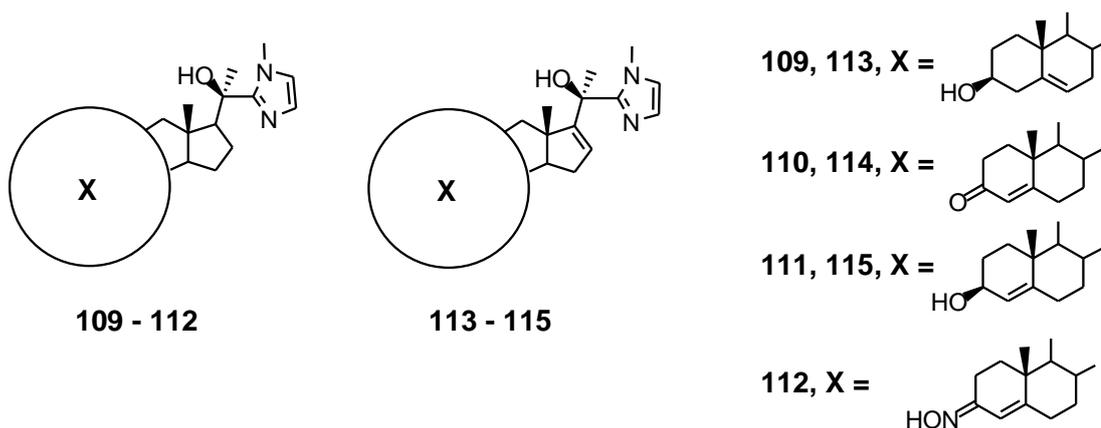


Рисунок 21 – Стероидные имидазолы (109 – 115)

Ши и соавторы, [123] синтезировали серию стероидных производных 116 - 129 (Рисунок 22) и исследовали их антипролиферативную активность в раковых клетках разных линий, в том числе в клетках карциномы простаты РС-3.

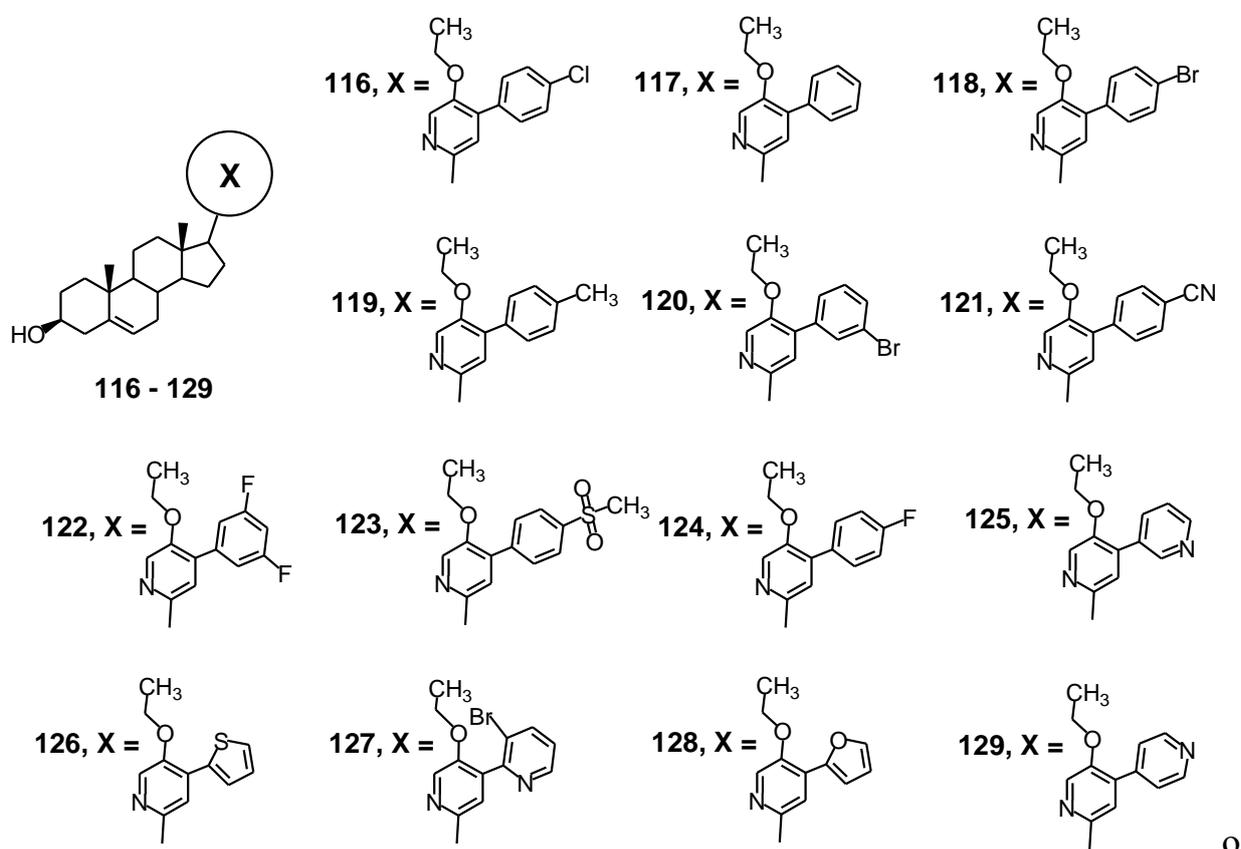


Рисунок 22 – Стероидные пиридины (116 – 129)

Соединения 116 – 124 (содержащие замещенные фенильные остатки) обладали незначительной антипролиферативной активностью, а соединения 125 – 129 (с гетероциклическими заместителями) – существенной активностью. Соединение 125 в клетках РС-3 подавляло пролиферацию в 4 раза более активно, а в клетках LNCaP в 2,5 раза менее активно, чем абиратерон; ингибировало образование колоний и миграцию клеток РС-3, активировало каспазы 3/-9 и PARP, что приводило к индукции апоптоза.

Комендантова и соавт. [124] синтезировали новые стероидные (N-арилкарбамоил)17-[1',3',4']-тиадиазины 130 – 138 (Рисунок 23), показавшие

высокую антипролиферативную активность в AR-зависимых клетках карциномы простаты 22Rv1. Соединения 133 и 138 были наиболее активными; соединение 138 подавляло экспрессию и активность AP, блокировало NF-κB сигналинг и стимулировало апоптоз в клетках 22Rv1.

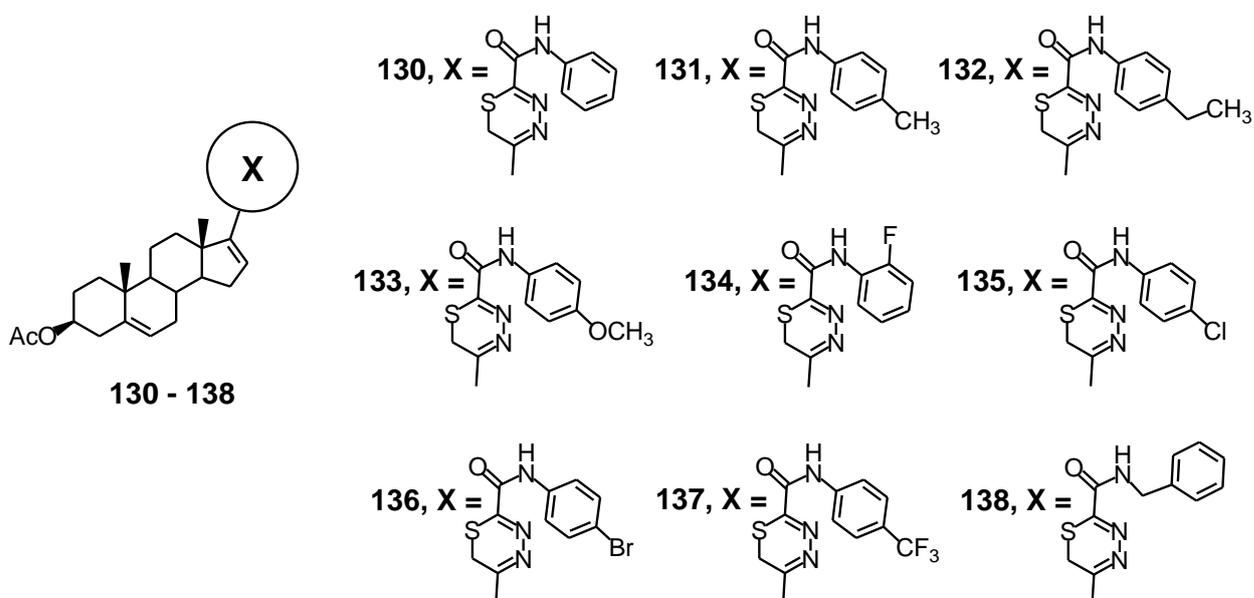
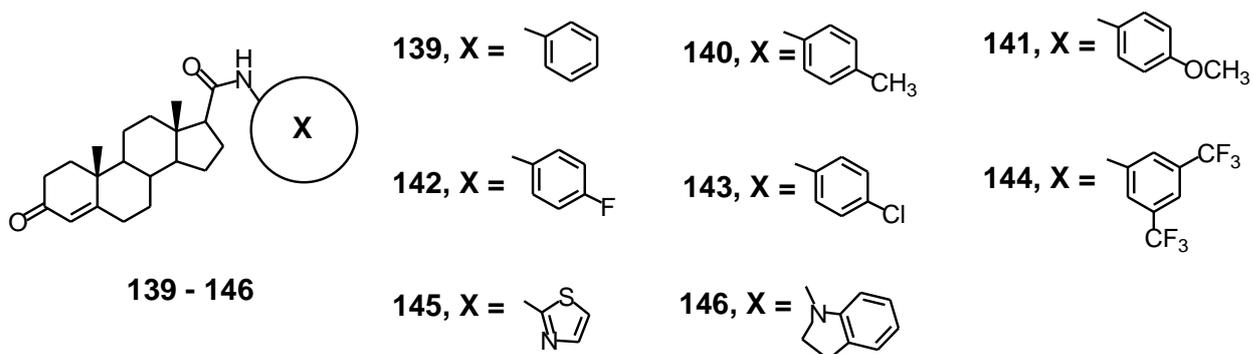
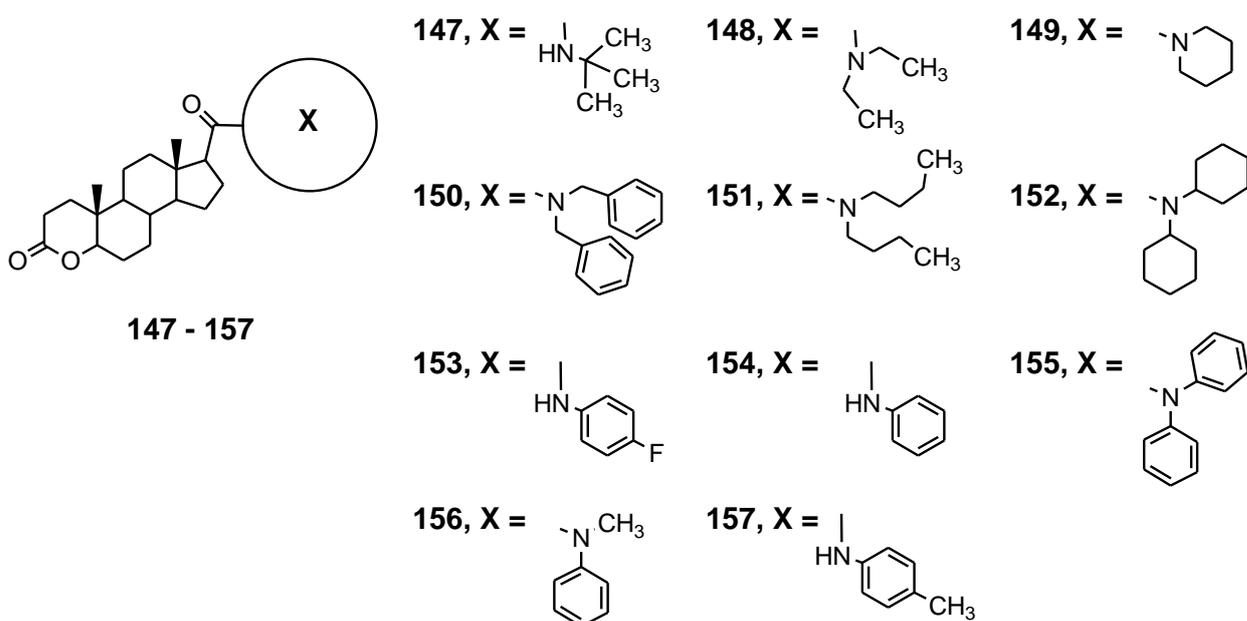


Рисунок 23 – Стероидные (N-арилкарбамоил)17-[1',3',4']-тиадиазины (130 – 138)

Кортес-Бенитес и соавт. [125] синтезировали серию амидов 139 – 146 (Рисунок 24) и исследовали их антипролиферативную и антиандрогенную активность в клетках LNCaP. Все соединения подавляли пролиферацию, стимулированную андрогенами; наибольшую активность проявляли амиды 144 и 145; эти соединения также подавляли пролиферацию AR-независимых клеток PC-3, не проявляя острой токсичности.

Рисунок 24 – Производные 17 β -N-арилкарбамоиландрост-4-ен-3-она 139 - 146

Проводя поиск новых ингибиторов 5 α SR, Лао и соавт. [126,127] синтезировали две серии новых 17 β -карбамоильных производных 3-оксо-4-окса-5 α -андростана (147 – 157) (Рисунок 25) и андроста-3,5-диен-3-карбоновой кислоты (158 – 167) (Рисунок 26). Все соединения эффективно подавляли активность 5 α SR; амиды 150 и 157 связывались с AR подобно дигидротестостерону и подавляли пролиферацию клеток карциномы простаты LNCaP и PC-3, причем антипролиферативный эффект соединений проявлялся сильнее (\approx в 4 раза) в андроген-зависимых клетках LNCaP, чем в андроген-независимых клетках PC-3.

Рисунок 25 – 3-Оксо-4-окса-5 α -андрост-17 β -амиды 147 – 157

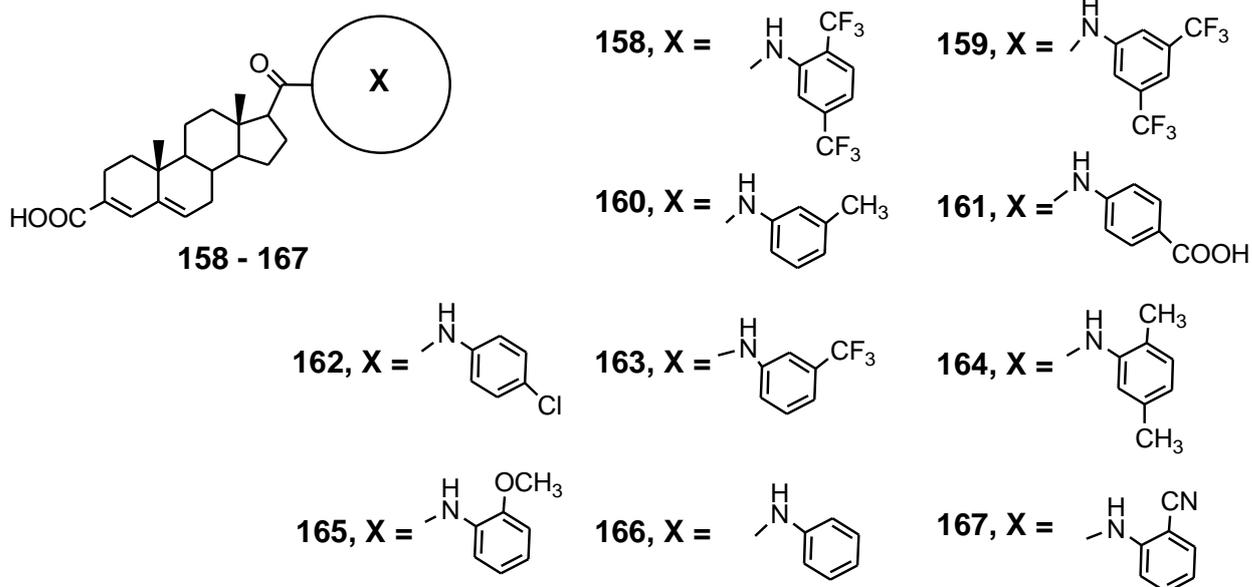


Рисунок 26 – 17 β -N-фенилкарбамоильные производные андрост-3,5-диен-3-карбоновой кислоты 158 – 167

Морейра и соавт. [128] синтезировали стероидные карбаматы 168 – 174 (Рисунок 27) и исследовали их эффекты на активность CYP17A1 и пролиферацию клеток РС-3. Наибольшую ингибиторную активность проявляли соединения 168 и 174, наибольшую антипролиферативную активность – 172 и 173.

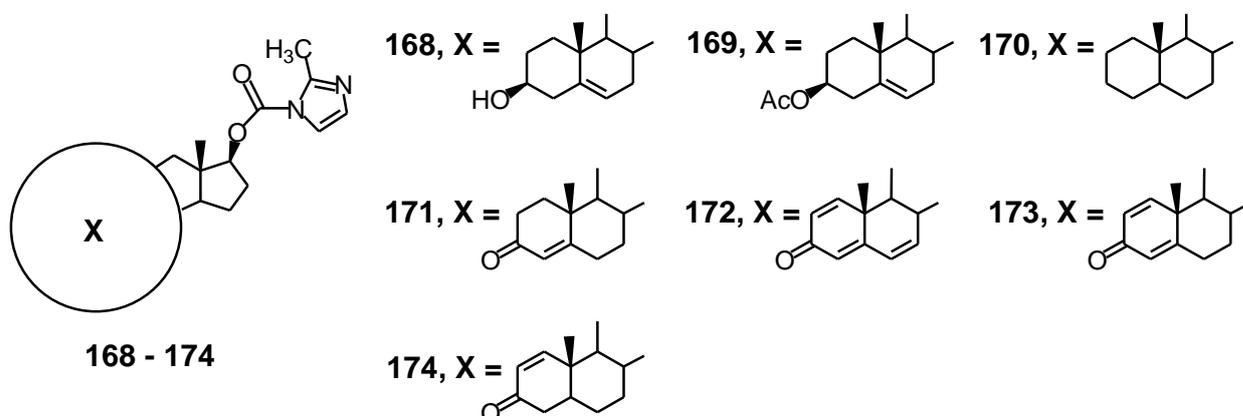


Рисунок 27 – Стероидные карбаматы 168 – 174

Производные [17(20)E]-21-норpregна-5,17(20)-диена, содержащие азотистые гетероциклы, эффективно подавляли активность CYP17A1 и пролиферацию опухолевых клеток. Способность синтезированных в работах [129-132] (2-пиридил)-замещенных производных 175 – 184 (Рисунок 28) ингибировать активность CYP17A1 снижалась в ряду: 177 > 175 > 174 (остальные соединения проявляли слабую активность). Соединения 177, 179, 182, 183 умеренно подавляли пролиферацию клеток РС-3.

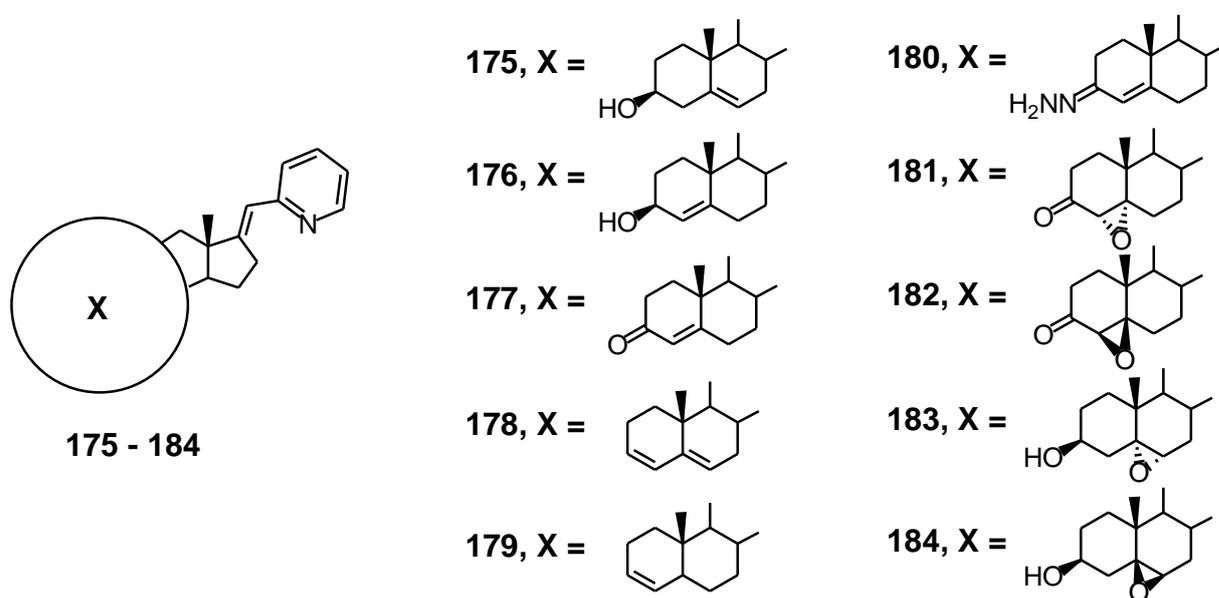


Рисунок 28 – Производные [17(20)E]-пиколинилиденандростана 110 - 119

Джуренич и соавт. [133] синтезировали серию производных [17(20)E]-21-норpregна-5,17(20)-диена (185 - 189) (Рисунок 29), в которых пиридиновый цикл был окислен до N-оксида. Соединение 185 показало очень высокую цитотоксичность в клетках РС-3 (в 100 раз сильнее, чем ацетилированный эпоксид 186 и в 50 сильнее, чем 3β-гидрокси-5-ен-производное 187); при этом цитотоксичность 3-кетостероидов 188 и 189 была незначительна.

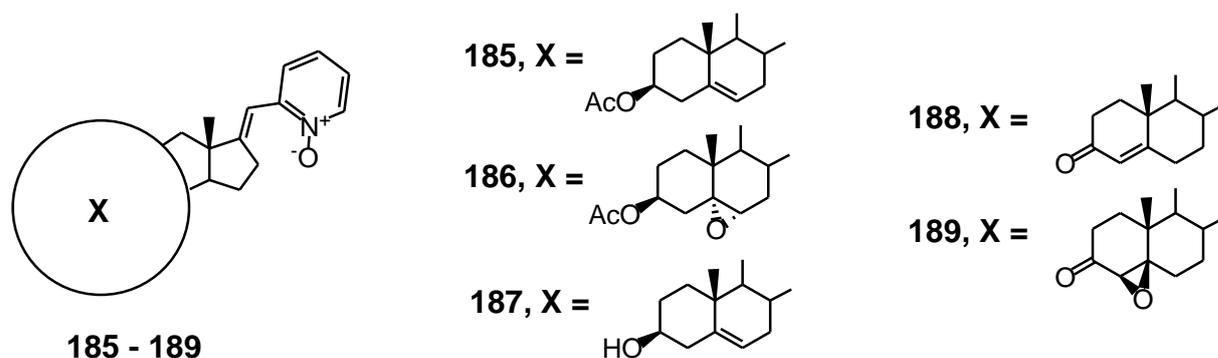


Рисунок 29 – Производные [17(20)E]-(N-окси)пиколинилиденандростана 185 – 189

Данные о биологической активности производных [17(20)E]-21-норpregна-5,17(20)-диена, содержащих другие гетероциклы представлены в основной части диссертации (раздел 4.1).

В заключение данного обзора нам хотелось подчеркнуть одну особенность исследования и разработки новых противоопухолевых препаратов на основе стероидных ингибиторов CYP17A1. Все экспериментальные исследования абиратерона, галетерона и их аналогов были проведены в академических и университетских лабораториях, а не в соответствующих подразделениях фармацевтических компаний. Эти работы внесли существенный вклад в развитие современной биомедицинской химии, а успех достигнут благодаря фундаментальным исследованиям специалистов в области биохимии, органической и биоорганической химии, молекулярной биологии, эндокринологии и экспериментальной онкологии.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3. 1. МАТЕРИАЛЫ

3.1.1. Реактивы, растворители и стандартные соединения

Культуральные среды, сыворотки и пластик получены от фирм “Gibco BRL”, “Costar” и “TPP Trasadingen”; фосфат-содержащий физиологический раствор (PBS) и раствор Хэнкса – от фирм “Sigma” и “ПанЭко”; химические реактивы - от фирм “Aldrich”, “Acros Organics” и “Merck”; органические растворители (хлороформ, пиридин, ацетонитрил, ацетон, бензол, толуол, петролейный эфир, хлористый метилен, диметилформамид, гексан, метанол, этанол, изопропанол, этилацетат, диэтиловый эфир, уксусная кислота, тетрагидрофуран), были очищены стандартными методами.

Прегненолон был получен от фирмы “MP Biomedicals”, прогестерон и 17 α -гидроксипрогестерон – от фирмы “Acros”, абиратерон 1 – от фирмы “ChemLeader Ltd” (Shanghai, China), галетерон 2 – от компании “Seleckchem”. Андростендион был синтезирован окислением дегидроэпиандростерона [134], азотсодержащие стероидные производные 190 – 222 и необходимые промежуточные продукты были синтезированы, как описано в работах [43, 135-140] ранее.

3.1.2. Синтез оксазолинов 190 и 217

3.1.2.1. Общая методика

Суспензию 3 β -ацетоксипрегн-17(20)-еновой или 3 β -ацетоксиандрост-16-ен-17-карбоновой кислоты (1 ммоль) и Ph₃P (1.048 г, 4 ммоль) в безводном ацетонитриле (10 мл) при интенсивном перемешивании охлаждали до 2°C и в течение 5 мин по каплям добавляли раствор CCl₄ (0.92 мл, 10 ммоль) в ацетонитриле (4 мл). Смесь перемешивали при 2°C до полного растворения осадка (около 90 мин). Затем по каплям при перемешивании и охлаждении добавляли смесь этаноламина (86 мкл, 1,4 ммоль), триэтиламина (710 мкл, 5,0 ммоль) и безводного ацетонитрила (4 мл), перемешивали 10 мин при 2°C, охлаждение убирали и перемешивали при комнатной температуре в течение 1—

1,5 ч, контролируя содержание промежуточного образовавшегося этаноламида и непрореагировавшего Ph_3P методом ТСХ. В случае если Ph_3P полностью прореагировал, а этаноламид еще присутствовал, к смеси добавляли дополнительное количество Ph_3P (262 мг, 1 ммоль) и смесь продолжали перемешивать до полного исчезновения этаноламида. Смесь упаривали, остаток разбавляли бензолом (40 мл), последовательно промывали насыщенным раствором K_2CO_3 (10 мл), насыщенным раствором Na_2SO_4 (20 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали досуха. Остаток растворяли в кипящем толуоле (9 мл), раствор разбавляли кипящим гексаном (12 мл) и оставляли на 2 ч при комнатной температуре, после чего кристаллический Ph_3O отделяли фильтрованием и промывали холодной смесью толуол – гексан (3:4). Объединенный фильтрат упаривали и остаток разделяли КЖХ в системе гексан – ацетон (2:1). Полученные ацетаты оксазолинов гидролизовали кипячением со смесью K_2CO_3 (1 г), метанола (5 мл) и воды (3 мл) в течение 40 мин. К смеси добавляли воду (10 мл), продукты экстрагировали CHCl_3 (3×20 мл), экстракт сушили над Na_2SO_4 , оксазолины 190 и 217 выделяли КЖХ в системе гексан – этилацетат (3:1), и дважды кристаллизовали из ацетона (Рисунок 30).

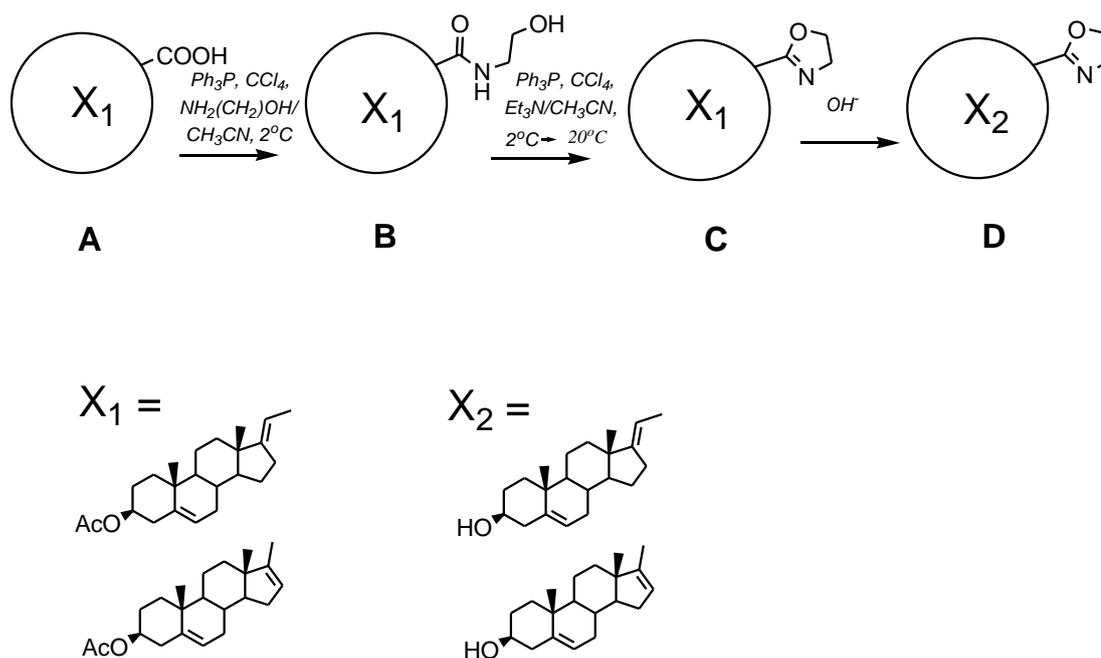


Рисунок 30 – Схема синтеза соединений 190 и 217

3.1.2.2. 2'-{[(E)-3β-Гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]-метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 190

Выход 276 мг (0,78 ммоль, 78%); белые иглы, т.пл. 189°C. МСВР, рассчитано для $[C_{23}H_{34}NO_2]^+$: 356,2601, найдено: 356,2601. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 0.83 (3H, с, H-18); 1.02 (3H, с, H-19); 2.74 (2H, м, H-16); 3.91 и 4.25 (каждый 2H, м, CH_2 , оксазолиновый); 3.51 (1H, м, H-3); 3.88 (2H, м, H-50); 4.22 (2H, м, H-40); 5.36 (1H, м, H-6); 5.61 (1H, t, $J = 2,3$ Hz, H-20). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): 17.50, 18.56, 21.06, 24.48 (C-18, C-19, C-11, C-15); 30.18, 31.88, 32.86, 34.03, 35.31, 35.49, 35.81, 38.76, 42.37 (C-1, C-2, C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-12, C-16); 45.86, 50.39, 53.28, 53.97, (C-9, C-13, C-14, C-40); 66.97 (C-50); 105.45 (C-20); 124.09 (C-4); 158.24, 165.35, 170.91 (C-5, C-17, C-20); 199.45 (C-3).

3.1.2.3. 2'-(3β-Гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 217

Выход 276 мг (185 мг, 0,54 ммоль, 54%); белые иглы, т.пл. 165°C. МСВР, рассчитано для $[C_{22}H_{32}NO_2]^+$: 342,2428, найдено: 342,2419; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 0.99 (3H, с, H-18); 1.09 (3H, с, H-19); 3.42 (1H, м, H-3); 3.89 и 4.25 (каждый 2H, м, CH_2 -оксазолиновый); 5.38 (1H, м, H-6); 6.54 (1H, дд, $J_1=2,0$ Гц, $J_2=3,2$ Гц H-16). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): 14.9 (C-18); 18.4 (C-19); 20.5 (C-11); 30.4 (C-8); 30.9 (C-2); 31.2 (C-7); 31.4 (C-15); 34.8 (C-12); 36.5 (C-10); 37.1 (C-1); 41.7 (C-4); 46.1 (C-13); 50.8 (C-9); 53.9 (C-5'); 57.0 (C-14); 66.0 (C-4'); 71.0 (C-3); 120.6 (C-6); 138.8 (C-16); 141.4 (C-5); 143.0 (C-17); 162.8 (C-2').

3.1.3. Синтез оксазолинов 223 – 227

Синтез оксазолинов 223 – 227 был проведен по методике, представленной в разделе 3.1.2.1, с использованием в качестве аминокомпонента 2-метил-2-аминопропанола (В) и аминоспиртов (С, D, E, F, полученных стереоспецифическим восстановлением [141] (L)- аланина, (D)-аланина, (L)-фенилглицина и D-фенилглицина, соответственно) (Рисунок 31).

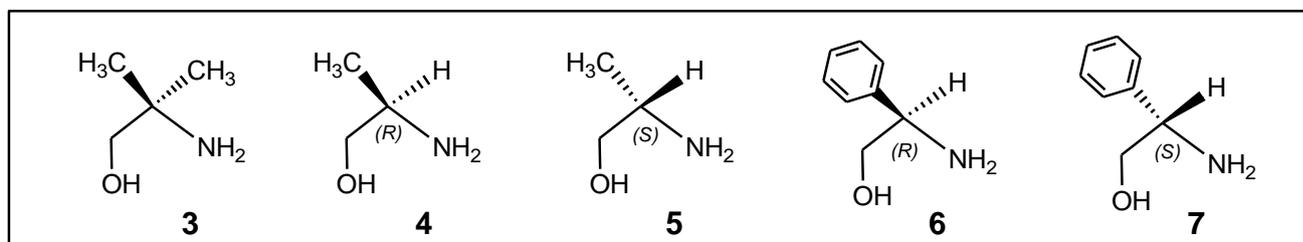
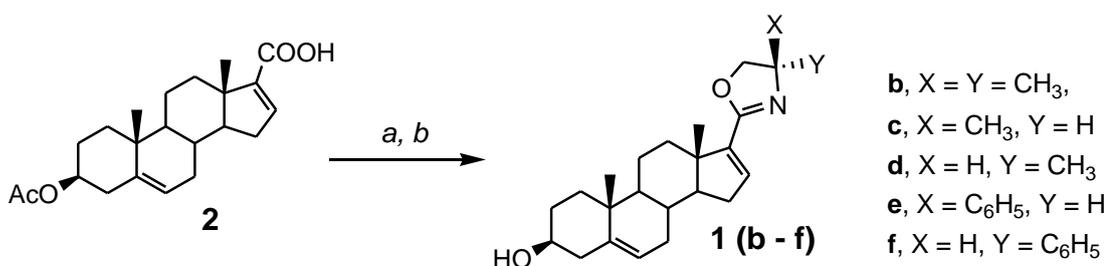


Рисунок 31 – Схема синтеза соединений 223 – 227

3.1.3.1. 2'-(3β-Гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-4'4'-диметил-1',3'-оксазол 223

Соединение 223 (153 мг, 0,43 ммоль, 43%) получили перекристаллизацией из EtOH в виде белых игл, т.пл. = 185°C; МСВР, рассчитано для [C₂₄H₃₆NO₂]⁺: 370,2741, найдено 370,2744; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 0.95 (3H, с, H-18); 1.04 (3H, с, H-19); 1.28 (6H, с, CH₃-4'); 2.28 (4H, м, H-4 и H-15); 3.51 (1H, м, H-3); 3.86 (2H, АБ-система, CH₂-5'); 5.36 (1H, м, H-6); 6.45 (1H, с, H-16). ¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): 15.80; 19.30; 20.68; 28.35 (x2); 30.35; 31.56; 31.65; 31.89; 34.79; 37.13; 42.33; 46.27; 50.57; 56.89; 67.48; 70.33; 71.71; 77.62; 121.20; 137.58; 141.32; 143.60; 159.06.

3.1.3.2. 2'-(3β-Гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-4'(R)-метил-1',3'-оксазол 224

Соединение 224 (146 мг, 0,41 ммоль, 41%) получили перекристаллизацией из EtOH в виде белых игл, т.пл. = 197°C; МСВР, рассчитано для [C₂₃H₃₄NO₂]⁺: 356,2584, найдено: 356,2591; ¹H ЯМР: (400 МГц, CDCl₃): δ 0.94 (3H, с, H-18); 1.03 (3H, с, H-19); 1.24 (3H, д, J=6,2 Гц, CH₃-4'); 2.28 (4H, м, H-4 и H-15); 3.49 (1H, м, H-3); 3.72 (1H, м, CH-4'), 4.24 (2H, м, CH₂-5'); 5.34 (1H, м, H-6); 6.46 (1H, дд, J₁=3,2 Гц, J₂=1,9 Гц, H-16). ¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): 15.95; 19.40; 20.79; 21.62;

30.46; 31.66; 31.73; 32.03; 35.05; 36.83; 37.27; 42.42; 46.36; 50.64; 56.92; 62.04; 71.74; 72.57; 121.23; 138.21; 141.47; 143.40; 160.64.

3.1.3.3. 2'-(3β-Гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-4'(S)-метил-1',3'-оксахол 225

Соединение 225 (153 мг, 0,43 ммоль, 43%) получили перекристаллизацией из EtOH в виде белых игл, т.пл. = 212°C; МСВР, рассчитано для $[C_{23}H_{34}NO_2]^+$: 356,2584, найдено: 356,2594; 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): 0.96 (3H, с, H-18); 1.04 (3H, с, H-19); 1.26 (3H, д, $J=6,5$ Гц, CH_3-4'); 2.29 (м, 4H, H-4 и H-15), 3.51 (м, 1H, H-3), 3.72 (м, 1H, $CH-4'$), 4.26 (м, 2H, CH_2-5'), 5.35 (м, 1H, H-6), 6.56 (дд, $J_1=3,1$ Гц, $J_2=1,9$ Гц, 1H, H-16). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): 16.01; 19.44; 20.81; 21.71; 30.49; 31.70; 31.78; 32.05; 35.04; 36.85; 37.26; 42.46; 46.34; 50.69; 57.06; 62.18; 71.83; 72.54; 121.29; 138.20; 141.47; 143.46; 160.42.

3.1.3.4. 2'-(3β- Гидроксиандроста -5,16- диен -17-ил)-4',5'-дигидро-4'(R)-фенил-1',3'-оксазол 226

Соединение 226 (150 мг, 0,36 ммоль, 36%) получили перекристаллизацией из EtOH в виде белых игл, т.пл. = 198°C; МСВР, рассчитано для $[C_{28}H_{36}NO_2]^+$: 418,2741, найдено 418,2751; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 1.04 (3H, с, H-18); 1.06 (3H, с, H-19); 3.52 (1H, м, H-3); 4.01 (1H, т, $J=8,1$ Гц, $CH-5'$); 4.56 (1H, дд, $J_1=10,0$ Гц, $J_2=8,1$ Гц, CH_2-5'); 5.29 (1H, дд, $J_1=9,9$ Гц, $J_2=8,0$ Гц, CH_2-4'); 5.37 (1H, м, H-6); 6.57 (1H, дд, $J_1=3,0$ Гц, $J_2=1,8$ Гц, H-16); 7.24 (2H, м, фенил); 7.33 (3H, и, фенил); ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$): 16.04; 19.46; 20.86; 30.52; 31.73; 31.80; 32.19; 35.13; 36.88; 37.28; 42.46; 46.50; 50.77; 57.16; 70.24; 71.87; 73.48; 121.31; 126.67; 127.48; 128.74; 139.00; 141.49; 143.07; 143.32; 161.89.

3.1.3.5. 2'-(3β-гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-4'(S)-фенил-1',3'-оксазол 227

Соединение 227 (159 мг, 0,38 ммоль, 38%) получили перекристаллизацией из EtOH в виде белых игл, т.пл. = 172°C; МСВР, рассчитано для $[C_{28}H_{36}NO_2]^+$: 418,2741, найдено 418,2738; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): 1.03 (с, 3H, H-18), 1.06 (с, 3H, H-19), 3.52 (м, 1H, H-3), 3.98 (т, $J=8,1$ Гц, 1H, $CH-5'$), 4.57 (дд, $J_1=10,1$ Гц, $J_2=8,2$ Гц, 1H, CH_2-5'), 5.29 (дд, $J_1=9,7$ Гц, $J_2=8,3$ Гц, 1H, CH_2-4'), 5.37 (м, 1H, H-6),

6.56 (дд, $J_1=3,0$ Гц, $J_2=1,8$ Гц, 1H, H-16), 7.25 (м, 2H, фенил), 7.31 (м, 3H, фенил). ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3): 16.04; 19.46; 20.86; 30.52; 31.73; 31.80; 32.19; 35.13; 36.88; 37.28; 42.46; 46.50; 50.77; 57.16; 70.24; 71.87; 73.48; 121.31; 126.67; 127.48; 128.74; 139.00; 141.49; 143.07; 143.32; 161.89.

3.2. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектры регистрировались на приборах AMX-III (Bruker, 400 МГц) и Avance III (Bruker, 300 МГц) в CDCl_3 или CD_3OD ; значения δ CHCl_3 в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР: 7.25 м.д. и 77.16 м.д. соответственно. Все эксперименты были проведены к.х.н. Новиковым Р.А. (ИМБ РАН).

Масс-спектры высокого разрешения (МСВР) регистрировались на приборе Bruker «Apex Ultra» FT ICR MS в режиме ионизации электроспреем. Все эксперименты были проведены к.б.н. Завьяловой М.Г. (ИБМХ).

Спектры поглощения регистрировались в кварцевой кювете с оптическим путем 1 см на спектрофотометре «Cary Spectra 100”.

3.3. РАСЧЕТНЫЕ МЕТОДЫ

3.3.1. Молекулярный докинг

Пространственные структуры исследованных соединений были построены при помощи программы SYBYL 8.1 (“Tripos Inc.”, США). Оптимизацию структур соединений и белка проводили методом минимизации энергии по методу Пауэлла с использованием силового поля Tripos в вакууме. Значения парциальных атомных зарядов для белка рассчитывали методом Gasteiger-Huckel, а низкомолекулярных лигандов – полуэмпирическим квантохимическим методом AM1.

Моделирование взаимодействия исследованных соединений с цитохромом CYP17A1 проводили с использованием программы молекулярного докинга DOCK 6.5. Поверхность, доступная для растворителя на мишени для докинга, была рассчитана по алгоритму Конолли с пробным радиусом равным 1.4 Å. Поля для электростатического потенциала и потенциала Ван дер Ваальса мишени были сгенерированы на решётке в шагом 0.3 Å; “отсечка” для нековалентных взаимодействий составляла 12.0 Å. За место связывания лигандов в активном

центре фермента принимали область вокруг молекулы абиратерона в пространственной структуре комплекса 3ruk на расстоянии 5.0 Å. Отбор комплексов проводили по величинам оценочной функции Dock. За правильное расположение лиганда принимали конформации, для которых среднеквадратичное отклонение (RMSD) не превышало 1.5 Å по сравнению со стероидным скелетом абиратерона в структуре 3ruk.

Все расчёты были проведены д.б.н. Веселовским А.В. и Щербаковым К.А. (ИБМХ).

3.3.2. Молекулярная динамика

Полноатомная модель комплекса CYP17A1 с соединением 190 была построена методом равновесной молекулярной динамики. Молекула абиратерона 1 в активном центре была замещена на молекулу соединения 190 путем совмещения атомов стероидного остова. Структура была сольватирована (результатирующий размер ячейки 90×100×90 Å) с добавлением ионов Na⁺ и Cl⁻ в концентрации 0.15 М, соответствующей физиологическим условиям. Геометрия лиганда в активном центре была предварительно оптимизирована путем минимизации потенциальной энергии. Затем так же была оптимизирована геометрия всей системы, методом ланжевеновской динамики постепенно поднята температура от 0 до 300 и рассчитана траектория длительностью 70 нс. Для избежания неравновесных эффектов при анализе траектории начальные 20 нс не учитывались. Представленная структура комплекса является наиболее близкой к средней по траектории.

Для расчетов молекулярной динамики использовали потенциал CHARMM27 с коррекцией CMAP. Параметры для лиганда получены с помощью сервера SwissParam [142]. Частичные заряды группы гема взяты из работы [143]. Использовали модель воды TIPp. Для подготовки структурных моделей, обработки траекторий молекулярной динамики и визуализации использовали программу VMD [144]. Расчеты проводили с помощью рабочей станции, оснащенной восемью ядрами Intel(R) Xeon(R) CPU E5-1620 v3 и ускорителем GPGPU (NVIDIA CUDA). Для оптимизации геометрии и расчетов траекторий

молекулярной динамики использовали программу NAMD [145]. Все расчёты были выполнены к.ф.-м.н Ткачёвым Я.В. (ИМБ РАН).

3.4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле фирмы “Acros” (60 – 200 мкм и 35 – 70 мкм); тонкослойную хроматографию (ТСХ) – на пластинках “Kieselgel UV254“, “HPTLC Kieselgel UV254“ и “PSC Kieselgel UV254” фирмы “Merck”. Обнаружение веществ на хроматограммах проводили в УФ свете (254 нм), проявлением парами иода, 3% раствором молибдата аммония в 5% водной H₂SO₄ с последующим нагреванием. Хроматографию проводили в следующих системах: А – гексан – ацетон (3:2); Б – гексан - ацетон (2:1); В – гексан - iPrOH (6:1); Г – гексан – ацетон (4:1); Д - гексан: EtOAc (3:1); Е – гексан – ацетон (3:1); Ж – бензол – ацетон (10:1).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе Agilent 1100 chromatograph (Agilent Technologies, USA), снабженном детектором G1315B (Agilent Technologies, USA), на колонке Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 мкм), с использованием в качестве элюента смеси 0.1% водного раствора трифторуксусной кислоты и метанола (1:3) в изократическом режиме, со скоростью 0.5 мл / мин.

3.5. ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СУР17А1 СОЕДИНЕНИЯМИ 1, 190, 217, 223 – 227 [146]

3.5.1. Получение микросом

Тестикулы, полученные от самцов крыс (12-недельного возраста с весом тела 200 - 250 г, полученных из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) были промыты изотоническим раствором NaCl и гомогенизированы при помощи гомогенизатора “Т 25 digital Ultra-Turax” в буфере (pH 7.4), содержащем 0.25 М сахарозу, 0.1 М HEPES, 1мМ DTT, 1 мМ PMSF и 1 мМ EDTA (500 мкл / 1 г ткани). Гомогенат центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч. Осадок промыли PBS и ресуспендировали в буфере, содержащем PBS, 0.1 мМ MgCl₂, 0.01 мМ PMSF, 0.01 мМ EDTA (250 мкл / 1 г изначально полученного гомогената). В результате

получали препарат микросом, в котором определяли содержание белка методом Лоури, используя в качестве стандарта BSA (V фракцию).

3.5.2. Проведение анализа

Аликвоту препарата микросом (30 мкг белка) преинкубировали при 37°C 10 мин с 1 mM NADPH в рабочем буфере, содержащем пропиленгликоль (30% v/v), после чего добавляли прогестерон и исследуемые ингибиторы (до концентрации 25 мкМ и 5 мкМ, соответственно). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 45 мин и затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.1 M HCl. Каждый образец экстрагировали EtOAc (500 мкл x3), экстракты высушивали в токе аргона. Остатки растворяли в метаноле (50 мкл), после чего аликвоты объемом 10 мкл анализировали методом ВЭЖХ (раздел 3.4). Количества стероидов (прогестерона, 17 α -гидроксипрогестерона, андростендиона) в образце рассчитывали из калибровочной зависимости (площадь пика от концентрации). Для построения калибровочной зависимости рассчитанные количества прогестерона, 17 α -гидроксипрогестерона и андростендиона добавляли к препарату микросом, затем пробы обрабатывались и анализировались, как указано выше.

3.6. ЭКСПЕРИМЕНТЫ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ

3.6.1. Клетки

Клетки карциномы простаты человека LNCaP, PC-3, DU-145 и 22Rv1 были получены из ATCC (Rockville, MD). Клетки выращивали в 96-луночных планшетах или флаконах площадью 25 см², культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FCS, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 1.0%.

3.6.2. Оценка антипролиферативной активности соединений 190 – 227 в клетках LNCaP и PC-3 методом МТТ [147]

Клетки LNCaP и PC-3 инкубировали в 96-луночных планшетах с исследуемыми соединениями в различных концентрациях в течение 96 ч; затем культуральную среду удаляли, в каждую ячейку добавляли 125 мкл PBS,

содержащего МТТ (1 мг/мл) и клетки инкубировали 4 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 125 мкл раствора 0.1 М HCl в i-PrOH, содержащего 10% тритона X-100. Через 2 ч в каждой ячейке измеряли оптическое поглощение при 540 нм и 690 нм с использованием прибора microplate reader “Multiscan EX” (Thermo Scientific, USA). Показание МТТ-теста (разность поглощения при 540 нм и 690 нм) усредняли по шести независимым определениям, каждый эксперимент проводили в трех повторах. Показание МТТ-теста в отсутствии исследуемых соединений принимали за 100%. Значения IC50 (концентрации исследуемого соединения, вызывающее 50% ингибирование роста клеток) рассчитывали из графика: показание МТТ-теста (% от контроля) от концентрации.

3.6.3. Оценка влияния соединений 190, 217 и абиратерона 1 на апоптоз в клетках карциномы простаты

Клетки PC-3 инкубировали в 96-луночных планшетах с соединениями 190, 217 и абиратероном 1 в концентрациях 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ и 40 мкМ при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч. В качестве контроля использовали клетки PC-3, инкубированные в растворе Хенкса. Клетки обрабатывали трипсином (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), ресуспендировали в PBS и обрабатывали реактивами Annexin V-FITC и пропидиум иодидом (PI) из набора “FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)”. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), как было описано в работах [148, 149]. В каждой пробе анализировали 5 X 10⁴ клеток. Измерения проводили в четырех повторах; достоверность межгрупповых отличий оценивали с помощью t-критерия. Отличия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Клетки DU-145 инкубировали в 96-луночных планшетах с соединением 190 и абиратероном 1 в концентрации 60 мкМ при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. В качестве контроля использовали клетки DU-145, инкубированные в растворе Хенкса. Клетки обрабатывали трипсином (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном

цитофлуориметре Muse (Millipore) с помощью наборов реактивов “Muse™ Caspase-3/7 Kit”; “Muse™ PI3K/MAPK Dual Pathway Activation Kit”; “Muse™ Bcl-2 Activation Dual Detection Kit” по протоколам фирмы-изготовителя. В каждой пробе анализировали не менее 2000 клеток. Измерения проводили в трех повторах; достоверность межгрупповых отличий оценивали с помощью t-критерия. Отличия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

3.7. ОПЫТЫ НА ЖИВОТНЫХ

3.7.1. Животные

Самцы мышей линий Balb/c nude и C57BL/6 возрастом 6 - 10 недель и весом 20-25 г были получены из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Мыши содержались в стерильной среде при контролируемом освещении и получении пищи и воды *ad libitum*. Все опыты на животных были проведены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Протоколы экспериментов утверждены локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва).

3.7.2. Фармакокинетика оксазолина 190 и абиратерона при пероральном введении мышам

Самцы мышей C57BL/6, разделенные на группы по 3 особи, получили препарат оксазолина 190 и абиратерона 1 перорально в разовой дозе 100 мг/кг. Образцы крови (0.5 мл) забирали у каждого животного через 30 мин, 1 час и далее каждые 2 часа в течение суток после введения препаратов. Забор крови проводился из ярёмной вены животных. Отобранную кровь центрифугировали, полученную плазму экстрагировали Et₂O (500 мкл X 3). Полученные экстракты высушивали в токе аргона; остатки растворяли в метаноле, после чего аликвоты (1 мкл) анализировали при помощи ВЖЭХ (раздел 3.4). Для построения калибровочной зависимости к аликвоте крови мыши из контрольной группы добавляли рассчитанное количество препарата и данные обрабатывали, как описано в работе [150].

3.7.3. Влияние оксазолина 190 и абиратерона на уровень тестостерона у мышей

Самцы мышей линии C57BL/6 были разделены на группы по 5 животных. Животные получали перорально оксазолин 190 и абиратерон 1 (300 мг/кг, 1 раз в сутки, в течение 10 суток). Образцы крови забирали из яремной вены (500 мкл) спустя 24 ч после 1-го, 4, 7-го и 10-го введения препаратов. Плазму крови отделяли центрифугированием; уровень тестостерона определяли при помощи стандартного набора “Testosterone ELISA Kit” (ab108666, Abcam) по протоколу фирмы-изготовителя.

3.7.4. Влияние оксазолина 190 и абиратерона на рост ксенографтов клеток 22Rv1 и DU-145 у мышей Balb/c nude

Противоопухолевый эффект абиратерона 1 и оксазолина 190 оценивался в ксенографтах, полученных подкожным введением клеток карциномы простаты человека DU-145 или 22Rv1 мышам линии Balb/c nude. Клетки DU-145 или 22Rv1 (5×10^6) имплантировались животным подкожно леволатерально с матригелем (Matrigel®, Matrix 1:1). После того, как размер опухоли достигал 80 мм³, животные были разделены на группы ($n = 6-10$), получавшие абиратерон 1 (150 или 300 мг/кг, *per os*, 1 раз в день, в течение 10 дней), оксазолин 190 (150 или 300 мг/кг, *per os*, 1 раз в день, в течение 10 дней) и контрольную. Размер опухоли и вес тела животных измеряли во всех группах на 3-й, 7-й, 10-й день эксперимента и на 3-й день после окончания эксперимента. Объем опухоли рассчитывали по формуле

$$V=\pi/6*(L*W*H),$$

где: V – объем; L – длина; W – ширина; H – толщина опухоли. Эффективность противоопухолевого эффекта оценивали в % TGI (tumor growth inhibition).

3.8. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Значения IC₅₀ в экспериментах были рассчитаны методом нелинейной регрессии с при помощи компьютерной программы «Graphpad Prism version 4.0 for Windows» и представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение (M ± SD).

Для статистической оценки влияния соединений на индукцию апоптоза и ингибирования активности CYP17A1 были проанализированы две независимые выборки данных, полученных в ходе двух несвязанных экспериментов. Анализ этих данных был произведен с использованием критерия Стьюдента. Статистически значимыми были признаны данные со значением $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде: среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Статистическую обработку экспериментов *in vivo* выполняли при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics Base v. 22.0 путем сравнения переменных с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SE$).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СТЕРОИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ

В литературном обзоре представлены современные данные о биологически активных азотсодержащих стероидных производных – новых потенциальных препаратах для лечения РПЖ. Работы по дизайну и синтезу новых азотсодержащих стероидных производных в течение ряда лет проводились в лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ИБМХ, а также в лаборатории Синтеза стероидов ИБОХ НАНБ (Минск, Республика Беларусь). Первой задачей настоящей диссертации явился первичный скрининг антипролиферативной активности этих соединений в клетках карциномы простаты, проводимый целью нахождения корреляции структура – активность, а также выбора наиболее перспективных кандидатов для проведения дальнейших исследований.

4.1.1. Антипролиферативная активность новых азотсодержащих стероидных производных в клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3

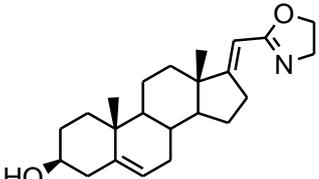
Очевидно, что работа по исследованию биологической активности новых соединений, представляющих интерес в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, должна начинаться с экспериментов в культуре раковых клеток, в которых потенциальный кандидат обязан эффективно подавлять их рост и пролиферацию. Общая формула исследованных в данной работе азотсодержащих производных андростана и прегнана была приведена на Рисунке 2. Исследованные соединения различались структурой заместителей в стероидном цикле (X), структурой азотсодержащего гетероцикла (Y), способом соединения стероида и гетероцикла, а также полярностью молекулы (оцениваемой по значению параметра ClogP). Синтез этих соединений описан в

работах [43,135-140]; структуры представлены в Таблице 1; всего в работе было проанализировано 38 новых стероидных производных.

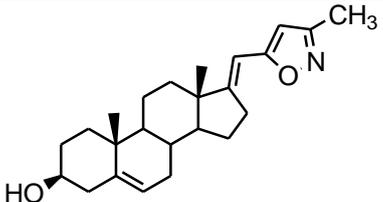
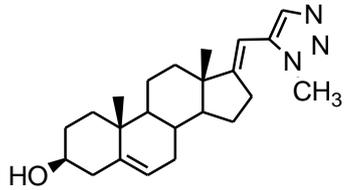
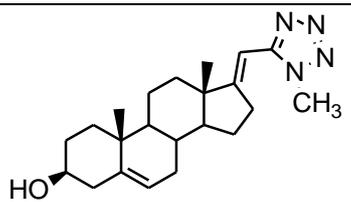
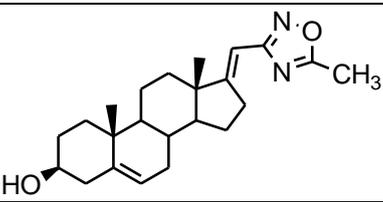
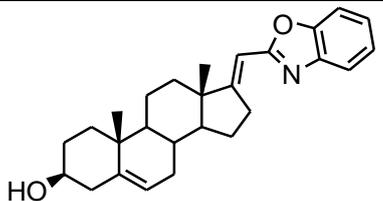
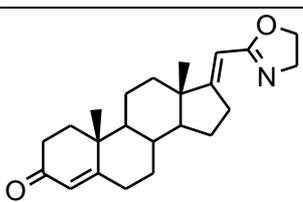
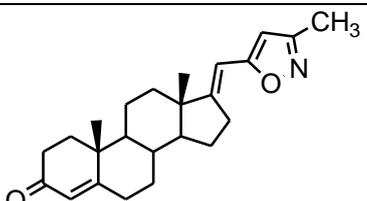
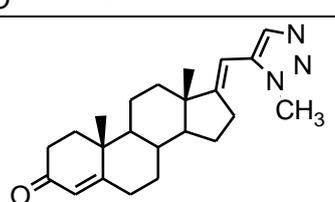
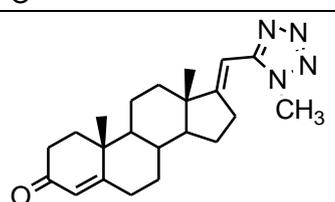
Оценка способности синтезированных соединений подавлять рост и пролиферацию клеток карциномы простаты LNCaP и PC-3 (стандартных клеточных моделей для исследования андроген-зависимых и андроген-независимых форм РПЖ, соответственно) была проведена с использованием метода [147], основанного на реакции митохондриального восстановления желтого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-диметилтетразолий бромида (МТТ) в красно-фиолетовый 1-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-дифенилформаза. Этот метод показывает хорошую корреляцию с количеством жизнеспособных клеток, клеточной пролиферацией и активностью митохондриальных ферментов. Известные стероидные ингибиторы СYP17A1 – абиратерон 1 и галетерон 2 – были использованы в качестве соединений сравнения.

Предварительные опыты показали, что все исследованные соединения незначительно влияли на жизнеспособность клеток PC-3 и LNCaP при 24 ч инкубации даже в высокой концентрации (> 50 мкМ), что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности. Однако, при 72-часовой и 96-часовой инкубации ряд соединений достоверно подавлял рост и пролиферацию клеток. Данные сведены в Таблицу 1.

Таблица 1 – влияние новых азотсодержащих стероидных производных на рост и пролиферацию клеток LNCaP и PC-3

Соединение (№)	Формула	C logP	Ингибирование роста клеток (IC ₅₀ , мкМ)	
			LNCaP	PC-3
1	2	3	4	5
190		4,929	19,9 ± 8,3	14,4 ± 4,9

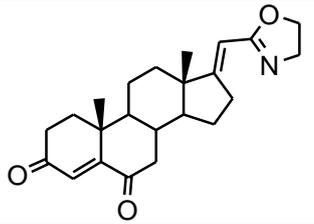
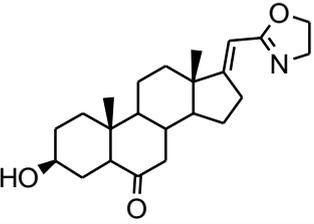
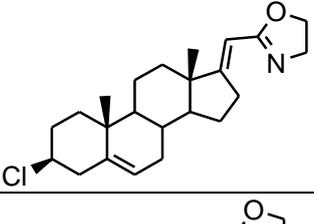
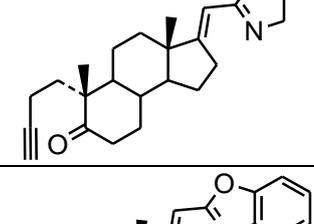
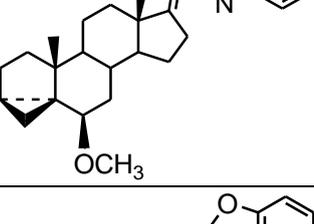
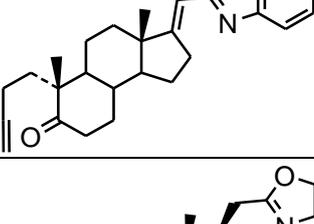
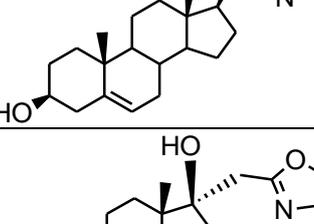
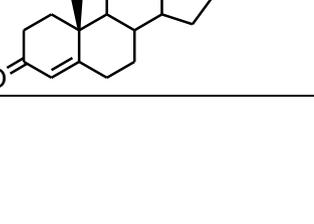
Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
191		5,439	30,9 ± 8,0	42,4 ± 9,2
192		4,519	> 50	> 50
193		4,842	> 50	> 50
194		4,812	35,9 ± 8,1	> 50
195		6,464	11,2 ± 3,0	9,7 ± 2,2
196		4,667	24,9 ± 8,0	17,4 ± 4,2
197		5,187	> 50	> 50
198		4,267	> 50	> 50
199		4,590	> 50	> 50

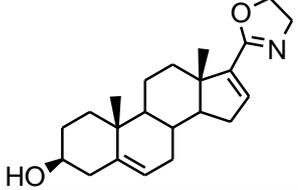
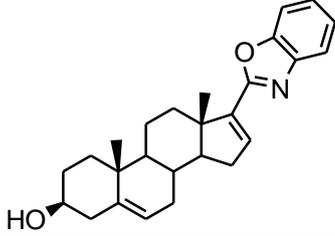
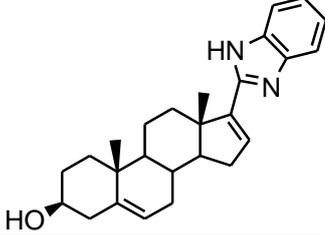
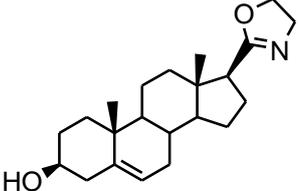
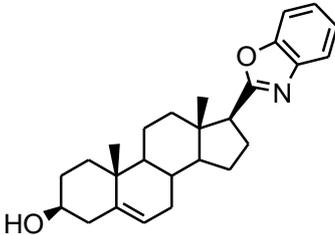
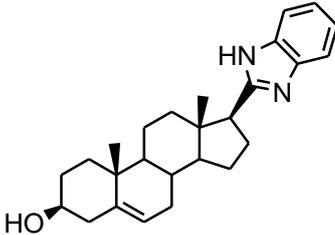
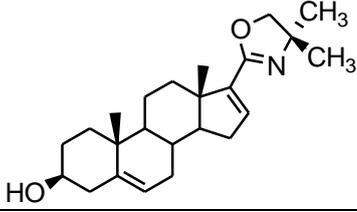
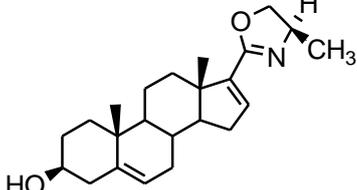
Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
200		4,560	> 50	> 50
201		6,212	23,9 ± 5,0	14,0 ± 4,2
202		5,967	> 50	> 50
203		4,148	> 50	> 50
204		4,148	> 50	> 50
205		6,920	> 50	> 50
206		5,645	> 50	> 50
207		5,845	43,5 ± 5,0	28,0 ± 4,2
208		4,207	> 50	> 50

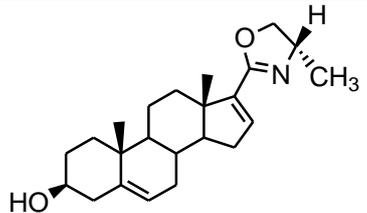
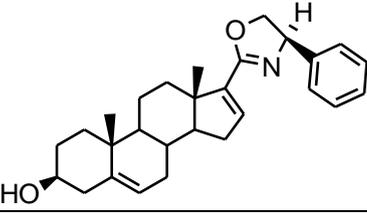
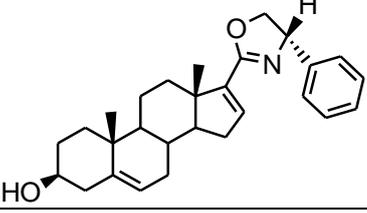
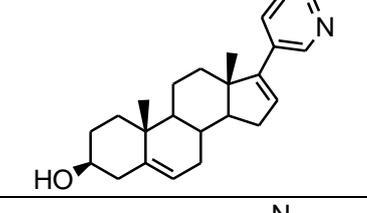
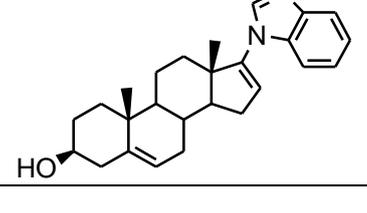
Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
209		2,845	> 50	> 50
210		2,924	> 50	> 50
211		6,849	> 50	39,4 ± 9,0
212		4,477	32,1 ± 6,6	15,9 ± 4,6
213		7,380	38,0 ± 5,6	> 50
214		6,012	19,0 ± 4,6	16,7 ± 4,6
215		5,158	> 50	> 50
216		3,564	> 50	> 50

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
217		4,220	$2,2 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,6$
218		5,935	$28,8 \pm 7,1$	$33,6 \pm 9,6$
219		6,085	$3,8 \pm 1,1$	$6,9 \pm 1,3$
220		4,449	$11,6 \pm 3,6$	$10,7 \pm 2,6$
221		6,609	> 50	> 50
222		6,159	$20,8 \pm 4,7$	$20,1 \pm 3,6$
223		5,258	$2,7 \pm 0,3$	$5,1 \pm 1,0$
224		4,739	$2,7 \pm 0,3$	$11,6 \pm 2,5$

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
225		4,739	$2,9 \pm 0,5$	$21,4 \pm 3,0$
226		5,978	$9,0 \pm 2,1$	$36,0 \pm 4,1$
227		5,978	$3,0 \pm 0,5$	$6,7 \pm 1,8$
1		5,165	$13,6 \pm 4,9$	$17,2 \pm 5,2$
2		5,822	$10,6 \pm 2,0$	$10,8 \pm 1,0$

4.1.2. Корреляция структура – антипролиферативная активность в ряду новых азотсодержащих стероидных производных

Данные, приведенные в таблице 1, указывают, что незначительные изменения в структуре сильно влияют на антипролиферативную активность азотсодержащих стероидных производных.

Соединения 190 – 195 являются производными 3β-гидрокси-21-норpregна-5,17(20)-диена, различающиеся структурой гетероцикла (Е-конфигурация заместителей при 17(20)-двойной связи для всех соединений была установлена в работах [43,135-137]). Оксазолин 190 и бензоксазол 195 проявляли значительную антипролиферативную активность, изоксазол 191 и оксадиазол 194 – слабую

активность, триазол 192 и тетразол 193 были неактивны. Активность аналогичных производных 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. Очевидно, в ряду 21-норпрегн-17(20)-енов наиболее перспективными оказались производные оксазолина и бензоксазола. Введение метильных, гидроксиметильных или циклогексильного заместителей в положение 4 оксазолинового цикла приводила к неактивным соединениям 202 – 205.

Оксазолиновые производные 21-норпрегн-17(20)-ена, содержащие 3 β -метокси-5-ен- (206), 6 β -метокси-3 α ,5 α -цикло- (207), 6-оксо-3 α ,5 α -цикло- (208), 3,6-диоксо-4-ен- (209), 3 β -гидрокси-6-оксо- (210) и 3 β -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; введение дополнительных полярных заместителей в кольца А и В стероидного фрагмента (209, 210) приводило к неактивным соединениям. Производное бензоксазола, содержащее 6 β -метокси-3 α ,5 α -цикло-фрагмент 213 проявляло слабую активность, а секо-А-производное 214 – умеренную активность.

Таким образом, наибольшую антипролиферативную активность в ряду 21-норпрегн-17(20)-ена проявляли 3 β -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. 17 β -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 (217) и бензимидазоловый (219) фрагменты значительно превосходили по антипролиферативной активности в клетках LNCaP и PC-3 абиратерон и галетерон. Следует отметить, что бензимидазол 219 является изомером галетерона 2, отличающийся тем, что стероидный фрагмент и азотсодержащий гетероцикл соединены образованием связи C17-C2'(а не C17-N1', как в галетероне). Производное андрост-16-ена 223, содержащее геминальный диметильный фрагмент в положении C4' оксазолинового цикла, обладал сильной антипролиферативной активностью, а соединения 224 – 227 с C4'-метильным или фенильным заместителем – значительной активностью. Мы не нашли корреляции между антипролиферативной активностью и стереохимической конфигурацией атома C4'. И в клетках LNCaP и в клетках PC-3 метил-содержащий C4'(R)-изомер 224 был активнее, чем метил-содержащий C4'(S)-изомер 225, но фенил-содержащий C4'(R)-изомер 226 был менее активен, чем фенил-содержащий C4'(S)-изомер 227.

Корреляция структура – антипролиферативная активность для новых азотсодержащих стероидных производных схематически представлена на Рисунке 32.

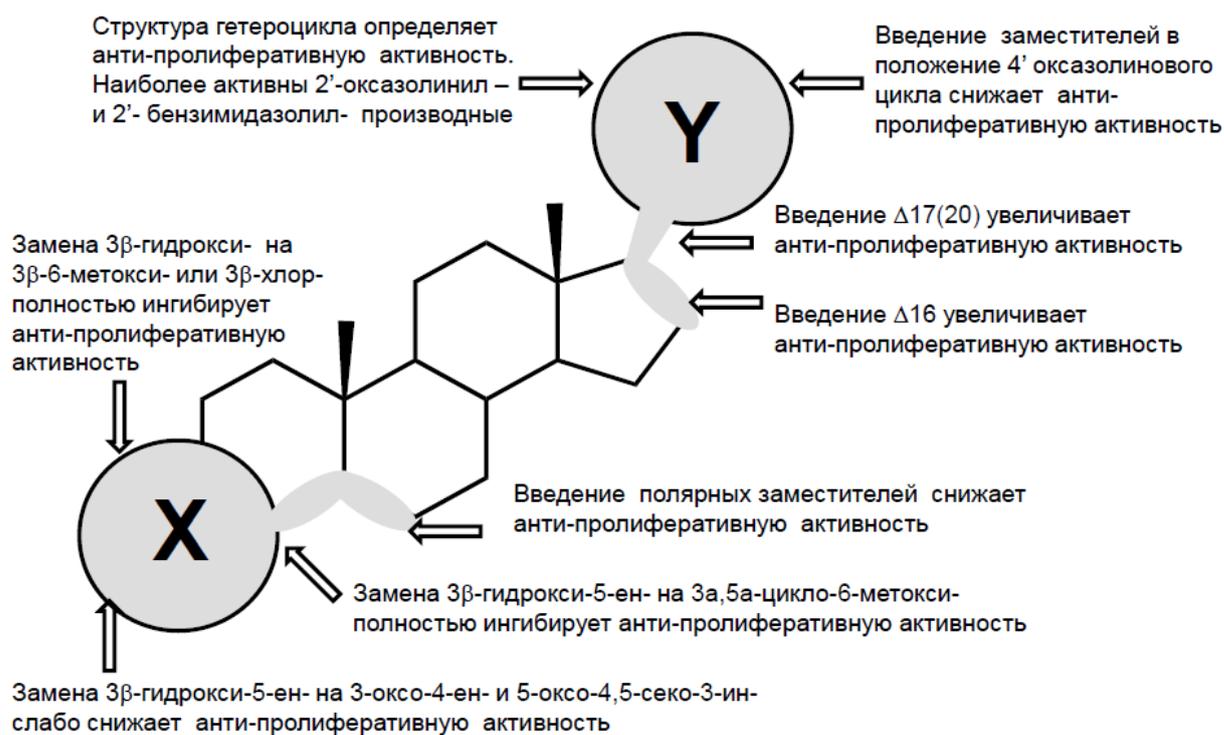
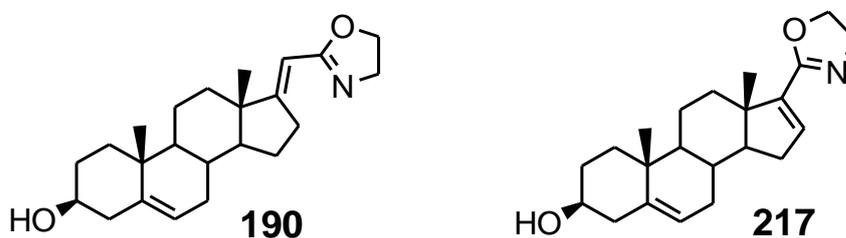


Рисунок 32 – Корреляция структура-антипролиферативная активность в ряду азотсодержащих производных андростана и прегнана

Для дальнейших исследований в рамках данной работы мы выбрали два соединения - 2'-{[(E)-3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 190 и 2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 217:



Оба эти соединения содержали оксазолиновый цикл, сопряженный с двойной связью, и проявляли высокую антипролиферативную активность в клетках LNCaP и PC-3.

4.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОКСАЗОЛИНОВ 190 И 217 С CYP17A1

Второй задачей работы было исследование взаимодействия оксазолин-содержащих производных 190 и 217 с основной потенциальной мишенью – 17 α -гидроксилазой/17,20-лиазой – CYP17A1. В данном разделе продемонстрировано, что соединения 190 и 217, содержащие оксазолиновый цикл, являются эффективными ингибиторами каталитической активности CYP17A1, а также проведено обсуждение моделей соответствующих фермент-ингибиторных комплексов, построенных методами молекулярного докинга и молекулярной динамики.

4.2.1. Ингибирование активности CYP17A1 оксазолинами 190, 217, 223 – 227

Оценку ингибиторной активности оксазолин-содержащих производных 190 и 217 по отношению к CYP17A1 мы проводили с использованием частично очищенной микросомальной фракции тестикул крысы в качестве источника фермента. Об активности CYP17A1 в микросомальной фракции судили по скорости превращению субстрата – прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон и андростендион (Рисунок 33).

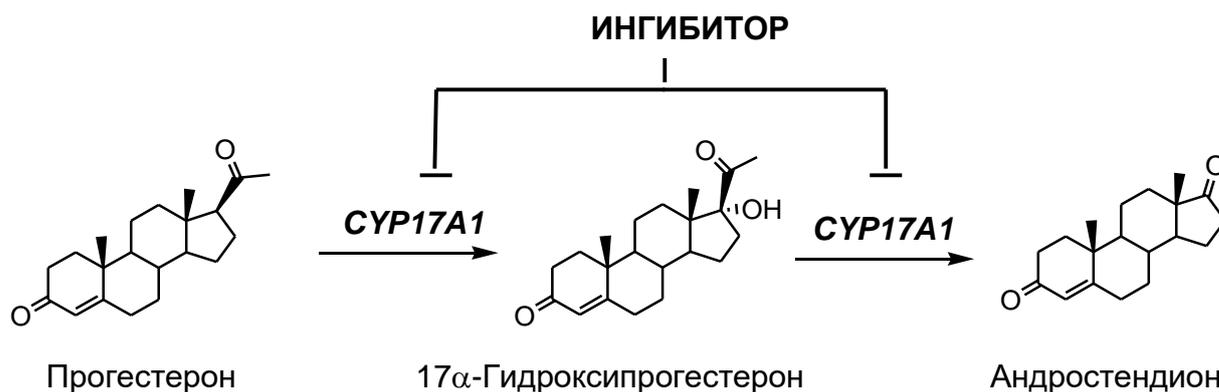


Рисунок 33 – Реакция превращения прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон и андростендион, катализируемая CYP17A1

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. На Рисунке 34 приведены типичные хроматограммы, доказывающие, что соединения 190 и 217 являются эффективными ингибиторами активности СYP17A1.

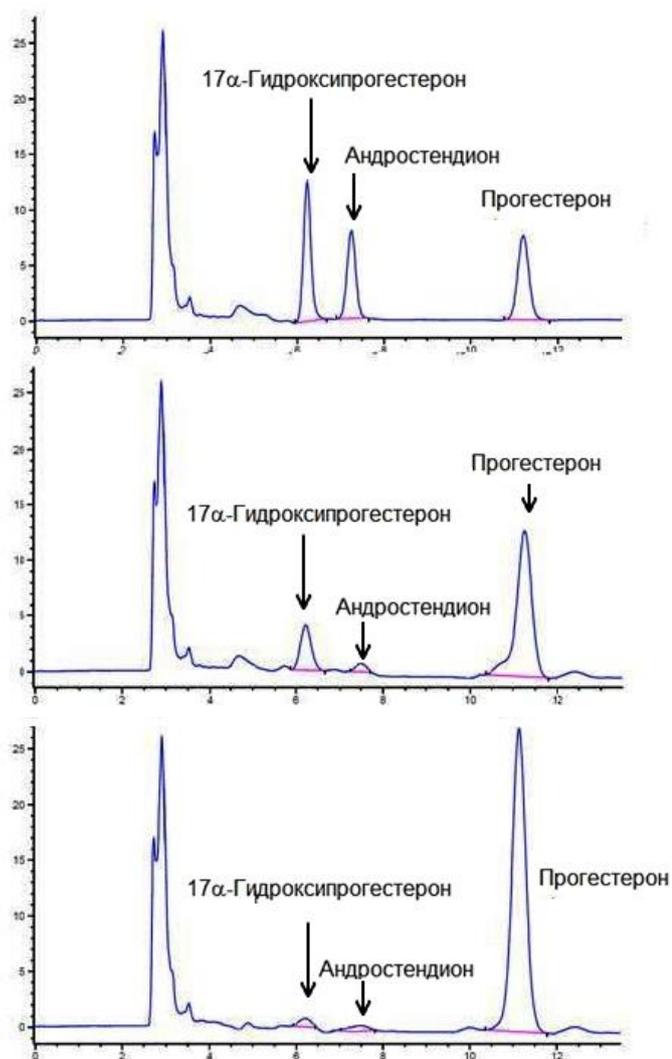


Рисунок 34 – ВЭЖХ-анализ СYP17A1-катализируемого превращения прогестерона в 17α-гидроксипрогестерон и андростендион: А – в отсутствии ингибитора; В – в присутствии оксазолина 190 (5 мкМ); С – в присутствии оксазолина 217 (5 мкМ)

Чтобы оценить влияние заместителей в оксазолиновом цикле на ингибиторную активность по отношению к CYP17A1, мы провели аналогичные опыты с оксазолинами 223 – 227 (Рисунок 35), отличающиеся от соединения 217 тем, что в положение 4' оксазолинового цикла введены дополнительные метильные или фенильные заместители. Следует отметить, что соединения 224 – 227 содержат дополнительный хиральный центр в положении 4' оксазолинового цикла.

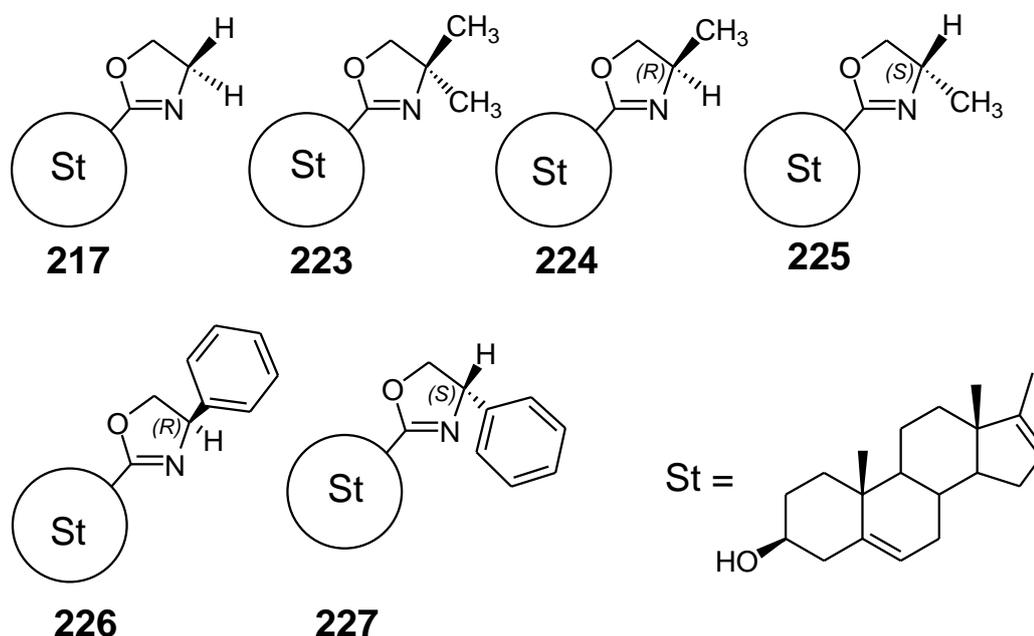


Рисунок 35 – Оксазолин 217 и 4'-замещенные оксазолины 223 – 227

Результаты оценки ингибиторной активности соединений 190, 217, 223 – 227 представлены в Таблице 2. Оксазолины 190 и 217 оказались не менее активными ингибитором 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'-диметилзамещенный оксазолин 223 были неактивны. Очевидно, что

введение дополнительных заместителей в оксазолиновый цикл производных андрост-16-ена сильно снижает ингибиторную активность. Можно заметить также, что оксазолин 190 продемонстрировал более высокую ингибиторную активность чем ранее полученное структурно родственное производное [17(20)E]-21-норпрегна-5,17(20)-диена 175 (см. литературный обзор), содержащее в качестве заместителя 2-пиридиновый цикл [131,132].

Таблица 2 – Ингибирование активности CYP17A1 оксазолинами 190, 217, 223 – 227 и абиратероном 1

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

Представленные результаты свидетельствуют, что введение 2'-оксазолинового заместителя в производные 21-норпрегн-16-ена и 21-норпрегн-17(20)-ена является перспективным подходом для получения новых активных стероидных ингибиторов CYP17A1. Кроме того можно отметить, что соединения 223 – 227, обладающие незначительной способностью ингибировать активность CYP17A1, показывали высокую антипролиферативную активность в клетках LNCaP и PC-3 (раздел 4.1).

4.2.2. Модели фермент-ингибиторных комплексов CYP17A1 с оксазолинами 190, 217, 223 – 227

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. Структуры фермент-ингибиторных комплексов представлены на Рисунке 36.

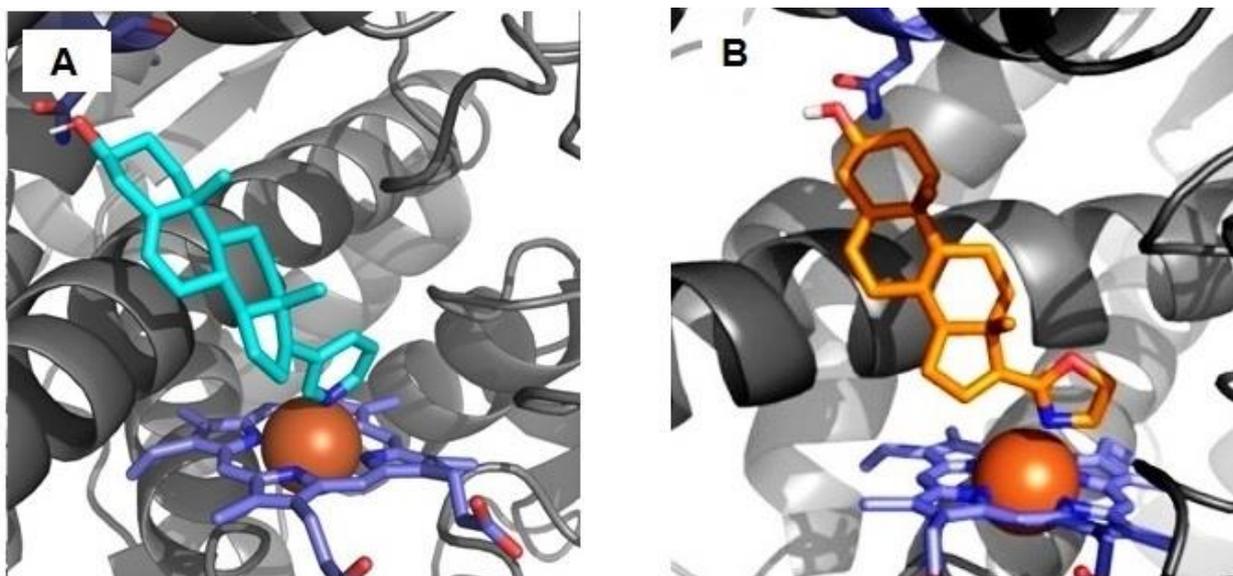


Рисунок 36 – Модели комплексов CYP17A1- абиратерон 1 (А) и CYP17A1 - оксазолин 217 (В), построенные методом молекулярного докинга

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 $\Theta_{C17-C2'}$ легко позволяет атому N оксазолинового цикла войти в координационную сферу Fe гема.

Мы также построили модели фермент-ингибиторных комплексов CYP17A1 с соединениями 223 – 227, содержащими метильные или фенильные заместители в оксазолиновом цикле. Результаты докинга этих соединений в активный центр CYP17A1 представлены на Рисунке 37.

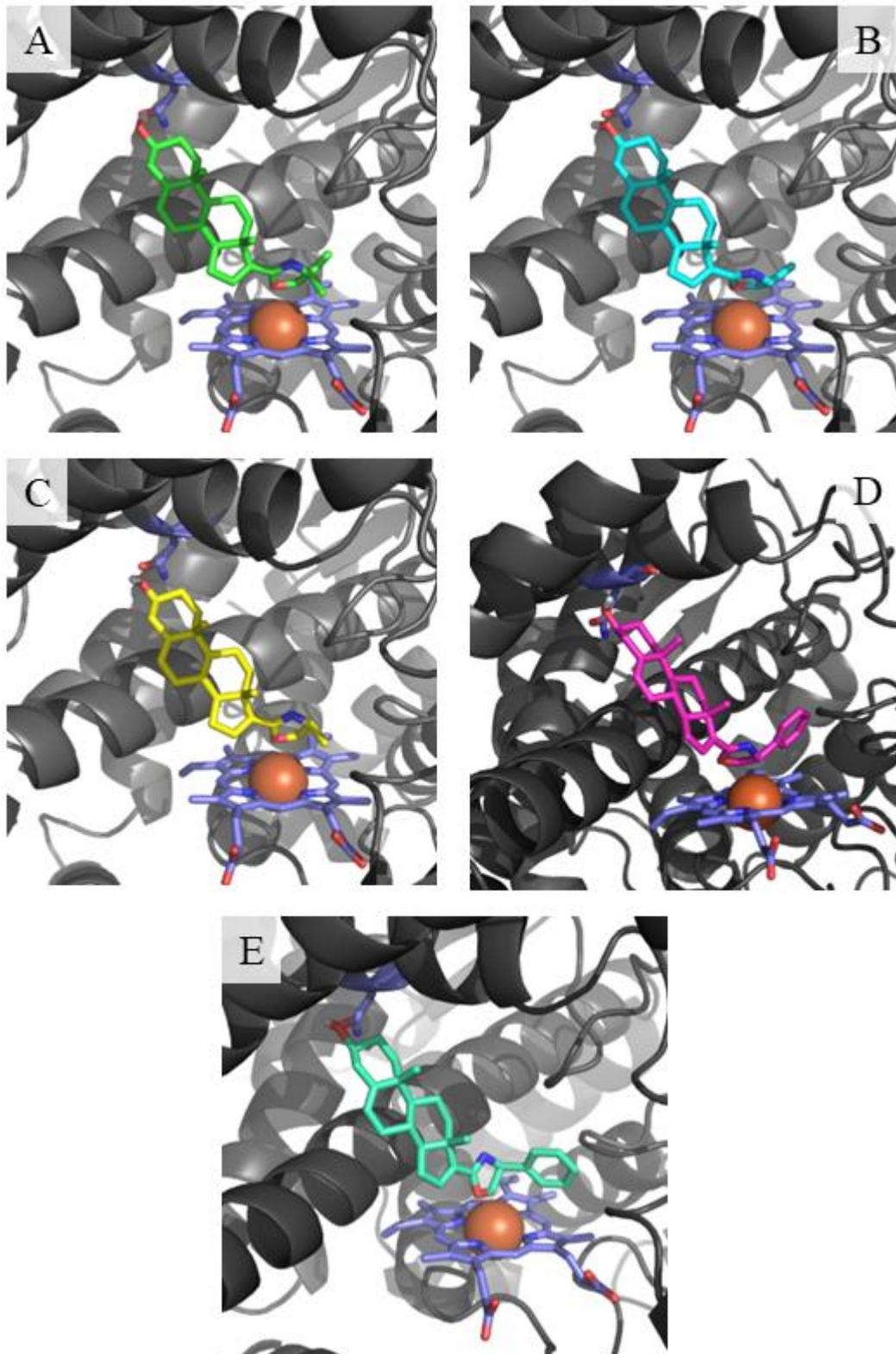


Рисунок 37 – Докинг соединений 223 (A), 224 (B), 225 (C), 226 (D), 227 (E) в активный центр CYP17A1

Оксазолиновый цикл соединений 223, 224 и 225 располагается над плоскостью гема, а двугранный угол $\Theta_{17-2'}$ может принимать различные значения. (Рисунок 37А, В, С). Очевидно, присутствие и $C4'(R)$ -, и $C4'(S)$ -метильной группы способно затруднить координацию атома $N3'$ гетероцикла с атомом Fe гема, но различно ориентирует положение оксазолинового цикла относительно гема. Фенил-замещенные оксазолины 226 и 227 обладали меньшим сродством к активному центру CYP17 A1, чем незамещенный оксазолин 217 и метил-замещенные оксазолины 223 – 225. Положение фенил-замещенного оксазолинового цикла соединений 226 и 227 в активном центре CYP17A1 зависело от конфигурации атома $C4'$ и существенно различалось (Рисунок 37. D, E).

В Таблице 3 приведены основные параметры фермент-ингибиторных комплексов CYP17A1 с оксазолиновыми проиоизводными 217, 223 – 227 и абиратероном 1.

Таблица 3 – параметры комплексов CYP17A1 с соединениями 217, 223 – 227 и абиратероном 1, рассчитанные из результатов докинга

Соединение	Оценочная функция (AutoDock Vina, ккал /моль)	Значение двугранного угла $\Theta_{17-2'}$ в комплексе(о)	Расстояние между $N3'$ и Fe(III) гема, (Å)	Расстояние между $3\beta OH$ - и атомом O карбоксамидной группы Asn202 (Å)
217	-10.2	13.2	3.1	3.0
223	-11.8	-138.9	5.5	2.5
224	-11.7	-124.2	5.2	2.6
225	-10.8	9.8	4.2	2.5
226	-7.5	-105.4	5.0	2.7
227	-7.5	-176.8	5.5	2.8
абиратерон 1	-11.3	39.6	2.0	2.8

Следующей задачей было построение модели фермент-ингибиторного комплекса для оксазолинового производного [17(20)E]-21-норпрегнена 190. Использование 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, однако экспериментальные данные [43, 150] указывают 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)-3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 190a (Рисунок 38), по данным докинга способный образовать комплекс с ферментом.

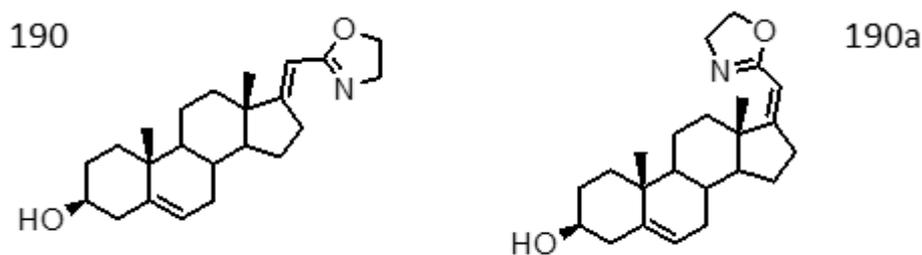


Рисунок 38 – Структуры изомерных оксазолинов 190 и 190a

Структуры комплексов CYP17A1-абиратерон и CYP17A1-17(20)Z-изомер 190a представлены на Рисунке 39.

Формально, интерконверсия 17(20)E и 17(20)Z оксазолинов может проходить через обратимое протонирование азота оксазолинового цикла (по схеме, Рисунок 40) при условии, что энергетически менее выгодный 17(20)Z-изомер при связывании в активном центре стабилизируется за счет взаимодействия с белком и гемом.

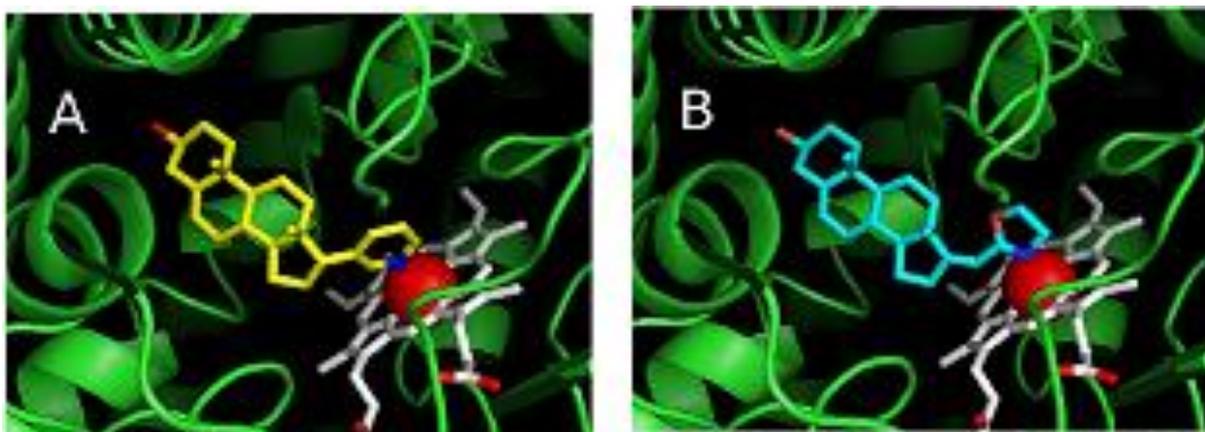


Рисунок 39 – Модели комплексов CYP17A1-абиратерон 1 и CYP17A1 - 190a, построенные методом молекулярного докинга

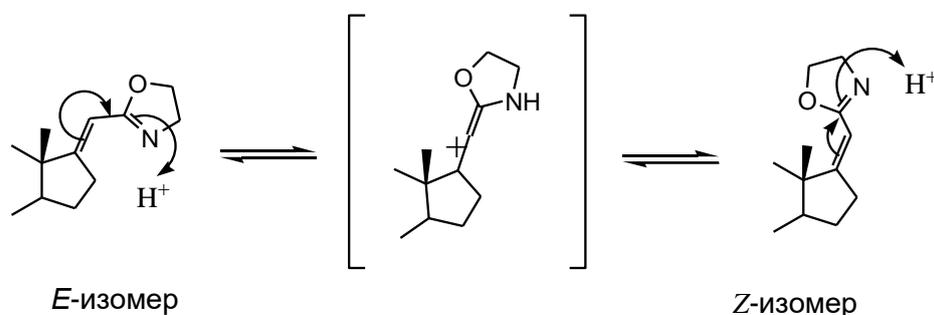


Рисунок 40 – Возможная схема кислотно-катализируемой интерконверсии оксазолинов 190 и 190a

Литературные данные об оксазолиновых производных [17(20)*Z*]-21-норпрегнена отсутствуют. Наши попытки идентифицировать следы 17(20)*Z*-изомеров на стадии циклизации оксазолинов были безуспешными; 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 К).

Ранее в работе [131] был приведен результат докинга пиколиниденового производного андростана 175 в активный центр СYP17A1, в котором лиганд в модели комплекса имел 17(20)Z-конфигурацию, ошибочно обозначенную в статье как 17(20)E. Попытки виртуально изомеризовать 17(20)Z-конфигурацию лиганда 190а в построенном нами комплексе в 17(20)E-изомер 190 были неудачными. 17(20)E-Изомер 190 не помещался в активный центр СYP17A1.

Тем не менее, модель комплекса 17(20)E-изомера 190 с СYP17A1 может быть построена методом равновесной молекулярной динамики. Однако, 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 молекулярной динамики показывают, что тройной комплекс СYP17A1-190-H₂O (Рисунок 41) должен быть весьма стабилен.

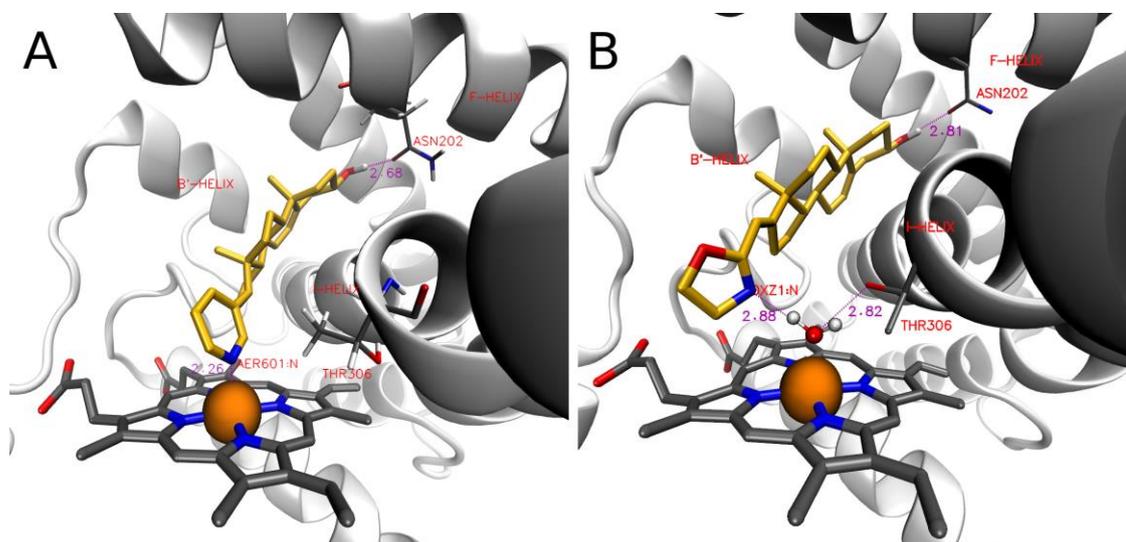


Рисунок 41 – Модели комплексов СYP17A1-абиратерон 1 и СYP17A1 - 190, построенные методом молекулярного докинга

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). Связывание атома N оксазолиновой группы с атомом Fe гема через молекулу воды позволяет объяснить наблюдаемый в оптических спектрах комплекса СУР17А1 с оксазолином 190 меньший сдвиг полосы Core по сравнению с абиратероном [151]. Этот эффект наблюдался ранее в исследованиях взаимодействия других цитохромов с лигандами, способными образовывать подобные тройные комплексы [152].

Таким образом, для фермент-ингибиторного комплекса СУР17А1-190 мы получили две альтернативные модели (Рисунок 39 и Рисунок 41). Первая модель (Рисунок 39) предусматривает превращение 17(20)E-изомера 190 в 17(20)Z-изомер 190а в активном центре фермента, происходящее при связывании лиганда. Вторая модель (Рисунок 41) предусматривает образование фермент-ингибиторного комплекса в стабилизации которого участвует молекула воды.

4.3. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ОКСАЗОЛИНОВ 190, 217 И АБИРАТЕРОНА 1 НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И АПОПТОЗ AR-НЕЗАВИСИМЫХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ

Как обсуждалось в литературном обзоре, стероидные ингибиторы СУР17А1, 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, ответственных 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 клеток карциномы простаты.

Данные проточной цитофлуориметрии, приведенные в данном разделе, свидетельствуют, что стероидные оксазолины 190 и 217 подавляют рост и пролиферацию клеток карциномы простаты, стимулируют апоптоз и деградацию ДНК, повышая экспрессию про-апоптотических и подавляя экспрессию антиапоптотических факторов. В наших экспериментах оксазолины 190 и 217

оказались более активными цитотоксическими и про-апоптотическими агентами, чем абиратерон.

4.3.1. Влияние оксазолинов 190, 217 и абиратерона 1 на жизнеспособность и апоптоз клеток РС-3 при 72 ч инкубации

Как известно, клетки РС-3 не экспрессируют AR и CYP17 A1, однако, как показано в главе 4.1. в присутствии соединений 1, 190 и 217 теряют свою жизнеспособность и способность к росту. В работе [66] было установлено, что антипролиферативная активность абиратерона в клетках LNCaP и РС-3 незначительна при 24 ч инкубации, но существенно возрастает при продолжительной (96-часовой или 120-часовой) инкубации. Наши предварительные опыты также показали, что способность оксазолинов 190 и 217 подавлять пролиферативную активность клеток LNCaP, РС-3, DU-145 и 22Rv1 (по данным МТТ теста) растет с увеличением времени инкубации.

Мы анализировали жизнеспособность и апоптоз в клетках карциномы простаты РС-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 фосфатидилсеринем, 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 цитофлуориметрии; результаты представлены на Рисунке 42.

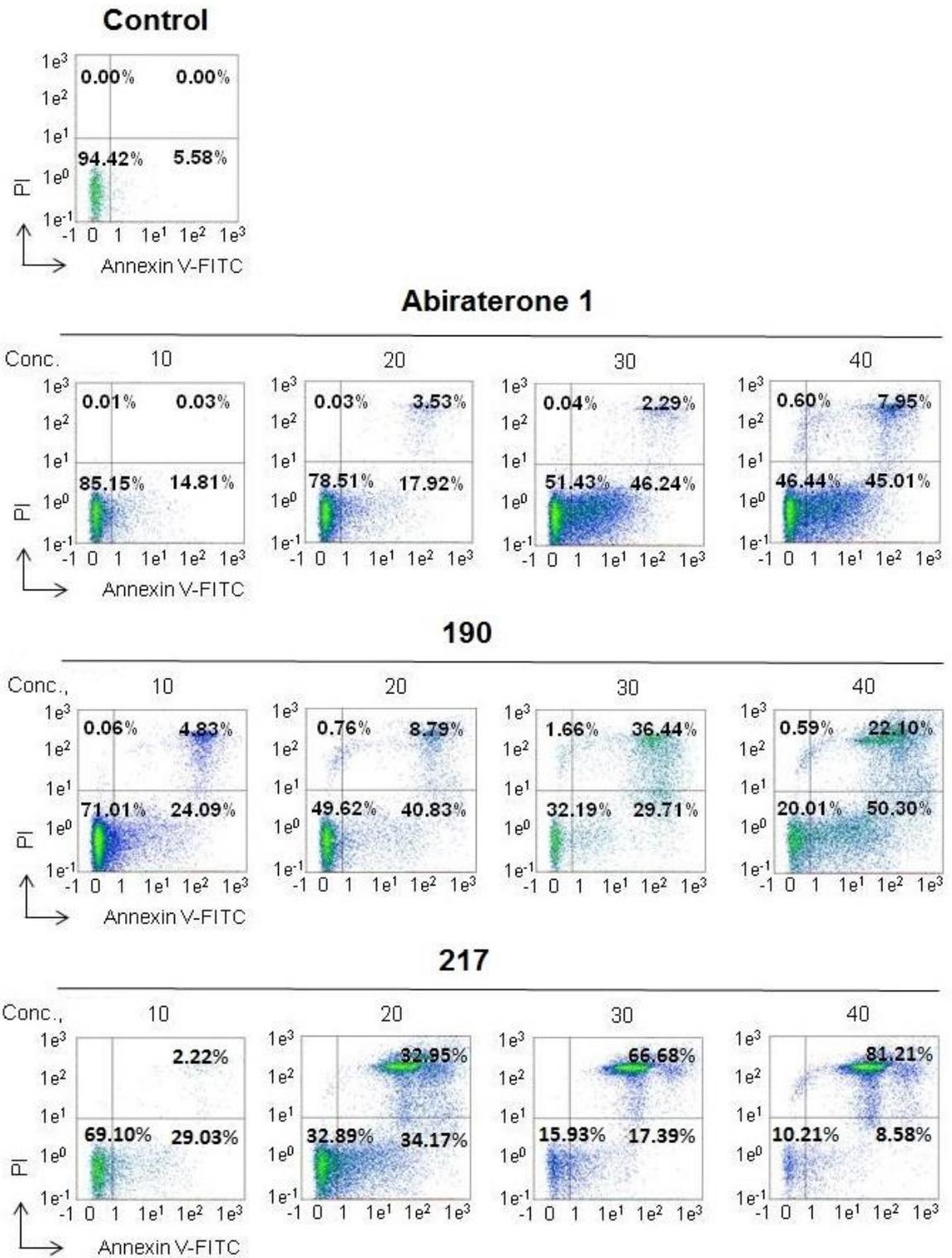


Рисунок 42 – Влияние оксазолинов 190, 217 и абиратерона на жизнеспособность и апоптоз клеток РС-3

Оксазолины 190, 217 и абиратерон 1 проявляли дозо-зависимую цитотоксическую активность. Содержание живых клеток (Рисунок 43А) и клеток

с фрагментированной ДНК (Рисунок 43С) доказывает, что цитотоксичность оксазолинов 217 и 190 значительно превышает цитотоксичность абиратерона 1, причем цитотоксичность соединения 217 достоверно превышает цитотоксичность соединения 190, что коррелирует с результатами МТТ-теста. Оксазолины 190, 217 и абиратерон 1 стимулировали апоптоз в клетках РС-3, причем в концентрациях 10 мкМ и 20 мкМ про-апоптотическая активность соединений 190 и 217 была достоверно выше, чем активность абиратерона 1 (Рисунок 43В). 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.

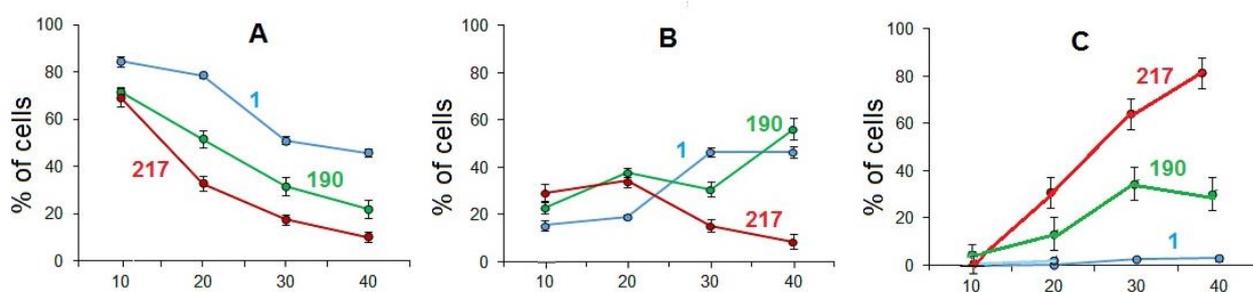


Рисунок 43 – Содержание живых (А), апоптотических (В) и мертвых (С) клеток РС-3, инкубированных с соединениями 1, 190 и 217 в различных концентрациях

На Рисунке 44 представлены гистограммы, характеризующие содержание живых, апоптотических и мертвых клеток в препаратах контрольных РС-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. Это может указывать на различия в механизмах про-апоптотического и цитотоксического действия оксазолинов 217, 190.

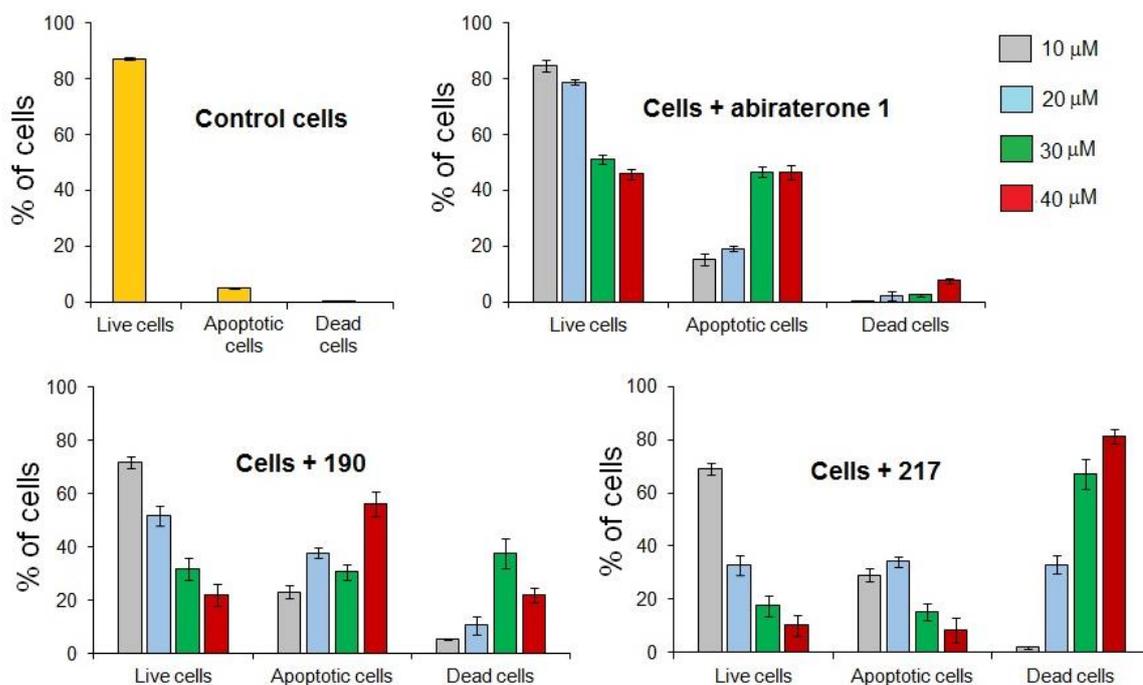


Рисунок 44 – Гистограммы живых, апоптотических и мертвых клеток РС-3, инкубированных с соединениями 1, 190 и 217

4.3.2. Сравнение про-апоптотических эффектов оксазолина 190 и абиратерона 1 в клетках DU-145 при 24 ч инкубации

Следующей задачей было сравнение про-апоптотических эффектов оксазолина 190 и абиратерона 1 в гормон-независимых клетках карциномы простаты DU-145 при краткосрочной 24 часовой 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 МАРК и PI3K/Akt и на экспрессию белка Bcl-2 и его фосфорилированной формы Bcl-2-p методом проточной цитофлуориметрии.

Каспазы являются представителями семейства цистеиновых протеиназ, играющих ключевую роль в апоптозе, и существующих в виде неактивных проферментов, которые расщепляются с образованием двух субъединиц, которые димеризуются с образованием активного фермента. Каспазы 3 и 7 относятся к т.н.

эффекторным (эксекторным) каспазам, разрушающим при апоптозе более 600 клеточных компонентов. Сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt (см. раздел 2. 5) 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 45.

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

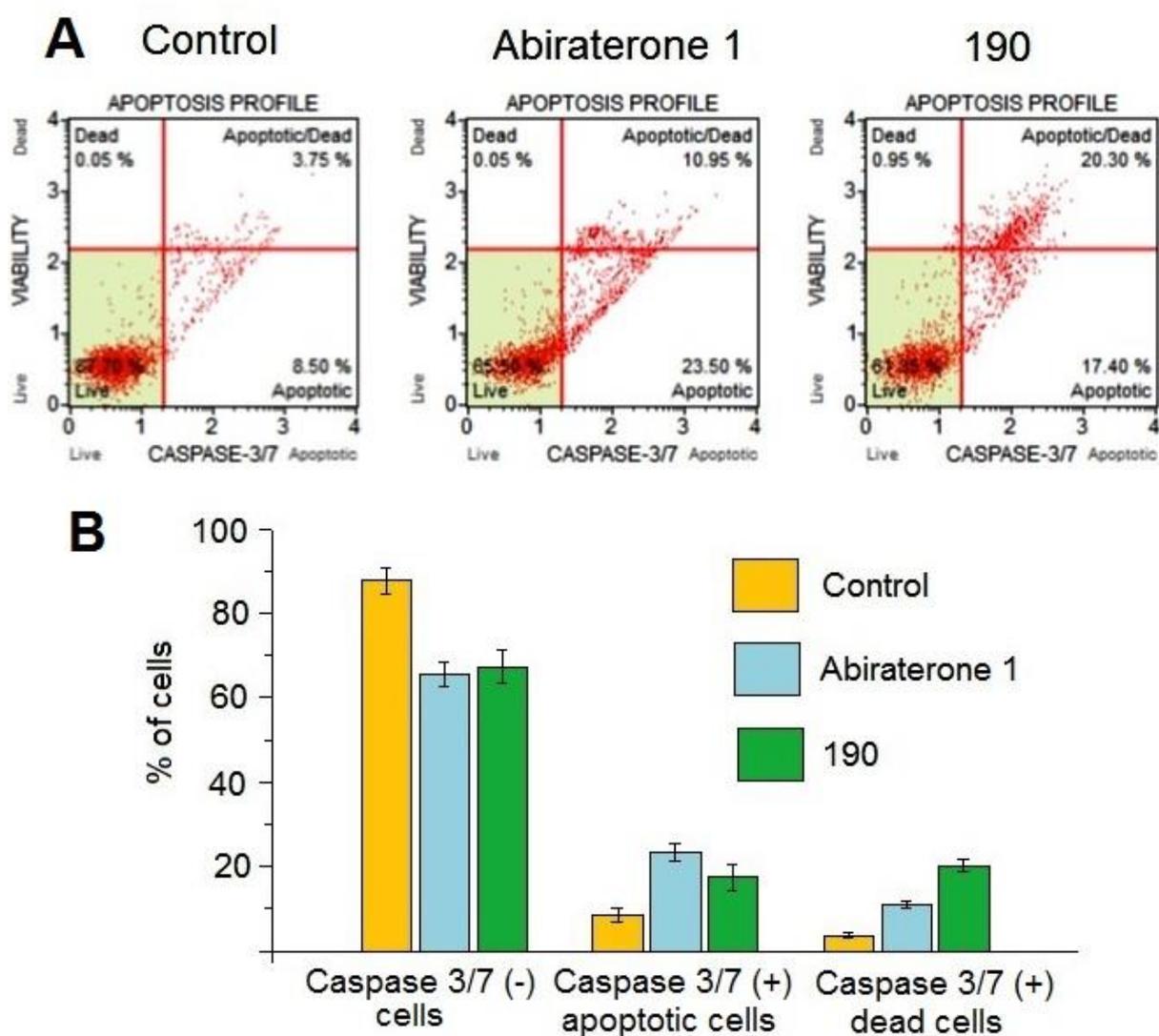


Рисунок 45 – Влияние абиратерона 1 и оксазолина 190 на активацию каспаз 3 и 7 в клетках DU-145. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями 1 и 190

Влияние оксазолина 190 и абиратерона 1 на активацию MAPK и PI3K/Акт 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 фосфорилированной Akt и фосфорилированной ERK1/2. Результаты представлены на Рисунке 46.

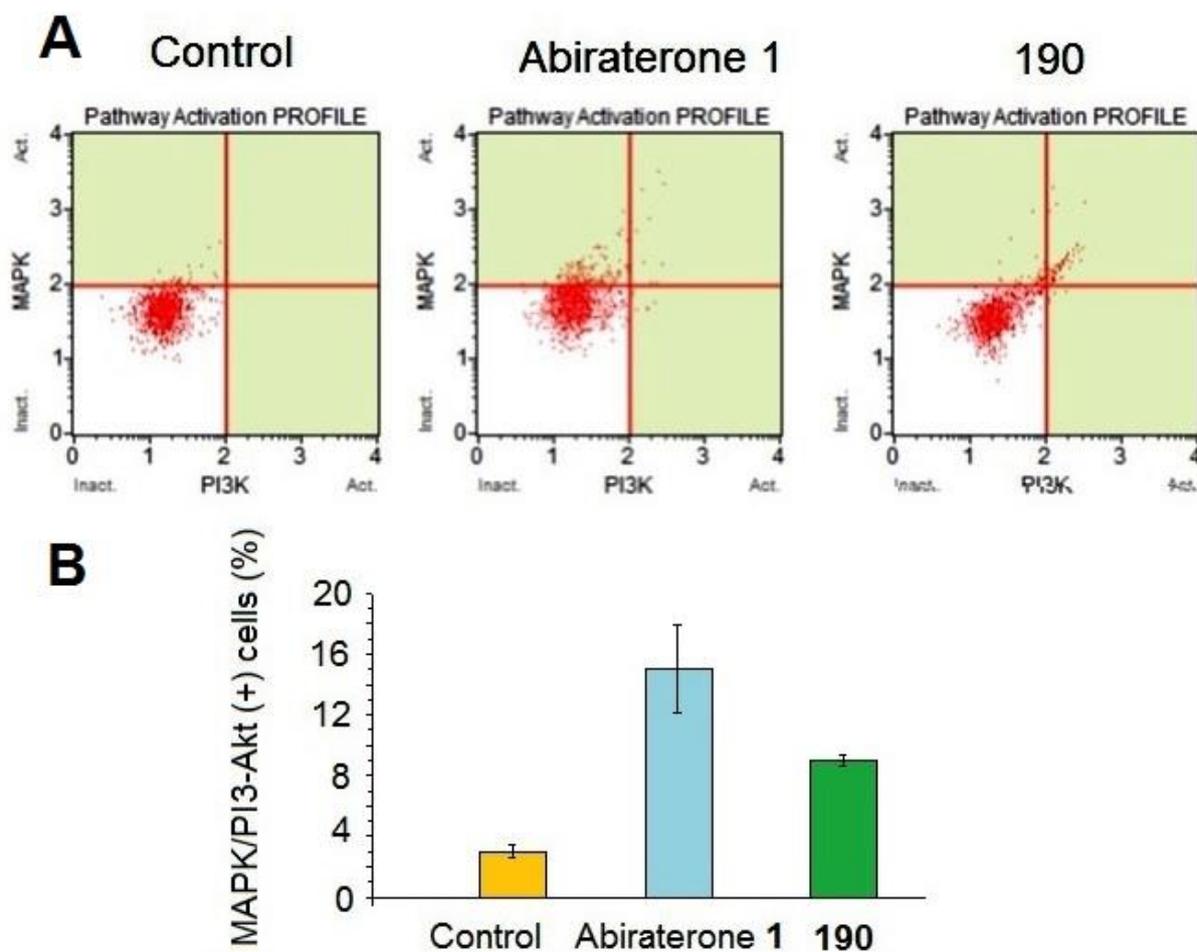


Рисунок 46 – Влияние абиратерона 1 и оксазолина 190 на активацию сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt в клетках DU-145. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями 1 и 190

Оксазолин 190 и абиратерон 1 увеличивали содержание MAPK/PI3-Akt-положительных клеток (в контроле их содержание составляло $3 \pm 0.4\%$, ($p =$)); в клетках, инкубированных с абиратероном 1 – $15 \pm 0.4\%$; в клетках, инкубированных с оксазолином 190 – $9 \pm 0.4\%$). Эффект абиратерона 1 был достоверно выше, чем эффект оксазолина 190, однако из Рисунка 46А 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-мечеными антителами. Результаты представлены на рисунке 47.

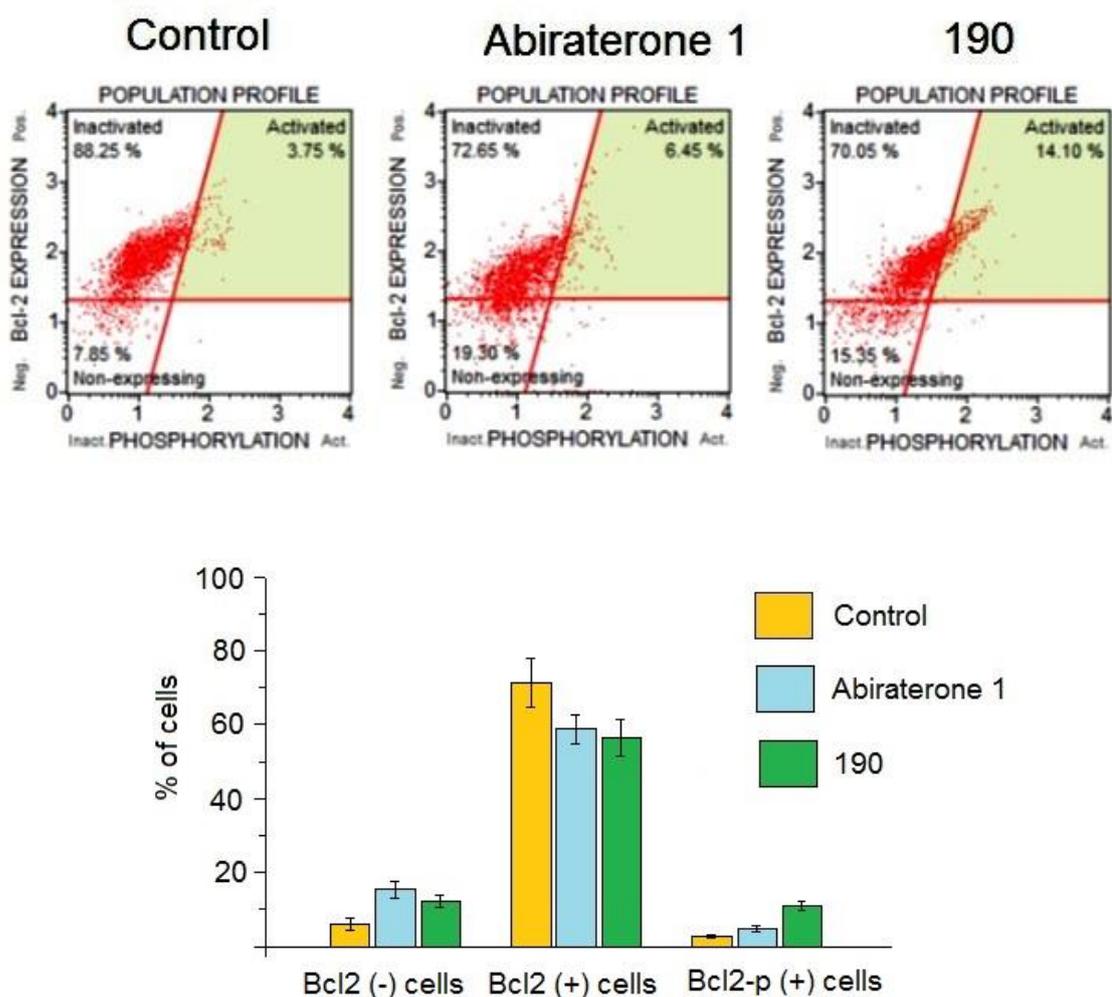


Рисунок 47 – Влияние абиратерона 1 и оксазолина 190 на содержание Bcl-2-отрицательных, Bcl-2-положительных и Bcl-2-p-положительных DU-145 клеток. А – данные проточной цитофлуориметрии; В – гистограммы клеток DU-145, инкубированных с соединениями 1 и 190

Оксазолин 190 и абиратерон 1 незначительно снижали содержание Vcl-2-положительных клеток (в контроле их содержание составляло $93 \pm 1.1\%$, ($p =$); в клетках, инкубированных с абиратероном 1 – $80 \pm 1.0\%$ ($p=0.007$); в клетках, инкубированных с оксазолином 190 – $85 \pm 0.9\%$, ($p=0.018$). При этом в присутствии абиратерона 1 и оксазолина 190 достоверно увеличивалось количество клеток, содержащих фосфорилированный Vcl-2. Оксазолин 190 увеличивал содержание фосфорилированного Vcl-2 сильнее, чем абиратерон (Рисунок 47В).

Полученные результаты свидетельствуют, что оксазолины 190 и 217 эффективно подавляют рост и пролиферацию гормон-независимых клеток карциномы простаты, стимулируя апоптоз и вызывая фрагментацию ДНК. Про-апоптотическая и цитотоксическая активность оксазолинов 190 и 217 существенно превосходила таковую для абиратерона, что позволяет рассматривать соединения 190 и 217 в качестве перспективных кандидатов для разработки новых противораковых препаратов.

4.4. СРАВНЕНИЕ ОКСАЗОЛИНА 190 И АБИРАТЕРОНА 1 В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO

В данном разделе приведены результаты экспериментов *in vivo*, в которых проводилось: 1) сравнение биодоступности и фармакокинетических характеристик оксазолина 190 и абиратерона при пероральном введении мышам C57BL/6; 2) сравнение эффектов оксазолина 190 и абиратерона на уровень тестостерона у мышей C57BL/6; 3) сравнение эффектов оксазолина 190 и абиратерона на рост ксенографтов, полученных подкожным введением опухолевых клеток человека DU-145 и 22Rv1 мышам линии Balb/c nude.

4.4.1. Фармакокинетика оксазолина 190 и абиратерона 1 при пероральном введении мышам C57BL/6

Плохая растворимость абиратерона в водной среде и его низкая биодоступность – существенные недостатки, ограничивающие применение этого препарата. Лекарственной формой абиратерона является его 3 β -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 Et₂O; экстракты высушивали и анализировали ВЭЖХ. Содержание оксазолина 190 и абиратерона 1 в образцах измеряли с использованием калибровочной зависимости. Результаты, представленные на Рисунке 51, свидетельствуют, что биодоступность оксазолина 190 превышает биодоступность абиратерона более, чем в 20 раз.

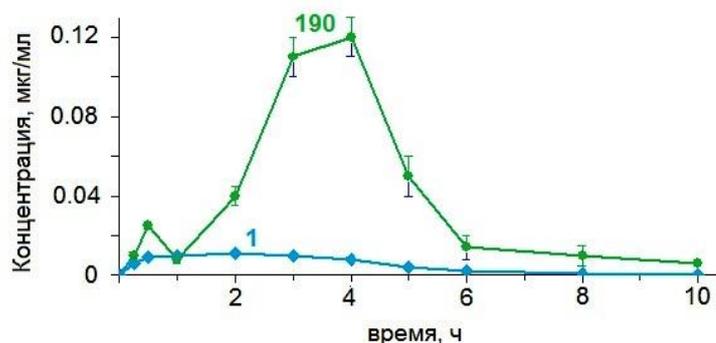


Рисунок 51 – Уровень абиратерона 1 и оксазолина 190 в плазме крови мышей C57BL/6.

4.3.2. Влияние оксазолина 190 и абиратерона 1 на уровень тестостерона 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 оксазолин 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, 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 52.

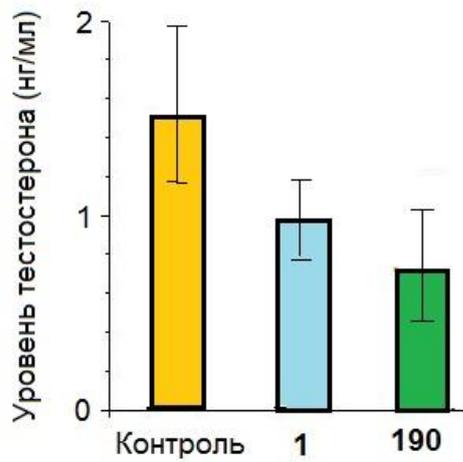


Рисунок 52 – Влияние абиратерона 1 и оксазолина 190 на уровень тестостерона в плазме крови мышей C57BL/6

4.3.3. Влияние оксазолина 190 и абиратерона 1 на рост привитой опухоли у мышей

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. После того, как размер опухоли достигал 80 мм³, животные были разделены на группы, получавшие абиратерон 1 (150 или 300 мг/кг, per os, 1 раз в день, в течение 10 дней), оксазолин 190 (150 или 300 мг/кг, per os, 1 раз в день, в течение 10 дней) и контрольные группы. Размер опухоли измеряли во всех группах на 3-й, 7-й, 10-й день эксперимента и на 3-й день после окончания эксперимента.

Результаты представлены на Рисунке 53. Размеры опухолей в контрольных группах на 3-й день после окончания эксперимента составляли 242 ± 94 мм³ и 688 ± 94 мм³ для DU-145- и 22Rv1- ксенографтов, соответственно.

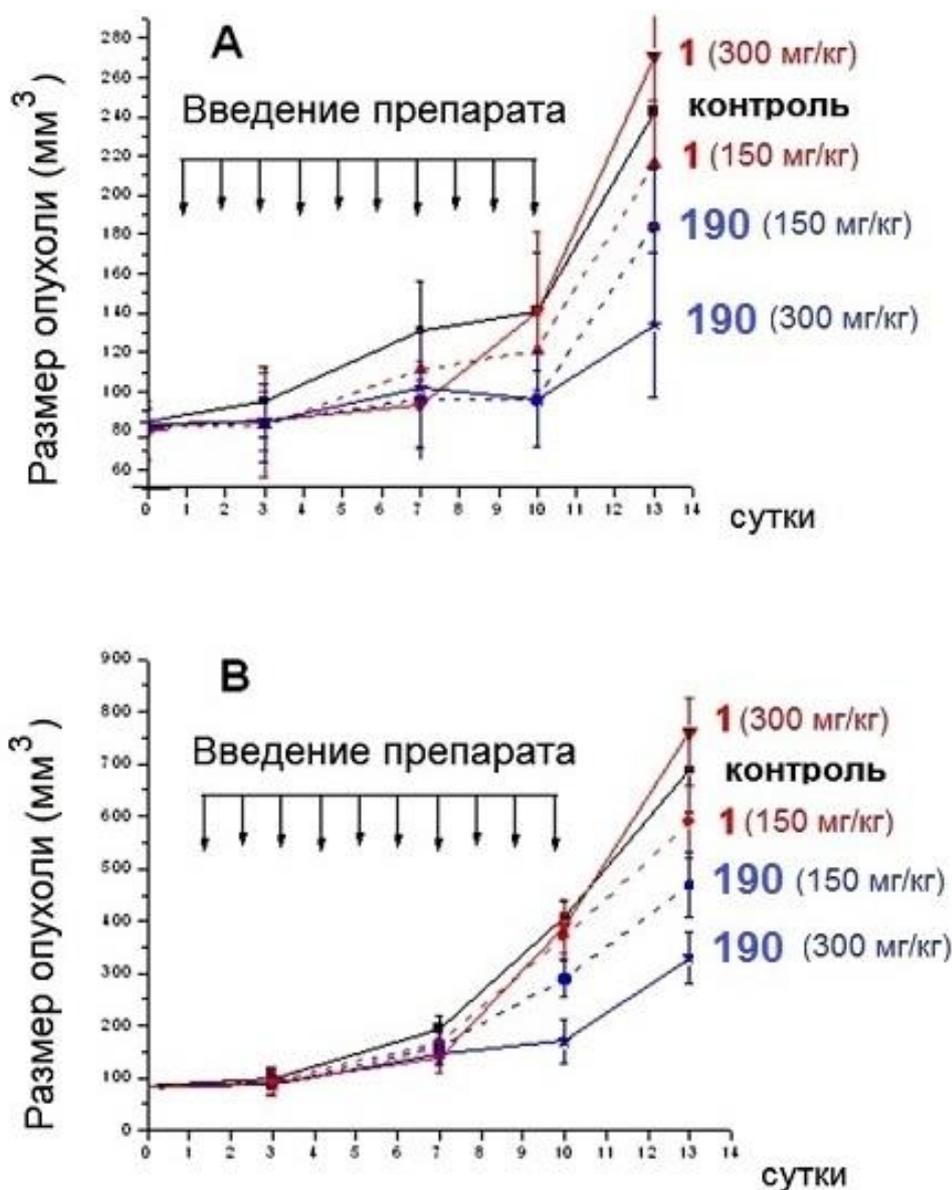


Рисунок 53 – Влияние абиратерона 1 и оксазолина 190 на рост привитой опухоли у мышей Balb/c nude: А – DU-145-ксенографты; В – 22Rv1-ксенографты

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 мм³, 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 мм³, TGI = 24%, однако эффект не был статистически достоверным (Рисунок 53А). 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 мм³ и 330 ± 60 мм³ (TGI = 33% и 52%) для доз 150 мг/кг и 300 мг/кг, соответственно (Рисунок 53В). 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 первой главе работы был проведен первичный скрининг антипролиферативной 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 клетках карциномы простаты LNCaP и PC-3). В результате для дальнейших исследований были выбраны два наиболее перспективных кандидата – 2'-{[(E)-3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 190 и 2'-(3 β -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 [153, 154].

Во второй главе 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 СУР17А1-190 и СУР17А1-217.

В третьей главе работы приведены данные проточной цитофлуориметрии гормон-независимых клеток карциномы РС-3 и DU-145, инкубированных с оксазолинами 190, 217 и абиратероном 1 в различных условиях. В клетках РС-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 про-апоптотических эффектах оксазолинов 190 и 217.

В четвертой главе 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. Оксазолин 190 подавлял 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 противораковые агенты, полученные оптимизацией структур галетерона и абиратерона [45,65,155-157]. Можно полагать, что оптимизация структуры оксазолин-содержащих стероидных производных также может привести к созданию новых бифункциональных стероидных противораковых агентов.

ВЫВОДЫ

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)-3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол (190) и 2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол (217).

Оксазолины 190 и 217 эффективно ингибировали активность ключевого фермента биосинтеза андрогенов – 17 α -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.

В клетках карциномы простаты оксазолины 190 и 217 индуцировали апоптоз, увеличивая содержание Аннексин V-положительных клеток, активируя каспазы 3/7 и сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt, стимулируя фосфорилирование Bcl-2 и вызывая повреждения в ДНК. Цитотоксическая и про-апоптотическая активность оксазолинов 190 и 217 превышала таковую для абиратерона.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang A. J., Autio K. A., Roach M., Scher H. I. “High-Risk” Prostate Cancer: Classification and Therapy // *Nature Reviews Clinical Oncology* – 2014 – V. 11 – Iss. 6 – P. 308–323.
2. Komura K., Sweeney C. J., Inamoto T., Ibuki N., Azuma H., Kantoff P. W. Current treatment strategies for advanced prostate cancer // *International Journal of Urology* – 2018 – V. 25 – Iss. 3 – P. 220–231.
3. Culig Z., Santer F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer // *Cancer and Metastasis Reviews* – 2014 – V. 33 – P. 413-27.
4. Katzenwadel A., Wolf P. Androgen deprivation of prostate cancer: Leading to a therapeutic dead end // *Cancer Letters* – 2015 – V. 367 – Iss. 1 – P. 12–17.
5. Harris W. P., Mostaghel E. A., Nelson P. S., Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion // *Nature Clinical Practice Urology* – 2009 – V. 6 – Iss. 2 – P. 76–85.
6. Ramalingam S., Ramamurthy V. P., Njar V. C. O. Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2017 – V. 166 – P. 16–27
7. Agarwal N., Di Lorenzo G., Sonpavde G., Bellmunt J. New agents for prostate cancer // *Annals of Oncology* – 2014 – V. 25 – Iss. 9 – P. 1700–1709.
8. Njar V. C. O., Brodie A. M. Inhibitors of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) potential agents for the treatment of prostate cancer // *Current Pharmaceutical Design* – 1999 – V. 5 – P. 163–80.
9. Hartmann R. W., Ehmer P. B., Haidar S., Hector M., Jose J., Klein C. D., Seidel S. B., Sergejew T. F., Wachall B. G., Wächter G. A., Zhuang Y. Inhibition of CYP

- 17, a new strategy for the treatment of prostate cancer // *Archive der Pharmazie* – 2002 – V. 335 – Iss. 4 – P. 119–28.
10. Bruno, R. D., Njar, V. C. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development // *Bioorganic & Medicinal chemistry* – 2007 – V. 15 – Iss. 15 – 5047–5060.
11. Baston E, Leroux F. R. Inhibitors of steroidal cytochrome P450 enzymes as targets for drug development // *Recent Patents of Anticancer Drug Discovery* – 2007 – V. 2 – P. 31–58.
12. Moreira V. M., Salvador J. A. R., Vasaitis T. S., Njar V. C. O. CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment – An Update // *Current Medicinal Chemistry* – 2008 – V.15 – P. 868–899.
13. Owen C. P. 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (P45017 α) Inhibitors in the Treatment of Prostate Cancer // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* – 2009 – V. 9, P. 613–626
14. Vasaitis T. S., Bruno R. D., Njar V. C. O. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* – 2011 – V. 125, P. 23–31.
15. Salvador J. A. R, Pinto R. M. A., Silvestre S. M. Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* – 2013 – V. 137, P. 199– 222.
16. De Bono, J. S., Logothetis, C. J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., Chu, L., Chi, K. N., Jones, R. J., Goodman, O. B., Jr, Saad, F., Staffurth, J. N., Mainwaring, P., Harland, S., Flaig, T. W., Hutson, T. E., Cheng, T., Patterson, H., Hainsworth, J. D., Ryan, C. J., Sternberg, C. N., Ellard S.L., Fléchon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Kheoh T., Haqq C. M., Scher H. I., COU-AA-301 Investigators. Abiraterone and increased survival in

- metastatic prostate cancer // *The New England journal of medicine* – 2011 – V. 364 – Iss. 21 – P. 1995–2005.
17. Njar V. C. O., Brodie A. M. Discovery and development of Galeterone (ТОК-001 or VN/124-1) for the treatment of all stages of prostate cancer // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2015 – V. 58 – P. 2077–2087.
18. Заварзин И. В., Черткова В. В., Левина И. С., Чернобутова Е. И. Стероиды, конденсированные с гетероциклами по положениям 16, 17 кольца D // *Успехи химии* – 2011 – №7 – С. 693–714.
19. Стулов С. В., Мишарин А. Ю. Ситнез стероидов с азотсодержащими заместителями в кольце D // *Химия гетероциклических соединений* – 2012 – №10 – С. 1536–1582.
20. Singh R., Panda G. An overview of synthetic approaches for heterocyclic steroids // *Tetrahedron* – 2013 – V. 69 – P. 2853–2884.
21. Frank E., Schneider G. Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2013 – V. 137 – P. 301–315.
22. Cabeza M., Sanchez-Marqueza A., Garrido M., Silva A., Bratoeff E. Recent Advances in Drug Design and Drug Discovery for Androgen-Dependent Diseases // *Current Medicinal Chemistry* – 2016 – V. 23 – P. 792–815.
23. Salvador J. A. R., Moreira V. M., Silvestre S. M. Steroidal CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment: From Concept to Clinic (Chapter 12) / *Advances in Prostate Cancer*, Hamilton G., Ed.; InTech, 2013.
24. Potter G. A., Barrie, S. E., Jarman, M., Rowlands, M. G. Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome P45017, (17 α -Hydroxylase-C17,20-lyase): Potential Agents for the Treatment of Prostatic Cancer // *Journal of Medicinal Chemistry* – 1995 – V. 38 – P. 2463–2471.

25. Handratta V. D., Vasaitis T. S., Njar V. C. O., Gediya L. K., Kataria R., Chopra P., Newman D., Farquhar R., Guo Z., Qiu Y., Brodie A. M. Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: Synthesis, in vitro biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2005 – V. 48 – P. 2972–2984.
26. Clement O. O., Freeman C. M., Hartmann R. W., Handratta V. D., Vasaitis T. S., Brodie A. M., Njar V. C. O. Three dimensional pharmacophore modeling of human CYP17 inhibitors. Potential agents for prostate cancer therapy // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2003 – V. 46 – Iss. 12 – P. 2345–2351.
27. De Vore N. M., Scott E. E. Cytochrome P450 17A1 structures with prostate cancer drugs Abiraterone and TOK-001 // *Nature* – 2012 – V. 482 – P. 116-119.
28. Auchus M. L., Auchus R. J. Human steroid biosynthesis for the oncologist // *Journal of Investigative Medicine* – 2012 – V. 60 – Iss. 2 – P. 495-503.
29. Yoshimoto F. K., Auchus R. J. The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1) // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* – 2015 – V. 151, P. 52–65.
30. Bird I. M., Abbott D. H. The hunt for a selective 17,20 lyase inhibitor; learning lessons from nature // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* – 2016 – V. 163 – P. 136–146.
31. Udhane S. S., Dick B., Hu Q., Hartmann R. H., Pandey A. V. Specificity of anti-prostate cancer CYP17A1 inhibitors on androgen biosynthesis // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016 – V. 477 – Iss. 4 – 1005–1010.
32. Yin L., Hu Q. CYP17 inhibitors - abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents // *Nature Reviews Urology* – 2014 – V. 11 – P. 32–42.
33. Malikova J., Brixius-Anderko S., Udhane S. S., Parween S., Dick B., Bernhardt R., Pandey A. V. CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug,

- also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2 // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* – 2017 – V. 174, P. 192–200.
34. Mostaghel E. A., Marck B., Plymate S., Vessella R. L., Balk S. P., Matsumoto A. M., Nelson P. S., Montgomery R. B. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration resistant prostate cancer: Induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. // *Clinical Cancer Research* – 2011 – V. 17 – Iss. 18 – P. 5913–5925.
35. Yip C. K. Y., Bansal S., Wong S. Y., Lau A. J. Identification of Galeterone and Abiraterone as Inhibitors of Dehydroepiandrosterone Sulfonation Catalyzed by Human Hepatic Cytosol, SULT2A1, SULT2B1b, and SULT1E1 // *Drug Metabolism and Disposition* – 2018 – V. 46 – Iss. 4 – P. 470–482.
36. Abadi A. H., Abou-Seri S. M., Hu Q., Negri M., Hartmann R. W. Synthesis and biological evaluation of imidazolylmethylacridones as cytochrome P-450 enzymes inhibitors // *Medicinal Chemistry Communications* – 2012 – V. 3 – P. 663–666.
37. Fehl C., Vogt C. D., Yadav R., Kelin Li K., Scott E. E., Aubé J. Structure-Based Design of Inhibitors with Improved Selectivity for Steroidogenic Cytochrome P450 17A1 over Cytochrome P450 21A2 // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2018 – V. 61 – P. 4946–4960.
38. Li R., Evaul K., Sharma K. K., Chang K. H., Yoshimoto J., Liu J., Auchus R. J., Sharifi N. Abiraterone Inhibits 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase: A Rationale for Increasing Drug Exposure in Castration-Resistant Prostate Cancer // *Clinical Cancer Research* – 2012 – V. 18 – P. 3571–3579.
39. Li Z., Bishop A. C., Alyamani M., Garcia J. A., Dreicer R., Bunch D., Liu J., Upadhyay S. K., Auchus R. J., Sharifi N. Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer // *Nature* – 2015 – V. 523, P. 347–351.
40. Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Abazeed M., Upadhyay S. K., Balk S. P., Taplin M. E., Auchus R. J., Sharifi N. Redirecting abiraterone metabolism to fine tune prostate cancer anti-androgen therapy // *Nature* – 2016 – V. 533 – P. 547–551.

41. Alyamani M., Li Z., Berck M., Li J., Tang J., Upadhyay S., Auchus R. J., Sharifi N. Steroidogenic metabolism of galeterone reveals a diversity of biochemical activities // *Cell Chemical Biology* – 2017 – V. 24 – Iss. 7 – P. 1–8.
42. Garrido M., Peng H. M., Yoshimoto F. K., Upadhyay S. K., Bratoeff E., Auchus R. J. A-ring modified steroidal azoles retaining similar potent and slowly reversible CYP17A1 inhibition as abiraterone // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2014 – V. 143 – P. 1–10.
43. Kostin V. A., Zolottsev V. A., Kuzikov A. V., Masamrekh R. A., Shumyantseva V. V., Veselovsky A. V., Stulov S. V., Novikov R. A., Timofeev V. P., Misharin A. Y. Oxazoliny derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity // *Steroids* – 2016 – V. 115 – P. 114–122.
44. Bruno R. D., Vasaitis T. S., Gediya L. K., Purushottamachar P., Godbole A. M., Ates-Alagoz Z., Brodie A. M., Njar V. C. O. Synthesis and biological evaluations of putative metabolically stable analogs of VN/124-1 (TOK-001): Head to head anti-tumor efficacy evaluation of VN/124-1 (TOK-001) and abiraterone in LAPC-4 human prostate cancer xenograft model // *Steroids* – 2011 – V. 76 – P. 1268–1279.
45. Purushottamachar P., Godbole A. M., Gediya L. K., Martin M. S., Vasaitis T. S., Kwegyir-Afful A. K., Ramalingam S., Ates-Alagoz Z., Njar V. C. O. Systematic Structure Modifications of Multitarget Prostate Cancer Drug Candidate Galeterone To Produce Novel Androgen Receptor Down-Regulating Agents as an Approach to Treatment of Advanced Prostate Cancer // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2013 – V. 56 – Iss. 12 – P. 4880–4898.
46. Brossard D., Zhang Y., Haider S. H., Sgobba M., Khalid M., Legay R., Duterque-Coquillaud M., Galera P., Rault S., Dallemagne P., Moslemi S., El Kihel S. N-substituted Piperazinopyridylsteroid Derivatives as Abiraterone Analogues Inhibit Growth and Induce Pro-apoptosis in Human Hormone-independent Prostate

Cancer Cell Lines // Chemical Biology & Drug Design – 2013 – V. 82 – Iss. 5 – P. 620–629.

47. Dalton J. T., Wenqing Gao W. Androgen Receptor / Nuclear receptors. Current Concepts and Future Challenges, Bunce C. M and Campbell M. J, eds – Springer. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2010 – P.143–182.
48. Tindall D, Mohler J. Androgen Action in Prostate Cancer. Part III / Androgen receptor structure and function, Tindall D, Mohler J. Springer. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2010 – P. 207–314.
49. Sun, S., Sprenger, C. C., Vessella, R. L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E. A., Page, S. T., Coleman, I. M., Nguyen, H. M., Sun, H., Nelson, P. S., & Plymate, S. R. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant // Journal of Clinical Investigation – 2010 – V. 120 – P. 2715–2730.
50. Joseph, J. D., Lu, N., Qian, J., Sensintaffar, J., Shao, G., Brigham, D., Moon, M., Maneval, E. C., Chen, I., Darimont, B., Hager, J. H. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509 // Cancer discovery – 2013 – V. 3 – Iss. 9 – P. 1020–1029.
51. Hara, T., Miyazaki, J., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., Miyamoto, M. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome // Cancer research – 2003 – V. 63 – Iss. 1 – P. 149–153.
52. Chen, E. J., Sowalsky, A. G., Gao, S., Cai, C., Voznesensky, O., Schaefer, R., Loda, M., True, L. D., Ye, H., Troncoso, P., Lis, R. L., Kantoff, P. W., Montgomery, R. B., Nelson, P. S., Bublely, G. J., Balk, S. P., Taplin, M. E. Abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors // Clinical cancer research : an

official journal of the American Association for Cancer Research – 2015 – V. 21 – Iss. 6 – P. 1273–1280.

53. Hu R., Dunn T. A., Wei S., Isharwal S., Veltri R. W., Humphreys E., Han M., Partin A. W., Vessella R. L., Isaacs W. B., Bova G. S., Luo J. Ligand independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone e-refractory prostate cancer // *Cancer Research* – 2009 – V. 69 – Iss. 1 – P. 16–22.
54. Sun, S., Sprenger, C. C., Vessella, R. L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E. A., Page, S. T., Coleman, I. M., Nguyen, H. M., Sun, H., Nelson, P. S., Plymate, S. R. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant // *Journal of Clinical Investigation* – 2010 – V. 120 – P. 2715–2730.
55. Chang K. H., Ercole C. E., Sharifi N. Androgen metabolism in prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical consequences // *British Journal of Cancer* – 2014 – V. 111 – Iss. 7 – P. 1249–1254.
56. Chang K. H., Li R., Papari-Zareei M., Watumull L., Zhao Y. D., Auchus R. J., Sharifi N. Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* – 2011 – V. 108 – Iss. 33 – P. 13728–13733.
57. Carver B. S. Strategies for targeting the androgen receptor axis in prostate cancer // *Drug Discov Today* – 2014 – V. 19 – Iss. 9 – P. 1493–1497.
58. Soifer H. S., Souleimanian N., Wu S., Voskresenskiy A. M., Collak F. K., Cinar B., Stein C. A. Prostate Cancer Cells Activity by Potent CYP17 Inhibitors in Direct Regulation of Androgen Receptor // *Journal of Biological Chemistry* – 2012 – V. 287 – P. 3777–3787.
59. Gianti E., Zauhar R. J. Modeling Androgen Receptor Flexibility: A Binding Mode Hypothesis of CYP17 Inhibitors/Antiandrogens for Prostate Cancer Therapy // *Journal of Chemical Information and Modeling* – 2012 – V. 52 – P. 2670–2683.

60. Pereira De Jesus-Tran K., Cote P. –L., Cantin L, Blanchet J., Labrie F., Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity // *Protein Science* – 2006 – V. 15 – P. 987–999.
61. Gao W., Bohl C. E., Dalton J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor // *Chemical Reviews* – 2005 – V. 105 – P. 3352-3370.
62. Kwegyir-Afful A. K., Ramalingam S., Purushottamachar P., Ramamurthy V. P., Njar V. C. Galeterone and VNPT55 induce proteasomal degradation of AR/AR-V7, induce significant apoptosis via cytochrome c release and suppress growth of castration resistant prostate cancer xenografts in vivo // *Oncotarget* – 2015 – V. 6 – Iss. 29 – P. 27440-27460.
63. Dransfield D. T., Namdev N., Jacoby D. B., Ferrante K. Correlation of galeterone-induced degradation of the androgen receptor with inhibition of a deubiquitinating enzyme // *Journal of Clinical Oncology* – 2016 – V. 34 – P. 345–345.
64. McClurg U. L., Azizyan M., Dransfield D. T., Namdev N., Chit N.C., Nakjang S., Robson C. N. The novel anti-androgen candidate galeterone targets deubiquitinating enzymes, USP12 and USP46, to control prostate cancer growth and survival // *Oncotarget* – 2018 – V. 9 – Iss. 38 – P. 24992–25007.
65. Purushottamachar P., Kwegyir-Afful A. K., Martin M. S., Ramamurthy S., Ramalingam S., Njar V. C. O. Identification of Novel Steroidal Androgen Receptor Degrading Agents Inspired by Galeterone 3b-Imidazole Carbamate // *ACS Medicinal Chemistry Letters* – 2016 – V. 7 – Iss. 7 – P. 708–713.
66. Grossebrummel H., Peter T., Mandelkow R., Weiss M., Muzzio D., Zimmermann U., Walther R., Jensen F., Knabbe C., Zygmunt M., Burchardt M., Stope M. B. Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by

- modulation of oncogenic and apoptotic pathways // *International Journal of Oncology* – 2016 – V. 48 – Iss. 2 – P. 793–800.
67. Bruno R.D., Gover T.D., Burger A.M., Brodie A.M.H., Njar V.C.O. 17α -Hydroxylase/17,20-lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2008 – V. 7 – P. 2828–2836.
68. McCarty D. J., Huang W., Kane M. A., Purushottamachar P., Gediya L. K., Njar V. C. O. Novel galeterone analogs act independently of AR and AR-V7 for the activation of the unfolded protein response and induction of apoptosis in the CWR22Rv1 prostate cancer cell model // *Oncotarget* – 2017 – V. 8 – Iss. 51 – P. 88501–88516.
69. Kwegyir-Afful A. K., Bruno R. D., Purushottamachar P., Murigi F. N., Njar V. C. Galeterone and VNPT55 disrupt Mnk-eIF4E to inhibit prostate cancer cell migration and invasion // *FEBS Journal* – 2016 – V. 283 – Iss. 21 – P. 3898–3918.
70. Siddiqui N, Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer // *Biochemical Society Transactions* – 2015 – V. 43 – P. 763–772.
71. Kwegyir-Afful A. K., Murigi F. N., Purushottamachar P., Ramamurthy V. P., Martin M. S., Njar V. C. O. Galeterone and its analogs inhibit Mnk-eIF4E axis, synergize with gemcitabine, impede pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation and inhibit tumor growth in mice // *Oncotarget* – 2017 – V. 8 – P. 52381–52402.
72. Xu Y., Liao S., Wang L., Wang Y., Wei W., Su K., Tu Y., Zhu S. Galeterone sensitizes breast cancer to chemotherapy via targeting MNK/eIF4E and β -catenin // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* – 2021 – V. 87 – P. 85–93.
73. Kwegyir-Afful A. K., Ramalingam S., Ramamurthy V. P., Purushottamachar P., Murigi F. N., Vasaitis T. S., Huang W., Kane M. A., Zhang Y., Ambulos N., Tiwari S., Srivastava P., Nnane I. P., Hussain A., Qiu Y., Weber D. J., Njar V. C. O. Galeterone and the next generation galeterone analogs, VNPP414 and

- VNPP433-3 exert potent therapeutic effects in castration-/drug-resistant prostate cancer preclinical models in vitro and in vivo // *Cancers* –2019 – V. 11 – P. 1637.
74. Thomas E., Thankan R. S., Purushottamachar P., Huang, W., Kane, M.A., Zhang, Y., Ambulos N.P., Weber D.J., Njar V. C. O. Novel AR/AR-V7 and Mnk1/2 Degradar, VNPP433-3: Molecular Mechanisms of Action and Efficacy in AR-Overexpressing Castration Resistant Prostate Cancer In Vitro and In Vivo Models // *Cells* – 2022 – V. 11 – Iss. 17 – P. 2699.
75. Huelsken J., Behrens J. The Wnt signalling pathway // *Journal of Cell Science* – 2002 – V. 115 – P. 3977–3978.
76. Mosimann C., Hausmann G., Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation // *Natural Reviews Molecular and Cell Biology* – 2009 – V. 10 – Iss. 4 – P. 276–286.
77. Curtin J. C., Lorenzi M. V. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells // *Oncotarget* – 2010 – V. 1 – Iss. 7 – P.552–566.
78. Chesire D. R., Isaacs W. B. Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective // *Endocrine-Related Cancer* – 2003 – V. 10 – Iss. 4 – P. 537–560.
79. Yardy G. W., Brewster S. F. Wnt signalling and prostate cancer // *Prostate Cancer and Prostatic Disease* – 2005 – V. 8 – Iss. 2 – P. 119–126.
80. Hayden M. S., Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling // *Cell* – 2008 – V. 132 – Iss. 3 – P. 344–362.
81. Prasad S., Ravindran J., Aggarwal B. B. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship // *Molecular and Cellular Biochemistry* – 2010 – V. 336 – P. 25-37.
82. Jin R., Yi Y., Yull F. E., Blackwell T. S., Clark P. E., Koyama T., Smith J. A. - Jr, Matusik R. J. NF-κB gene signature predicts prostate cancer progression // *Cancer Research* – 2014 – V. 74 – Iss. 10 – P. 2763–2772.

83. De Miguel M.P., Royuela M., Bethencourt F.R., Santamaría L., Fraile B., Paniagua R. Immunoexpression of tumour necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate // *Cytokine* – 2000 – V. 12 – Iss. 5 – P. 535–538.
84. Bouraoui Y., Ricote M., García-Tuñón I., Rodriguez-Berriguete G., Touffehi M., Rais N. B., Fraile B., Paniagua R., Oueslati R., Royuela M. Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer // *Cancer Detection and Prevention* – 2008 – V. 32 – Iss. 1 – P. 23–32.
85. Xiao W., Hodge D. R., Wang L., Yang X., Zhang X., Farrar W. L. Cooperative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells // *Prostate* – 2004 – V. 61 – Iss. 4 – P. 354–370.
86. Nadiminty N., Lou W., Sun M., Chen J., Yue J., Kung H. J., Evans C. P., Zhou Q., Gao A. C. Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells // *Cancer Research* – 2010 – V. 70 – Iss. 8 – P. 3309–3319.
87. Zhang L., Altuwaijri S., Deng F., Chen L., Lal P., Bhanot U. K., Korets R., Wenske S., Lilja H. G., Chang C., Scher H. I., Gerald W. L. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth // *The American Journal of Pathology* – 2009 – V. 175 – Iss. 2 – P. 489–499.
88. Li W. X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling // *Trends in Cell Biology* – 2008 – V. 18 – P. 545–551.
89. Liu X., He Z., Li C. H., Huang G., Ding C., Liu H. Correlation analysis of JAK-STAT pathway components on prognosis of patients with prostate cancer // *Pathology and Oncology Research* – 2012 – V. 18 – Iss. 1 – P. 17–23.
90. Gao B., Shen X., Kunos G., Meng Q., Goldberg I. D., Rosen E. M., Fan S. Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells // *FEBS Letters* – 2001 – V. 488 – P. 179–184.

91. Dhir R., Ni Z., Lou W., DeMiguel F., Grandis J. R., Gao A. C. Stat3 activation in prostatic carcinomas // *Prostate* – 2002 – V. 51 – Iss. 4 – P. 241–246.
92. Bishop J. L., Thaper D., Zoubeidi A. The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer // *Cancers* – 2014 – V. 6 – P. 829–859.
93. Zhu M. L., Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells // *Endocrine-Related Cancer* – 2008 – V. 15 – Iss. 4 – P. 841–849.
94. Neto A. S., Tobias-Machado M., Wroclawski M. L., Fonseca F. L., Pompeo A. C., Del Giglio A. Molecular oncogenesis of prostate adenocarcinoma: role of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu) // *Tumori* – 2010 – V. 96 – P. 645–649.
95. Traish A. M., Morgentaler A. Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth // *British Journal of Cancer* – 2009 – V. 101 – Iss. 12 – P. 1949–1956.
96. Nickerson T., Chang F., Lorimer D., Smeekens S. P., Sawyers C. L., Pollak M. In vivo progression of LAPC `9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGFI) and IGF-I receptor (IGF-IR) // *Cancer Research* – 2001 – V. 61 – Iss. 16 – P. 6276–6280.
97. Kojima S., Inahara M., Suzuki H., Ichikawa T., Furuya Y. Implications of insulin-like growth factor-I for prostate cancer therapies // *International Journal of Urology* – 2009 – V. 16 – P. 161–167.
98. Dehm S. M., Schmidt L. J., Heemers H. V., Vessella R. L., Tindall D.J. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance // *Cancer Research* – 2008 – V. 68 – P. 5469–5477.

99. Fresno Vara J. A., Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer // *Cancer Treatment Reviews* – 2004 – V. 30 – P. 193–204.
100. Manning B. D., Cantley L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream // *Cell* – 2007 – V. 129 – Iss. 7 – P. 1261–1274.
101. Clegg N. J., Couto S. S., Wongvipat J., Hieronymus H., Carver B. S., Taylor B. S., Ellwood-Yen K., Gerald W. L., Sander C., Sawyers C. L. MYC cooperates with AKT in prostate tumorigenesis and alters sensitivity to mTOR inhibitors // *PLoS One* – 2011 – V. 6 – Iss. 3 – e17449.
102. Cinar B., Fang P. K., Lutchman M., Di Vizio D., Adam R. M., Pavlova N., Rubin M. A., Yelick P. C., Freeman M. R. The pro-apoptotic kinase Mst1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1 // *EMBO Journal* – 2007 – V. 26 – Iss. 21 – P. 4523–4534.
103. Chang F., Lee J. T., Navolanic P. M., Steelman L. S., Shelton J. G., Blalock W. L., Franklin R. A., McCubrey J. A. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy // *Leukemia* – 2003 – V. 17 – Iss. 3 – P. 590–603.
104. Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer // *Oncogene* – 2007 – V. 26 – Iss. 22 – P. 3279–3290.
105. Wagner E. F., Nebreda A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development // *Nature Reviews Cancer* – 2009 – V. 9 – P. 537–549.
106. Koul H. K., Pal M., Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors // *Genes Cancer* – 2013 – V. 4 – P. 342–359.
107. Katz M., Amit I., Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2007 – V. 1773 – P. 1161–1176.

108. Cargnello M., Roux P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases // *Microbiology and Molecular Biology Reviews* – 2011 – V. 75 – P. 50–83.
109. Joshi S., Plataniotis L. C. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes // *World Journal of Biological Chemistry* – 2014 – V. 5 – Iss. 3 – P. 321–333.
110. Hou J., Lam F., Proud C., Wang S.. Targeting Mnks for cancer therapy // *Oncotarget* – 2012 – V. 3 – P. 118–131.
111. Dorkin T. J., Robinson M. C., Marsh C., Bjartell A., Neal D. E., Leung H. Y. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease // *Oncogene* – 1999 – V. 18 – P. 2755–2761.
112. Steiner H., Godoy-Tundidor S., Rogatsch H., Berger A. P., Fuchs D., Comuzzi B., Bartsch G., Hobisch A., Culig Z. Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway // *American Journal of Pathology* – 2003 – V. 162 – P. 655–663.
113. Bianchini A., Loiarro M., Bielli P., Busà R., Paronetto M. P., Loreni F., Geremia R., Sette C. Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells // *Carcinogenesis* – 2008 – V. 29 – Iss. 12 – P. 2279–2288.
114. Ramamurthy V. P., Ramalingam S., Gediya L., Kwegyir-Afful A. K., Njar V. C. Simultaneous targeting of androgen receptor (AR) and MAPK interacting kinases (MNKs) by novel retinamides inhibits growth of human prostate cancer cell lines // *Oncotarget* – 2015 – V. 6 – P. 3195–3210.
115. Limami Y., Pinon A., Leger D. Y., Pinault E., Delage C., Beneytout J. L., Simon A., Liagre B. The P2Y2/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the

- resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells // *Biochimie* – 2012 – V. 94 – P. 1754–1763.
116. Katoh M. FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies // *Journal of Investigative Dermatology* – 2009 – V. 129 – Iss. 8 – P. 1861–1867.
117. Banday A. H., Akram S. M. M., Parveen R., Bashir N. Design and synthesis of D-ring steroidal isoxazolines and oxazolines as potential antiproliferative agents against LNCaP, PC-3 and DU-145 cells // *Steroids* – 2014 – V. 87 – P. 93–98.
118. Silva-Ortiz A. V., Bratoeff E., Ramirez-Apan M. T., Garcia-Becerra R., Ordaz-Rosado D., Noyola-Martinez N., Castillo-Bocanegra R., Barrera D. Synthesis and biological activity of two pregnane derivatives with a triazole or imidazole ring at C-21 // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2016 – V. 159 – P. 8–18.
119. Silva-Ortiz A. V., Bratoeff E., Ramirez-Apan T., Heuze Y., Sanchez A., Soriano J., Cabeza M. Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 1 5 α -reductase and on cancer cell line SK-LU-1 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry* – 2015 – V. 23 – Iss. 24 – P. 7535–7542.
120. Silva-Ortiz A. V., Bratoeff E., Ramirez-Apan T., Heuze Y., Sanchez A., Soriano J., Moreno I., Bravo M., Bautista L., Cabeza, M. Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 α -reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells // *Bioorganic & Medicinal Chemistry* – 2017 – V. 25 – Iss. 5 – P. 1600–1607.
121. Banday A. H., Shameen S. A., Gupta B. D., Kumar H. M. S. D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-ketopregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation // *Steroids* – 2010 – V. 75 – P. 801–804.

122. Hou Q., He C., Lao K., Luo G., You Q., Xiang H., Design and synthesis of novel steroidal imidazoles as dual inhibitors of AR/CYP17 for the treatment of prostate cancer // *Steroids* – 2019 – V. 150 – P. 108384 .
123. Shi Y. -K., Wang B., Shi X. -L., Zhao Y. -D., Yu B., Liu H. -M. Synthesis and biological evaluation of new steroidal pyridines as potential anti-prostate cancer agents // *European Journal of Medicinal Chemistry* – 2018 – V. 145 – P. 11–22.
124. Komendantova A. S., Scherbakov A. M., Komkov, A. V., Chertkova, V. V., Gudovanniy A. O., Chernoburova E. I., Sorokin D. V., Dzichenka Y. U., Shirinian V. Z., Volkova Y. A., Zavarzin I. V. Novel steroidal 1,3,4-thiadiazines: synthesis and biological evaluation in androgen receptor-positive prostate cancer 22Rv1 cells // *Bioorganic Chemistry* – 2019 – V. 91 – P. 103142.
125. Cortes-Benitez F., Cabeza M., Ramirez-Apan M. T., Alvarez-Manrique B., Bratoeff E. Synthesis of 17β -N-arylcarbamoylandrost-4-en-3-one derivatives and their anti-proliferative effect on human androgen-sensitive LNCaP cell line // *European Journal of Medicinal Chemistry* – 2016 – V. 121 – P. 737–746.
126. Lao K., Sun J., Wang C., Wang Y., You Q., Xiao H., Xiang H., Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 3-oxo-4-oxa- 5α -androst- 17β -amide Derivatives as Dual 5α -reductase Inhibitors and Androgen Receptor Antagonists // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2017 – V. 27 – Iss. 17 – P. 4212–4217.
127. Lao K., Sun J., Wang C., Lyu W., Zhou B., Zhao R., Xu Q., You Q., Xiang H., Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Androst-3,5-diene-3-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of 5α -Reductase Type 1 and 2 // *Steroids* – 2017 – V. 124 – P. 29–34.
128. Moreira V. M. A., Vasaitis T. S., Guo Z., Njar V. C. O, Salvador J. A. R. Synthesis of Novel C17 Steroidal Carbamates. Studies on CYP17 Action, Androgen Receptor Binding and Function, and Prostate Cancer Cell Growth // *Steroids* – 2008 – V. 73 – Iss. 12 – P. 1217–1227.

129. Gasi K. M., Brenesel M. D.j, Djurendić E. A., Sakac, M. N., Canadi J. J., Daljev J. J., Armbruster T., Andrić S., Sladić D. M., Bozić T. T., Novaković I. T., Juranić, Z. D. Synthesis and biological evaluation of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives // *Steroids* – 2007 – V. 72 – Iss. 1 – P. 31–40.
130. Djurendic E., Ajducovic J. J., Sakac M., Csanadi J., Kojic V., Bogdanovic G., Penov Gasi K. Synthesis and cytotoxic activity of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives // *European journal of medicinal chemistry* – 2012 – V. 54 – P. 784–792.
131. Ajducovic J. J., Djurendic E., Petri E. T., Klisuric O., Celic A., Sakac M., Jakimov D., Penov Gasi K. 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies // *Bioorganic & Medicinal Chemistry* – 2013 – V. 21 – Iss. 23 – P. 7257–7266.
132. Szabo N., Ajduković J. J., Djurendić E. A., Sakač M. N., Ignath I., Gardi J., Mahmoud G., Klisurić O. R., Jovanović-Šanta S., Penov-Gaši, K. M., Szecsi M. Determination of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450 17 α) enzyme activities and their inhibition by selected steroidal picolyl and picolinylidene compounds // *Acta Biologica Hungarica* – 2015 – V. 66 – Iss. 1 – P. 41–51.
133. Djurendic E., Daljev J., Sakac M., Csanadi J., Jovanovic-Santa S., Andric S., Klisuric O., Kojic V., Bogdanovic G., Djurendic-Brenesel M., Novakovic S., Penov-Gasi, K. M. Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity // *Steroids* – 2008 – V. 73 – Iss. 1 – P. 129–138.
134. Rasmusson G. H., Arth G. E. *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, vol. / J. Fried, J.A. Edwards (Eds.) – Van Nostrand Reinhold Company, 1972, P. 237.

135. . Stulov S. V, Tkachev Y. V., Novikov R. A., Zavialova M. G., Timofeev V. P., Misharin A. Y. Synthesis of 21-nitrogen substituted pregna-5,17(20)-dienes from pregnenolone // *Steroids* – 2012 – V. 77 – P. 77–84.
136. Stulov S. V., Mankevich O. V., Novikov R. A., Tkachev Y. V., Timofeev V. P., Dugin N. O., Pozdnev V. F., Fedyushkina I. V., Scherbinin D. S., Veselovsky A. V., Misharin A. Y. Synthesis and molecular modeling of (4'R)- and (4'S)- 4'-substituted 2'-{[(E)-3 β -hydroxyandrost-5-en-17)-yliden]methyl}oxazolines. // *Steroids* – 2013 – V. 78 - P. 521–527.
137. 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. Comparison of [17(20)E]-21-norpregnene oxazolanyl and benzoxazolyl derivatives as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells growth // *Steroids* – 2018 – V. 129 – P 24–34.
138. 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. Синтез азотсодержащих производных 17(20)-прегненовой, 17 \square -гидроксипрегнановой и 17 \square -гидроксипрегнановой кислот — новых потенциальных антиандрогенов // *Известия РАН, серия химическая* – 2018 – №4 – С. 667–681.
139. 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. New azole derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene: synthesis and inhibition of prostate carcinoma cell growth // *Steroids* – 2019 – V. 147 – P. 10–18.
140. 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. New steroidal oxazolines, benzoxazoles and benzimidazoles related to abiraterone and galeterone // *Steroids* – 2020 – V. 153 – P. 108534.

141. Hwang S. -H., Blaskovich M. A., Kim H. -O. A convenient reduction of α -amino acids to 1,2-amino alcohols with retention of optical purity // *The Open Organic Chemistry Journal* – 2008 – V. 2 – P. 107–109.
142. Zoete V., Cuendet M. A., Grosdidier A., Michielin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules // *Journal of Computer Chemistry* – 2011 – V. 32 – P. 2359–2368.
143. Shahrokh K., Orendt A., Yost G., Cheatham T. Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle // *Journal of Computer Chemistry* – 2012 – V. 33 – P. 119–133.
144. Humphrey W., Dalke A., Schulten K., VMD: visual molecular dynamics // *Journal of Molecular Graphics* – 1996 – V. 14 – P. 33–38.
145. Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD // *Journal of Computer Chemistry* – 2005 – V. 26 – P. 1781–1802.
146. Kimura K., Itakura Y., Goto R., Tojima M., Egawa N., Yoshihama M., Inhibition of 17 α -Hydroxylase/C17,20 - Lyase (CYP17) from Rat Testis by Green Tea Catechins and Black Tea Theaflavins // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* – 2007 – V. 71 – P. 2325–2328.
147. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods* – 1983 – 65, 55–63.
148. Zhdanov D. D., Gladilina Y. A., Grishin D. V., Grachev V. A., Orlova V. S., Pokrovskaya M. V., Alexandrova S. S., Pokrovsky V. S., Sokolov N. N. Contact-independent suppressive activity of regulatory T cells is associated with telomerase inhibition, telomere shortening and target lymphocyte apoptosis // *Molecular Immunology* – 2018 – V. 101 – P. 229–244.

149. Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova V.S., Gotovtseva V.Y., Bibikova M. V., Pokrovsky V. S., Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S. S, Sokolov N. N. Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT and death of tumor cells // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* – 2016 – V. 10 – P. – 310–321.
150. Nnane I., Njar V. C., Brodie A. A. Pharmacokinetic profile of 3 β -hydroxy-17-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)androsta-5,16-diene (VN/87-1), a potent androgen synthesis inhibitor, in mice // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2001 – V. 78 – Iss. 3 – P. 241–246.
151. Kuzikov A. V., Dugin N. O., Stulov S. V., Shcherbinin D. S., Zharkova M. S., Tkachev Y. V., Timofeev V. P., Veselovsky A. V., Shumyantseva V. V., Misharin A. Y. Novel oxazolinyll derivatives of pregna-5,17(20)-diene as 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors // *Steroids* – 2014 – V. 88 – 66–71.
152. Conner K. P., Woods C., Atkins W. M. Interactions of cytochrome P450s with their ligands *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2011 – V. 507 – P. 56.
153. Стулов С. В. Новый подход к синтезу 21-азотсодержащих стероидных производных: дис. на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.10 / Стулов Сергей Владимирович – М., 2013 – 176 с.
154. Золотцев В. А. Синтез азотсодержащих производных прегнанового ряда – потенциальных противоопухолевых агентов: дис. на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.03 / Золотцев Владимир Александрович – М., 2019 – 119 с.
155. Purushottamachar P., Murigi F. N., Njar V. C. O. Improved Procedures for Gram-Scale Synthesis of Galeterone 3b-Imidazole and Galeterone 3b-Pyridine Methoxylate, Potent Androgen Receptor/Mnk Degrading Agents // *Organic Process Research & Development* – 2016 – V. 20 – Iss. 9 – P. 1654–1661.

156. Purushottamachar P., Thomas E., Thankan R. S., Rudchenko V., Huang G., Njar V. C. O. Large-scale synthesis of galeterone and lead next generation galeterone analog VNPP433-3 β // *Steroids* – 2022 – V. 185 – P. 109062.
157. Wang A., Luo X., Wang Y., Meng X., Lu Z., Yang Y. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Androgen Receptor Degrading and Antagonizing Bifunctional Steroidal Analogs for the Treatment of Advanced Prostate Cancer // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2022 – V. 65 – P. 12460–12481.