

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НОВЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АНДРОСТАНА, ПОДАВЛЯЮЩИЕ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ

А.С. Латышева^{1}, А.Ю. Мишарин¹, А.В. Веселовский¹, Г.Е. Морозевич¹, Р.А. Новиков², В.А. Золотцев¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: aidanlinch@gmail.com

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Синтезированы производные 3 β -гидроксиандроста-5,16-диена и 3 β -гидроксиандрост-5-ена, содержащие при С-17 2-оксазолиновый, 2-бензоксазоловый и 2-бензимидазоловый заместитель. Докинг синтезированных соединений в активный центр СYP17A1 прогнозировал их высокое сродство к ферменту. Из 6 новых соединений 5 подавляли пролиферацию клеток карциномы простаты LNCaP и PC-3, причём активность оксазолинового и бензимидазолового производных андроста-5,16-диена существенно превосходила активность известных противораковых агентов абиратерона и галетерона.

Ключевые слова: азотсодержащие стероидные производные; клетки карциномы простаты; ингибиторы СYP17A1; синтез производных стероидов; антипролиферативная активность; молекулярный докинг

DOI: 10.18097/BMCRM00241

ВВЕДЕНИЕ

Многие синтетические стероидные производные привлекают внимание исследователей в качестве потенциальных препаратов для терапии гормон-зависимых онкологических заболеваний, в первую очередь рака предстательной железы (РПЖ). Производные андростана, содержащие в положении 17 азотсодержащий гетероцикл (3-пиридил-, 2-пиридил-, 4-пиридил-, 1-пиразолил-, 1-имидазолил-, 1,2,3-триазол-1-ил-, 1,2,3-триазол-2-ил-, 1,2,4-триазол-1-ил-, 1H-бензимидазол-1-ил-) способны подавлять активность ключевого фермента биосинтеза андрогенов — 17 α -гидроксиллазы-17/20-лиазы (СYP17A1) и андрогенового рецептора, а также пролиферацию клеток карциномы простаты [1–6]. Два соединения этого ряда — андроста-5,16-диен-17-(3-пиридил)-3 β -ол (абиратерон) **1** и андроста-5,16-диен-гидрокси-17-(1H-бензимидазол-1-ил)-3 β -ол (галетерон, известный также как VN/124-1 и ТОК-001) **2** — обладают высоким фармакологическим потенциалом [7–9]. Абиратерон (**1**) рекомендован в качестве препарата для лечения поздних стадий РПЖ; галетерон (**2**) охарактеризован как комплексный противораковый препарат, обладающий тремя активностями — ингибитора СYP17A1, антагониста рецептора андрогенов и агента, ускоряющего его протеосомную деградацию.

В настоящее время разработаны схемы синтеза различных гибридных молекул, объединяющих в своей структуре стероидный фрагмент и азотсодержащий гетероцикл; получено множество биологически активных азотсодержащих стероидных производных [6, 10–20]. Работы в этой области

являются современным научным трендом и активно ведутся во многих научных коллективах, в том числе и в нашей группе.

В данной работе мы синтезировали небольшую серию новых азотсодержащих производных андростана **3–8** (рис. 1), построили молекулярные модели связывания этих соединений в активном центре СYP17A1 и провели первичный скрининг их антипролиферативной активности в клетках карциномы простаты.

Стероидный фрагмент соединений **3–5** (3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил) идентичен таковому в структуре абиратерона и галетерона, стероидный фрагмент соединений **6–8** представляет собой его 16-насыщенный аналог. В качестве азотсодержащих гетероциклов были выбраны: оксазолин-2-ил (в соединениях **3** и **6**), бензоксазол-2-ил (в соединениях **4** и **7**) и бензимидазол-2-ил (в соединениях **5** и **8**). Ранее мы разработали удобный синтез этих гетероциклов исходя из соответствующих карбоновых кислот, а также показали, что производные 17(20)-21-норпрегнена, модифицированные этими гетероциклами, обладают высокой антипролиферативной активностью [21–24].

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют, что соединения **3** и **5** способны взаимодействовать с СYP17A1, подавляют пролиферацию андроген-зависимых и андроген-независимых клеток карциномы простаты значительно более эффективно, нежели абиратерон и галетерон, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для разработки новых противораковых препаратов.



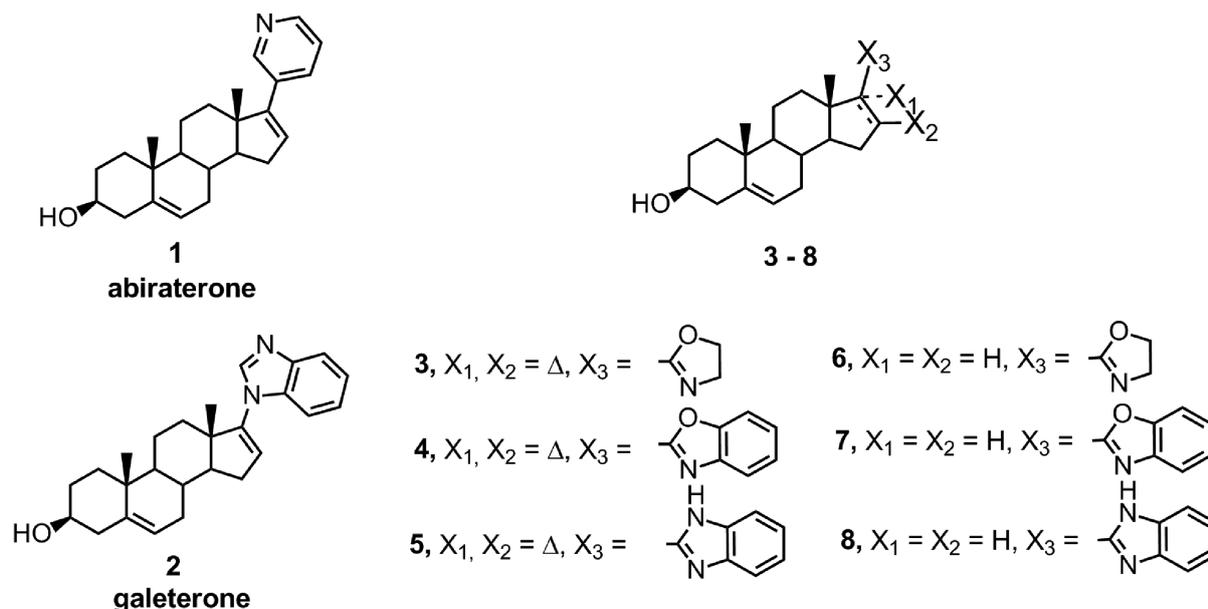


Рисунок 1. Структуры азотсодержащих производных андростана 1-8.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Абиратерон (1) был получен от компании “ChemLeader Ltd” (Китай) галетерон (2) — от компании “Selleck” (США), 3β-ацетоксиандроста-5,16-диен-17-карбоновая кислота **9** была синтезирована по методу [4], 3β-ацетоксиандрост-5-ен-17β-карбоновая кислота **10** — по методу [25]; химические реактивы были получены от “Merck”, “Aldrich” (США), “Acros” и “МедХимЛаб” (Россия); растворители были очищены стандартными методами.

Синтез оксазолинов 3 и 6

Суспензию пиридиниевой соли 3β-ацетоксиандроста-5,16-диен-17-карбоновой или 3β-ацетоксиандрост-5-ен-17β-карбоновой кислоты (1.0 ммоль) и трифенилфосфина (996 мг, 3.8 ммоль) в 10 мл абсолютного ацетонитрила охлаждали до 2°C при постоянном перемешивании. Далее в течение 10 мин по каплям прибавляли смесь CCl₄ (0.97 мл, 10 ммоль) и абсолютного ацетонитрила (5 мл) и смесь продолжали перемешивать при 2°C до полного растворения осадка (≈90 мин). К полученному раствору при 2°C в течение 10 мин по каплям прибавляли смесь этаноламина (80 мкл, 1.3 ммоль), триэтиламина (557 мкл, 4.0 ммоль) и абсолютного ацетонитрила (5 мл), смесь перемешивали при 2°C в течение 10 мин. Охлаждение снимали и смесь продолжали перемешивать при ambientной температуре ещё 2 ч. Раствор концентрировали до объёма 5 мл и разбавляли бензолом (30 мл). Полученный раствор промывали насыщенным раствором K₂CO₃ (10 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растворяли в кипящей смеси 9 мл толуола и 12 мл гексана. Далее раствор выдерживали 2 ч при комнатной температуре, отделяли выпавший кристаллический осадок трифенилфосфиноксида, фильтрат упаривали, остаток очищали при помощи флэш-хроматографии

на силикагеле в системе гексан-ацетон (2 : 1). Фракцию, содержащую ацелированный оксазолин, упаривали досуха, остаток растворяли в метаноле (5 мл), к раствору добавляли воду (3 мл) и K₂CO₃ (1.0 г), смесь кипятили при перемешивании в течение 40 мин. После охлаждения к остатку добавляли хлороформ (20 мл) и воду (5 мл). Водный слой экстрагировали хлороформом (15 мл). Объединённый хлороформный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали, очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле в системе гексан-ацетон (3 : 2) и кристаллизовали из метанола.

2'-(3β-гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 3 (185 мг, 0.54 ммоль, 54%); белые иглы с т. пл. 165°C; МСВР, рассчитано для [C₂₂H₃₂NO₂]⁺: 342.2428, найдено: 342.2419; ¹H ЯМР (CD₃OD): 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, CH₂-оксазолин); 5.38 (1H, м, H-6); 6.54 (1H, дд, J = 2.0 Гц, J = 3.2 Гц H-16); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 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').

2'-(3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол 6 (151 мг, 0.44 ммоль, 44%); белые иглы с т. пл. 181°C; МСВР, рассчитано для [C₂₂H₃₄NO₂]⁺: 344.2584, найдено: 344.2569; ¹H ЯМР (CD₃OD): 0.72 (3H, с, H-18); 1.05 (3H, с, H-19); 3.42 (1H, м, H-3); 3.78 и 4.28 (каждый 2H, м, CH₂-оксазолин); 5.36 (1H, м, H-6); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 12.1 (C-18); 18.4 (C-19); 20.7 (C-11); 24.1 (×2) (C-15, C-16); 30.9 (C-2); 31.5 (C-7); 32.1 (C-8); 36.4 (C-10); 37.2 (C-1); 38.0 (C-1); 41.7 (C-4); 43.7 (C-13); 49.5 (C-17); 50.4 (C-9); 52.9 (C-5'); 56.0 (C-14); 66.9 (C-4'); 71.0 (C-3); 120.7 (C-6); 141.1 (C-5); 170.7 (C-2').

Синтез бензоксазолов 4 и 7

Смесь 3 β -ацетоксиандроста-5,16-диен-17-карбоновой или 3 β -ацетоксиандрост-5-ен-17 β -карбоновой кислоты (1.0 ммоль), трифенилфосфина (996 мг, 3.8 ммоль), абсолютного пиридина (6 мл) и абсолютного ацетонитрила (6 мл) при постоянном перемешивании охлаждали до 2°C. Далее в течение 10 мин по каплям прибавляли смесь CCl₄ (0.97 мл, 10 ммоль) и абсолютного ацетонитрила (2 мл) и продолжали перемешивать при 2°C в течение 90 мин. К полученному раствору при 2°C в течение 10 мин по каплям прибавляли смесь *o*-аминофенола (142 мг, 1.3 ммоль), абсолютного пиридина (0.4 мл, 5 ммоль) и абсолютного ацетонитрила (5 мл). Смесь перемешивали при 2°C в течение 10 мин, затем прибавляли трифенилфосфин (512 мг, 2.0 ммоль) и перемешивали при 50°C в течение 3 ч. Затем смесь концентрировали до объёма 5 мл и разбавляли бензолом (50 мл). Полученный раствор промывали насыщенным раствором K₂CO₃ (10 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растворяли в кипящей смеси 9 мл толуола и 12 мл гексана. Раствор выдерживали 2 ч при комнатной температуре, отделяли выпавший кристаллический осадок трифенилфосфиноксида, фильтрат упаривали, остаток очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле в системе гексан-ацетон (2 : 1). Фракцию, содержащую ацетилированный бензоксазол, упаривали досуха, остаток растворяли в метаноле (5 мл), к раствору добавляли воду (3 мл) и K₂CO₃ (1.0 г). Смесь кипятили при перемешивании в течение 40 мин. После охлаждения к остатку добавляли хлороформ (20 мл) и воду (5 мл), водный слой экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2 : 1, 15 мл); объединённый хлороформный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали, очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле в системе гексан-ацетон (3 : 2) и кристаллизовали из метанола.

2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-бензоксазол 4 (156 мг, 0.4 ммоль, 40%); светло-бежевые иглы с т. пл. 173°C; МСВР, рассчитано для [C₂₆H₃₂NO₂]⁺: 390.2428, найдено: 390.2422; ¹H ЯМР (CD₃OD): 1.12 и 1.13 (каждый 3H, с, H-18, H-19); 3.43 (1H, м, H-3); 5.39 (1H, м, H-6); 6.91 (1H, дд, J = 2.0 Гц, J = 3.3 Гц); 7.34 (2H, м, арил); 7.50–7.75 (2H, м, арил); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 15.1 (C-19); 18.4 (C-18); 20.6 (C-11); 30.4 (C-8); 31.0 (C-2); 31.2 (C-7); 31.9 (C-15); 34.9 (C-12); 36.4 (C-10); 37.1 (C-1); 41.7 (C-4); 46.6 (C-13); 50.8 (C-9); 57.0 (C-14); 71.0 (C-3); 109.9 (C-5'); 119.2 (C-8'); 120.5 (C-6); 124.5 (C-6'); 124.9 (C-7'); 138.8 (C-16); 141.5 (x2) (C-5, C-4'); 142.4 (C-17); 149.9 (C-9'); 168.0 (C-2').

2'-(3 β -гидроксиандрост-5-ен-17 β -ил)-бензоксазол 7 (166 мг, 0.42 ммоль, 42%); молочно белые иглы с т. пл. 215°C; МСВР, рассчитано для [C₂₆H₃₄NO₂]⁺: 392.2584, найдено: 392.2577; ¹H ЯМР (CD₃OD): 0.66 (3H, с, H-18); 1.05 (3H, с, H-19); 3.03 (1H, м, H-17); 3.44 (1H, м, H-3); 5.39 (1H, м, H-6); 7.35 (2H, м, арил); 7.50–7.75 (2H, м, арил); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 12.4 (C-18); 18.4 (C-19); 20.7 (C-11); 24.2 (C-15); 24.5 (C-16);

31.0 (C-2); 31.5 (C-7); 32.2 (C-8); 36.4 (C-10); 37.2 (C-1); 37.9 (C-12); 41.7 (C-4); 45.2 (C-13); 50.2 (C-17); 50.4 (C-9); 56.1 (C-14); 71.0 (C-3); 109.9 (C-5'); 118.6 (C-8'); 120.7 (C-6); 124.0 (C-6'); 124.5 (C-7'); 140.5 (C-4'); 141.1 (C-5); 150.7 (C-9'); 168.6 (C-2').

Синтез бензимидазолов 5 и 8

3 β -Ацетоксиандроста-5,16-диен-17-карбоновую или 3 β -ацетоксиандрост-5-ен-17 β -карбоновую кислоту (1 ммоль) высушивали упариванием с абсолютным толуолом, к остатку добавляли абсолютный толуол (5 мл). Смесь охлаждали до 2°C, и при перемешивании по каплям прибавляли раствор оксалилхлорида (0.5 мл, 6.0 ммоль) в абсолютном толуоле (5 мл). Смесь перемешивали 10 мин при 2°C, полученный раствор выдерживали 2 ч при комнатной температуре, упаривали досуха, остаток трижды переупаривали с абсолютным толуолом, и растворяли в 5 мл абсолютного толуола. Полученный раствор по каплям добавляли к перемешиваемому раствору *o*-фенилендиамин (152 мг, 1.4 ммоль) и триэтиламина (0.16 мл, 2.0 ммоль) в 3 мл абсолютного дихлорметана при 2°C. Смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре, упаривали; к остатку добавляли хлороформ (20 мл) и насыщенный раствор NaHCO₃ (10 мл). Хлороформный экстракт последовательно промывали водой (10 мл), 1% HCl (2x 10 мл), насыщенным раствором NaCl (2x 5 мл), сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Полученный в виде сухой жёлтой пены 3 β -ацетокси-17-(2-аминофенилкарбамоил)-андроста-5,16-диен растворяли в 8 мл абсолютного толуола, раствор переносили в круглодонную колбу объёмом 50 мл и добавляли 100 мг кислой Al₂O₃. Смесь упаривали досуха. Колбу, содержащую остаток в виде твёрдой плёнки, помещали в микроволновую печь и проводили облучение при 700 W в течение 8 мин. К остатку добавляли хлороформ (5 мл), триэтиламин (0.1 мл) и силикагель (1.5 г); смесь упаривали досуха, и остаток наслаивали на сухой силикагель, помещённый в короткую хроматографическую колонку. Фракцию, содержащую ацетилированный бензимидазол, элюировали смесью гексан-ацетон (2 : 1) упаривали досуха, остаток растворяли в метаноле (5 мл). К раствору добавляли воду (3 мл) и K₂CO₃ (1.0 г). Смесь кипятили при перемешивании в течение 40 мин. После охлаждения к остатку добавляли хлороформ (20 мл) и воду (5 мл). Водный слой экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2 : 1, 15 мл). Объединённый хлороформный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали, очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле в системе гексан-ацетон (3 : 2) и кристаллизовали из метанола.

2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-(1H)-бензимидазол 5 (260 мг, 0.67 ммоль, 67%); светло-бежевые пластинки с т. пл. 190°C; МСВР, рассчитано для [C₂₆H₃₃N₂O]⁺: 389.2587, найдено: 389.2577; ¹H ЯМР (CD₃OD): 1.13 (3H, с, H-18); 1.18 (3H, с, H-19); 3.45 (1H, м, H-3); 5.40 (1H, м, H-6); 6.59 (1H, дд, J = 1.9 Гц, J = 3.3 Гц, H-16), 7.21 и 7.35 (каждый 2H, м, арил); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 15.2 (C-18);

18.4 (C-19); 20.6 (C-11); 30.4 (C-8); 31.0 (C-2); 31.3 (C-7); 31.6 (C-15); 34.9 (C-12); 36.6 (C-10); 37.1 (C-1); 41.7 (C-4); 46.7 (C-13); 50.9 (C-9); 57.4 (C-14); 71.1 (C-3); 114.3 (×2) (C-5', C-8'); 120.6 (C-6); 122.0 (×2) (C-6', C-7'); 133.6 (C-16); 141.4 (C-5); 145.3 (C-17), 149.3 (×2) (C-4', C-9'); 159.2 (C-2').

2'-(3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-ил)-(1H)-бензимидазол 8 (250 мг, 0.64 ммоль, 64%); молочно-белые пластинки с т. пл. 210°C. МСВР, рассчитано для [C₂₆H₃₅N₂O]⁺: 391.2744, найдено: 391.2741; ¹H ЯМР (CD₃OD): 0.65 (3H, с, H-18); 1.04 (3H, с, H-19); 2.98 (1H, т, J = 9.9 Гц, H-17); 3.44 (1H, м, H-3); 5.38 (1H, м, H-6); 7.19 и 7.52 (каждый 2H, м, арил); ¹³C ЯМР (CD₃OD): 12.4 (C-18); 18.4 (C-19); 20.7 (C-11); 24.2 (C-15); 25.0 (C-16); 30.9 (C-2); 31.6 (C-7); 32.3 (C-8); 36.4 (C-10); 37.2 (C-1); 37.7 (C-12); 41.7 (C-4); 44.9 (C-13); 50.5 (C-9); 50.8 (C-17); 56.2 (C-14); 71.1 (C-3); 113.9 (×2) (C-5', C-8'); 120.8 (C-6); 121.7 (×2) (C-6', C-7'); 137.9 (×2) (C-4', C-9'); 141.1 (C-5); 155.4 (C-2').

¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР спектры регистрировали на приборе Avance III (300 МГц, "Bruker", Германия) в CDCl₃ или CD₃OD; значения δ CHCl₃ в спектрах ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР: 7.25 и 77.16 соответственно. Масс-спектры высокого разрешения (МСВР) регистрировали на приборе Apex Ultra FT ICR MS ("Bruker") в режиме ионизации электроспреем. Температуру плавления кристаллических соединений определяли в стеклянном капилляре.

Флэш-хроматографию проводили на силикагеле G (0.060–0.200 мм, "Acros", Бельгия) и силикагеле G (0.015–0.040 мм, "Merck", Германия) в стеклянных колонках при атмосферном давлении; аналитическую ТСХ проводили на пластинках UV254-NPTLC silica gel plates ("Merck"). Визуализацию веществ на хроматограммах проводили в УФ свете (254 нм) и/или опрыскиванием 2.5% раствором (NH₄)₂Mo₂O₇ в 5% водном растворе серной кислоты с последующим нагреванием.

Докинг соединений 3–8 в активный центр CYP17A1

Для построения моделей взаимодействия соединений 3–8 с цитохромом CYP17A1 была использована структура комплекса человеческого CYP17A1 с абиратероном, полученная из PDB (id — 3RUK). Структуры соединений 3–8 строили в программе SYBYL 8.1 ("Tripos Inc.", США). Структуры низкомолекулярных соединений и белка оптимизировали методом минимизации энергии по методу Пауэлла с использованием силового поля Tripos в вакууме. Парциальные атомные заряды белка и исследуемых лигандов рассчитывали методом Гастайгера-Хьюкеля. Докинг проводили с использованием программы Autodock Vina [26]. Межмолекулярные взаимодействия между белком и лигандами определяли с помощью PLIP сервера [27].

Влияние соединений 3–8 на пролиферацию клеток LNCaP и PC-3

Клетки LNCaP и PC-3 ("ATCC", США) культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотку телёнка (FCS; "Gibco", США), и

1% смесь пенициллина и стрептомицина ("Gibco") в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч. Для эксперимента клетки пересаживали в 96-ячеечные планшеты с плотностью 2×10⁴ клеток на ячейку, культивировали 48 ч и затем инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 96 ч. После инкубации к клеткам прибавляли раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ, 5 мг/мл), инкубировали 4 ч, после чего определяли поглощение при 570 нм на приборе SpectraMax 190 Microplate Reader ("Molecular Bioproducts", США) [28]. Жизнеспособность клеток, выражали в процентах от контроля. Каждый эксперимент проводили в трёх повторах и независимо повторяли не менее четырёх раз. Значения GI₅₀ (growth inhibition 50%) для исследуемых соединений рассчитывали по уравнению Хилла с использованием программы SPSS 21 в диапазоне концентраций от 10 до 40 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема синтеза соединений 3–8 представлена на рисунке 2. 3β-Ацетоксиандроста-5,16-диен-17-карбоновая кислота **9** и 3β-ацетоксиандрост-5-ен-17β-карбоновая кислота **10** были превращены в оксазолины **3** и **6**, а также в бензоксазолы **4** и **7** методами, разработанными нами ранее [21, 24]. Для получения бензимидазолов **5** и **8** кислоты **9** и **10** сначала превращали в соответствующие хлорангидриды реакцией с оксалилхлоридом, затем добавляли *o*-фенилендиамин; полученные амиды без выделения подвергали микроволновому облучению в присутствии Al₂O₃, что приводило к циклизации; удаление ацетатной защитной группы приводило к целевым продуктам.

Соединения 3–8 были выделены в индивидуальном состоянии, их структура была охарактеризована спектрами ¹H ЯМР и ¹³C ЯМР и МСВР.

Модели взаимодействия соединений 3–8 с CYP17A1 были построены с использованием молекулярного докинга (рис. 3).

На рисунке 3А представлены результаты контрольного докинга абиратерона (**1**) и галетерона (**2**) в активный центр CYP17A1 человека, воспроизводящие структуры белок-лигандных комплексов (PDB id — 3RUK и 3SWZ) со значением RMSD 0.51 Å.

На рисунке 3В представлены результаты докинга оксазолинов **3** и **6** в активный центр CYP17A1, показывающие, что атом железа гема образует координационную связь с атомом азота оксазолинового цикла; стероидный цикл оксазолинов **3**, **6** и абиратерона (**1**) располагается практически одинаково; 3β-гидроксильная группа всех соединений расположена близко к остатку Asn-202, что делает возможным образование соответствующих водородных связей.

Докинг бензоксазолов **4** и **7** (рис. 3С) и бензимидазолов **5** и **8** (рис. 3Д) в активный центр CYP17A1 показывает, что производные андроста-5,16-диена **4** и **5** способны образовать

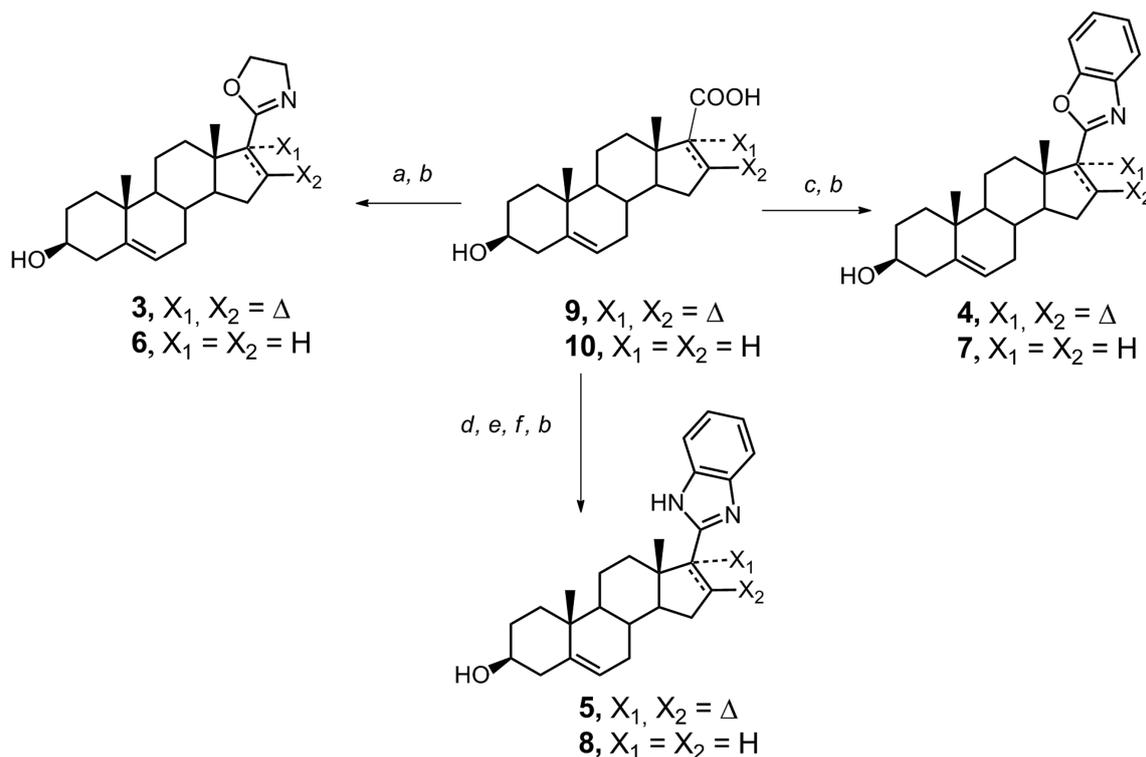


Рисунок 2. *a* – Ph_3P , $\text{CCl}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$, 2°C , 2 ч, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{Et}_3\text{N} / \text{CH}_3\text{CN}$, $2^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 2 ч; *b* – $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$, Δ , 40 мин; *c* – Ph_3P , $\text{CCl}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$, Py , 2°C , 2 ч, *o*- $\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OH}$, $\text{Py} / \text{CH}_3\text{CN}$, $+50^\circ\text{C}$, 3 ч; *d* – $(\text{COCl})_2 / \text{толуол}$, $2^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 2 ч; *e* – *o*- $\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NH}_2$, $\text{Et}_3\text{N} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$, 2°C , 2 ч; *f* – Al_2O_3 , микроволновое излучение.

стабильный комплекс с ферментом, аналогичный комплексу CYP17A1-галетерон, в котором атом азота гетероцикла координируется с железом гема. Напротив, производные андрост-5-ена **7** и **8** могут связываться в активном центре CYP17A1 только если гетероцикл располагается параллельно плоскости гема.

Таким образом, результаты докинга показали возможность связывания соединений **3–8** с CYP17A1, а также, что положение соединения в активном центре определяется структурой гетероцикла и присутствием двойной связи в положении 16.

Известно, что абиратерон и галетерон слабо влияют на пролиферацию клеток LNCaP и PC-3 при кратковременной (24 ч) инкубации, однако значительно подавляют её при продолжительной (96 ч и 120 ч) инкубации [29, 30]. Оценивая пролиферацию клеток по МТТ-тесту [28], мы нашли, что соединения **3–8** оказывают на клетки аналогичный эффект. В таблице 1 приведены данные для соединений **1–8** при 96 ч инкубации.

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что способность подавлять пролиферацию клеток LNCaP и PC-3 зависит от структуры гетероцикла (оксазолин > бензимидазол > бензоксазол) и наличия двойной связи в положении 16 (ненасыщенные > насыщенные). Среди новых соединений выявлены два: 2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол **3** и 2'-(3 β -гидроксиандроста-5,16-диен-17-ил)-(1H)-бензимидазол **5**, антипролиферативная активность которых значительно превышала активность абиратерона и галетерона.

Таблица 1. Влияние соединений **1–8** на пролиферацию клеток LNCaP и PC-3 (GI_{50} (\pm CO, мкМ))

Соединение	LNCaP	PC-3
1 (Абиратерон)	22.6 \pm 4.9	17.2 \pm 5.2
2 (Галетерон)	10.6 \pm 2.0	10.8 \pm 1.8
3	2.7 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6
4	28.8 \pm 7.1	33.6 \pm 9.6
5	3.8 \pm 1.1	6.9 \pm 1.3
6	11.6 \pm 3.6	10.7 \pm 2.6
7	>50	>50
8	20.8 \pm 4.70	20.1 \pm 3.6

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не включает исследования, в которых в качестве объекта выступали люди или животные.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

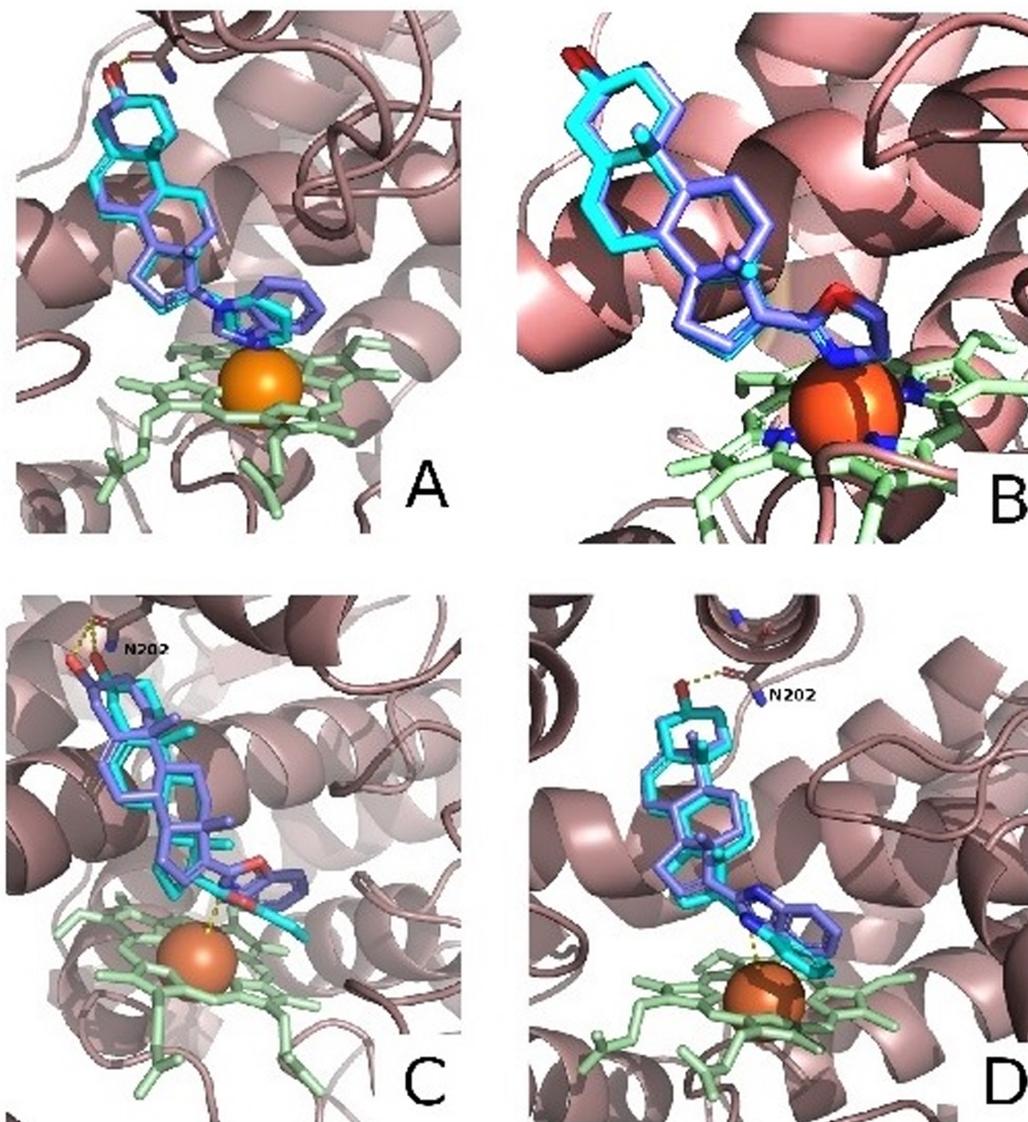


Рисунок 3. Докинг исследуемых соединений в активный центр CYP17A1. **А** – абиратерон **1** (циановый, $\Delta G = -9.3$ ккал/моль), галетерон **2** (синий, $\Delta G = -12.9$ ккал/моль); **В** – оксазолины **3** (синий, $\Delta G = -9.3$ ккал/моль) и **6** (циановый, $\Delta G = -9.2$ ккал/моль); **С** – бензоксазолы **4** (синий, $\Delta G = -10.5$ ккал/моль) и **7** (циановый, $\Delta G = -8.2$ ккал/моль); **Д** – бензимидазолы **5** (синий, $\Delta G = -10.7$ ккал/моль) и **6** (циановый, $\Delta G = -8.3$ ккал/моль).

ЛИТЕРАТУРА

- Ling, Y.Z., Li, J.S., Liu, Y., Kato, K., Klus, G.T., Brodie, A. (1997) 17-Imidazolyl, pyrazolyl, and isoxazolyl androstene derivatives. Novel steroidal inhibitors of human cytochrome C17,20-lyase (P450(17 alpha)). *J. Med. Chem.*, **40**(20), 3297–3304. DOI: 10.1021/jm970337k
- Njar, V.C.O., Kato, K., Nnane, I.P., Grigoryev, D.N., Long, B.J., Brodie, A. (1998) Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome 17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase (P450(17) alpha): Potential agents for the treatment of prostate cancer. *J. Med. Chem.*, **41**(6), 902–912. DOI: 10.1021/jm970568r
- Njar, V.C., Brodie, A.M. (1999) Inhibitors of 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17): Potential agents for the treatment of prostate cancer. *Curr. Pharm. Des.*, **5**(3), 163–180.
- Zhu, N., Ling, Y., Lei, X., Handratta, V., Brodie, A.M.H. (2003) Novel P450(17alpha) inhibitors: 17-(2'-oxazolyl)- and 17-(2'-thiazolyl)-androstene derivatives. *Steroids*, **68**(7–8), 603–611. DOI: 10.1016/s0039-128x(03)00082-5
- Bruno, R.D., Njar, V.C. (2007) Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg Med. Chem.*, **15**(15), 5047–5060. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.05.046
- Baston, E., Leroux, F.R. (2007) Inhibitors of steroidal cytochrome P450 enzymes as targets for drug development. *Recent. Pat. Anticancer. Drug Discov.*, **2**(1), 31–58. DOI: 10.2174/157489207779561453
- Potter, G.A., Barrie, S.E., Jarman, M., Rowlands, M.G. (1995) Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): Potential agents for the treatment of prostatic cancer. *J. Med. Chem.*, **38**(13), 2463–2471. DOI: 10.1021/jm00013a022
- Handratta, V.D., Vasaitis, T.S., Njar, V.C., Gediya, L.K., Kataria, R., Chopra, P., Newman, D. Jr., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y., Brodie, A.M. (2005) 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. *J. Med. Chem.*, **48**(8), 2972–2984. DOI: 10.1021/jm040202w

9. Njar, V.C., Brodie, A.M. (2015) Discovery and development of Galeterone (TOK-001 or VN/124-1) for the treatment of all stages of prostate cancer. *J. Med. Chem.*, **58**(5), 2077–2087. DOI: 10.1021/jm501239f
10. 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. (2002) Inhibition of CYP 17, a new strategy for the treatment of prostate cancer. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **335**(4), 119–128. DOI: 10.1002/1521-4184(200204)335:4<119::AID-ARDP119>3.0.CO;2-#
11. Salvador, J.A., Pinto, R.M., Silvestre, S.M. (2013) Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **137**, 199–222. DOI: 10.1016/j.jsmb.2013.04.006
12. Salvador, J.A.R., Moreira, V.M., Silvestre, S.M. (2013) Steroidal CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment: From Concept to Clinic. Chapter 12 In: *Advances in Prostate Cancer* (Hamilton, G., ed.); InTech, 704 p. DOI: 10.5772/52290
13. Bird, I.M., Abbott, D.H. (2016) The hunt for a selective 17,20 lyase inhibitor; learning lessons from nature. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **163**, 136–146. DOI: 10.1016/j.jsmb.2016.04.021
14. Stulov, S.V., Misharin, A.Y. (2013) Synthesis of steroids with nitrogen-containing substituents in ring D. *Chem. Heterocycl. Comp.*, **48**, 1431–1472. DOI: 10.1007/s10593-013-1158-8
15. Singh, R., Panda, G. (2013) An overview of synthetic approaches for heterocyclic steroids, *Tetrahedron*, **69**(14), 2853–2884. DOI: 10.1016/j.tet.2013.02.018
16. Owen, C.P. (2009) 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (p450(17 α)) inhibitors in the treatment of prostate cancer: A review. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **9**(6), 613–626. DOI: 10.2174/187152009788680046
17. Vasaitis, T.S., Bruno, R.D., Njar, V.C. (2011) CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **125**(1–2), 23–31. DOI: 10.1016/j.jsmb.2010.11.005
18. Latysheva, A.S., Misharin, A.Yu. (2018) Steroidal inhibitors of CYP17A1 — the template for novel anti-cancer agents development. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(2), e00020. DOI: 10.18097/BMCRM00020
19. Latysheva, A.S., Zolotsev, V.A., Pokrovsky, V.S., Khan, I.I., Misharin, A.Y. (2021) Novel nitrogen containing steroid derivatives for prostate cancer treatment. *Curr. Med. Chem.*, **28**(40), 8416–8432. DOI: 10.2174/0929867328666210208113919
20. Huo, H., Li, G., Shi, B., Li, J. (2022) Recent advances on synthesis and biological activities of C-17 aza-heterocycle derived steroids. *Bioorg. Med. Chem.*, **69**, 116882. DOI: 10.1016/j.bmc.2022.116882
21. Kostin, V.A., Zolotsev, 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. (2016) Oxazolonyl 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*, **115**, 114–122. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.06.002
22. Zolotsev, V.A., Kostin, V.A., Novikov, R.A., Tkachev, Ya.V., Zavalova, M.G., Taratynova, M.O., Latysheva, A.S., Zazulina, O.V., Timofeev, V.P., Misharin, A.Yu. (2018) Synthesis of nitrogen-containing derivatives of 17(20)-pregnenic, 17 β -hydroxypregnanic, and 17 α -hydroxypregnanic acids as new potential antiandrogens. *Russ. Chem. Bull.*, **67**, 667–681. DOI: 10.1007/s11172-018-2121-8
23. Kostin, V.A., Latysheva, A.S., Zolotsev, V.A., Tkachev, Ya.V., Timofeev, V.P., Kuzikov, A.V., Shumyantseva, V.V., Morozevich, G.E., Misharin, A.Yu. (2018) Oxazoline derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene – inhibitors of CYP17A1 activity and proliferation of prostate carcinoma cells. *Russ. Chem. Bull.*, **67**, 682–687. DOI: 10.1007/s11172-018-2122-7
24. Zolotsev, 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. (2018) Comparison of [17(20)E]-21-norpregnene oxazolonyl and benzoxazolonyl derivatives as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells growth. *Steroids*, **129**, 24–34. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.11.009
25. Staunton, J., Eisenbraun, E.J. (1962) 3 β -Acetoxyetienic acid [3 β -Acetoxy-5-androstene-17 β -carboxylic acid]. *Org. Synth.*, **42**, 4. DOI: 10.15227/orgsyn.042.0004
26. Trott, O., Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334
27. Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V.J., Adasme, M.F., Schroeder, M. (2015) PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.*, **43**(1), 443–447. DOI: 10.1093/nar/gkv315
28. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**(1–2), 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
29. 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. (2016) Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by modulation of oncogenic and apoptotic pathways. *Int. J. Oncol.*, **48**(2), 793–800. DOI: 10.3892/ijo.2015.3274
30. Bruno, R.D., Gover, T.D., Burger, A.M., Brodie, A.M., Njar, V.C. (2008) 17 α -Hydroxylase/17,20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Mol. Cancer Ther.*, **7**(9), 2828–2836. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0336

Поступила: 12. 07. 2024.
После доработки 04. 09. 2024.
Принята к публикации: 05. 09. 2024.

NEW NITROGEN-CONTAINING ANDROSTANE DERIVATIVES SUPPRESSING PROSTATE CARCINOMA CELLS PROLIFERATION

A.S. Latysheva^{1}, A.Yu. Misharin¹, A.V. Veselovsky¹, G.E. Morozevich¹, R.A. Novikov², V.A. Zolottsev¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: aidanlinch@gmail.com
²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
32 Vavilov str., Moscow, 119991 Russia

Derivatives of 3 β -hydroxyandrost-5,16-diene and 3 β -hydroxyandrost-5-ene containing 2-oxazoline, 2-benzoxazole, and 2-benzimidazole substituents at C-17 position were synthesized. Docking of the synthesized compounds into the active site of human CYP17A1 predicted their high affinity for the enzyme. Of the 6 new compounds, 5 suppressed the proliferation of prostate carcinoma cells LNCaP and PC-3, and the activity of the oxazoline and benzimidazole derivatives of androsta-5,16-diene significantly exceeded the activity of the known anticancer agents abiraterone and galeterone.

Key words: nitrogen-containing steroid derivatives; prostate carcinoma cells; CYP17A1 inhibitors; synthesis of steroid derivatives; antiproliferative activity; molecular docking

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (no. 122030100170-5).

Received: 12.07.2024; revised: 04.09.2024; accepted: 05.09.2024.