

На правах рукописи

Щербаков Кирилл Андреевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАНДРОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ СТЕРОИДНЫХ
ГИБРИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

1.5.8. – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Веселовский Александр Владимирович

Официальные оппоненты: **Васильев Павел Михайлович,**
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский
университет» Минздрава РФ, НЦИЛС, заведующий
лабораторией

Чугунов Антон Олегович,
кандидат физико-математических наук, Институт
биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии
наук, старший научный сотрудник

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр физико-
химической медицины имени академика Ю.М.
Лопухина Федерального медико-биологического
агентства».

Защита состоится «5» октября 2023 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета
24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.
Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121, гор. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской
химии имени В.Н. Ореховича» и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Актуальность темы и степень её разработки

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространённых онкологических заболеваний среди мужчин старшего возраста в развитых странах. Рак простаты является гормон-зависимым, т.е. рост и пролиферация злокачественных клеток поддерживаются мужскими половыми гормонами — тестостероном (Т) и дигидротестостероном (ДНТ). Действие Т и ДНТ осуществляется через особый тип транскрипционного фактора - андрогеновый рецептор (AR). Связывая AR, мужские половые гормоны активируют рецептор, после чего AR транспортируется в ядро, где инициирует транскрипцию целевых генов. В норме эти гены необходимы для развития и поддержания мужского фенотипа, но при развитии РПЖ они же способствуют росту и пролиферации злокачественных клеток [Hankey et al., 1999]. В современной фармакотерапии РПЖ используются два основных подхода. Первый состоит в применении антагонистов AR (бикалутамид, флутамид, энзалутамид). Антагонисты, взаимодействуя с AR, препятствуют его связыванию с активаторами, что блокирует транспорт рецептора внутрь ядра. Это, в свою очередь, предотвращает транскрипцию целевых генов и приводит к подавлению роста раковых клеток [Vasaitis et al., 2011]. Второй подход подразумевает снижение уровня тестостерона и дигидротестостерона путём ингибирования активности фермента цитохром P450 17 α -гидроксилаза, 17,20-лиаза (CYP17A1) [Vasaitis et al., 2011]. CYP17A1 катализирует 17 α -гидроксилирование прогестерона и прегненолона в соответствующие 17 α -гидроксилированные метаболиты, которые затем метаболизируются до дегидроэпиандростерона и андростерона, соответственно. Последние являются предшественниками для синтеза тестостерона и дигидротестостерона в организме.

Однако использование современных лекарственных препаратов сталкивается с рядом трудностей. При использовании антагонистов AR со временем у пациентов может развиться резистентность к используемым препаратам; в результате мутаций в AR антагонисты могут начать действовать как агонисты рецептора. Так, бикалутамид вызывает мутацию W741L [Hara et al., 2003], флутамид — T877A [Tan et al., 2015], а энзалутамид — F786L [Balbas et al., 2013]. В связи с этим особый интерес представляет разработка препаратов, резистентных к указанным мутациям. В лаборатории химии стероидов Института Биоорганической химии республики Беларусь были синтезированы два новых стероидных гибрида 3,17-дигидроксиандрост-17-ил)метил)изоксазол-5(4H)-он (**171**) и 17-((изоксазол-3-ил)метил)-андрост-5-ен-3,17-диол (**172**), потенциальные антагонисты AR. При этом соединение **171** способно существовать, как в кето-, так и в енольной форме. Активность данных соединений была проверена в лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ на клетках линии рака простаты LNCaP, где они показали способность подавлять их рост. Таким образом, актуальной задачей представляется изучение механизма воздействия этих соединений на андрогеновый рецептор человека.

В случае же применения ингибиторов CYP17A1 возможны серьезные побочные эффекты вследствие недостаточной их селективности. Например, популярный препарат абиратерон способен взаимодействовать со стероид 21-гидроксилазой (CYP21A2) и с 11 β -

гидроксилазой, что приводит к значительным нарушениям в синтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов и влечет за собой широкий спектр побочных эффектов таких как аддисонический криз, отеки, гипокалиемия и гипертонезия [Malikova et al., 2017]. На стадии клинических испытаний находится перспективное соединение галетерон. Уже после внедрения абиратерона в клиническую практику было показано, что он и галетерон могут быть окислены в организме 3β -гидроксистероиддегидрогеназой (3β -HSD) до соответствующих 3-кето- Δ 4-метаболитов (D4A и D4G) [Li et al., 2015; Alyamani et al., 2017]. Образовавшиеся метаболиты оказались более эффективными ингибиторами CYP17. Поскольку абиратерон, галетерон, D4A и D4G несут в своей основе стероидный скелет, можно предполагать, что помимо основной мишени, они также будут взаимодействовать и с другими изоферментами P450, вовлеченными в стероидогенез. В связи с этим представляется необходимым детальное изучение абиратерона, галетерона, D4A и D4G с ферментами стероидогенеза с целью выявления их потенциальных фармакологических эффектов.

Поскольку применение антагонистов и ингибиторов AR и CYP17 приводит к появлению целого ряда серьезных побочных эффектов особый интерес могут представлять новые, ранее не исследованные мишени. Одной из таких мишеней может стать шаперон HSP90. Находясь в цитоплазме, AR образует с ним комплекс. При активации AR происходит диссоциация HSP90, после чего рецептор транспортируется в ядро. Однако, для диссоциации HSP90 требуется его фосфорилирование по остатку Thr-90 [Dagar et al., 2019]. В связи с этим поиск ингибиторов фосфорилирования HSP90 может стать новым перспективным направлением фармакотерапии РПЖ.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является исследование механизмов взаимодействия стероидных соединений с молекулярными мишенями, задействованными при лечении рака предстательной железы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Исследовать механизмы взаимодействия новых стероидных соединений **171** и **172** с лиганд-связывающим доменом AR дикого типа и его известных мутантов, вызывающих устойчивость к антагонистам методами докинга и молекулярной динамики.
- 2) Установить молекулярные механизмы взаимодействия абиратерона, галетерона и их 3-кето- Δ 4-производных со стероид-метаболизирующими цитохромами P450 методом молекулярного докинга.
- 3) Провести поиск низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с потенциальным сайтом связывания у шаперона HSP90, расположенного около остатка Thr-90.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Соискатель лично принимал участие в дизайне вычислительных экспериментов. Автором проведены все компьютерные эксперименты и последующая обработка полученных данных, подготовка материалов для публикаций.

Научная новизна работы

Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики было показано, что новые стероидные соединения **171** и **172** являются антагонистами как дикого типа андрогенового рецептора, так и его мутантных форм. Выдвинуто предположение, что в AR антагонисты не вызывают значительного смещения спирали H12, но нарушают геометрию сайта связывания с коактиваторами.

Методами молекулярного докинга было исследовано взаимодействие абиратерона, галетерона и их 3-кето- Δ 4-метаболитов с ключевыми ферментами стероидогенеза. Было показано, что модели цитохромов P450 с лигандами, построенные методом докинга, позволяют предсказывать тип ингибирования этих лигандов. Данные модели позволяют объяснить сигмоидальный характер кривых зависимости связывания от концентрации лигандов. На основе полученных молекулярных моделей высказано предположение о том, какие препараты могут являться более предпочтительными для лечения рака простаты.

Был предложен подход по поиску лигандов для новых сайтов связывания. Он заключается в последовательном использовании методов *de novo* конструирования лигандов, фармакофорного поиска, молекулярного докинга и молекулярной динамики. Подход был апробирован на примере поиска лигандов шаперона HSP90, связывающихся в области участка фосфорилирования этого белка. Были предложены два соединения, способных связываться в окрестностях остатка Thr-90 HSP90 и препятствовать его фосфорилированию.

Теоретическая и практическая значимость

В работе установлен молекулярный механизм действия соединений **171** и **172** на андрогеновый рецептор дикого типа и его мутантные формы. Построенные модели комплексов стероид-метаболизирующих цитохромов P450 с абиратероном, галетероном и их метаболитами, D4A и D4G, позволили объяснить ряд наблюдаемых при связывании в экспериментах спектральных изменений, а также наблюдавшийся в ряде случаев сигмоидальный характер связывания соединений. Был предложен и апробирован подход по поиску лигандов в ранее неописанные сайты связывания, позволяющий отказаться от докинга больших баз данных.

Полученные в работе данные могут послужить основой для дальнейшей оптимизации стероидных антагонистов андрогенового рецептора с целью повышения их специфичности и аффинности как к рецептору дикого типа, так и к его мутантным формам.

Выявление механизмов взаимодействия абиратерона, галетерона, D4A и D4G со стероид-метаболизирующими цитохромами P450 позволяет спрогнозировать изменения в метаболизме стероидных гормонов и предложить направления для разработки более эффективных препаратов для лечения рака простаты.

Предложены низкомолекулярные соединения, способные препятствовать фосфорилированию шаперона HSP90 по остатку Thr-90, которые могут стать препаратами с принципиально новым механизмом действия для лечения рака простаты.

Положения, выносимые на защиту

1. Соединения **171** и **172** способны выступать в качестве антагонистов как андрогенового рецептора дикого типа, так и его мутантных форм W741L и T877A. При этом соединение **172** будет являться более выраженным антагонистом. Механизм действия этих соединений отличается от такового для известного антагониста бикалутамида.

2. Построенные методом молекулярного докинга модели комплексов стероид-метаболизирующих цитохромов P450 с абиратероном, галетроном и их метаболитами, D4A и D4G могут достоверно предсказать механизм связывания лигандов. На основе построенных моделей можно предсказывать тип ингибирования (I или II типа) цитохромов P450, сигмоидальные зависимости на кривых связывания лигандов с ферментами.

3. Предложен подход по поиску лигандов для ранее неизвестных сайтов связывания в белках. Подход апробирован при поиске ингибиторов фосфорилирования остатка Thr-90 в шапероне HSP90.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы обеспечивается применением современных методов и программ по молекулярному моделированию для получения, обработки и анализа данных. Способность использованного программного обеспечения давать достоверные результаты подтверждается многочисленными публикациями других авторов, а также соответствием полученных нами моделей с экспериментальными данными.

Основные результаты работы были обсуждены на конференциях: 24-я Международная Пуцнинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (5-7 октября 2020, Пуцдино, Россия); 27-я Международная Пуцнинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (10-13 апреля 2023, Пуцдино, Россия).

Публикации

По материалам диссертации были опубликованы 9 работ. В их числе 7 научных статей из числа рекомендованных ВАК РФ изданий. Две работы представлены в сборниках материалов научных конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, включает 57 рисунков и 9 таблиц. Состоит из введения, трёх глав, заключения и списка литературы, содержащего 158 ссылок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структуры белков.

Пространственные структуры белков и их комплексов были получены из банка PDB [Berman et al., 2000]. В работе использовали структуры: WT-AR в комплексе тестостероном (PDB ID: 2am9), W741L-AR в комплексе с бикалутамидом (PDB ID: 1z95), CYP17A1 с абиратероном (PDB ID: 3ruk) и галетероном (PDB ID: 3swz), CYP51A1 с кетоконазолом (PDB ID: 3ld6), CYP11A1 в комплексе с холестерином (PDB ID: 3n9y), комплекс CYP21A2 с прогестероном (PDB ID: 4y8w), комплекс CYP11B1 с фазрозолом (PDB ID: 6m7x), комплекс CYP11B2 с деоксикортикостероном (PDB ID: 4dvq), комплексы CYP19A1 со стероидным ингибитором HDDG046 (PDB ID: 4gl7) и с субстратом (PDB ID: 3s79), комплекс CYP3A4 с кетоконазолом (2v0m).

В структуры WT-AR были внесены точечные мутации W741L и T877A, структура 1z95 была конвертирована из мутанта W741L в дикий тип. Низкомолекулярные соединения были

построены в пакете SYBYL 8.1. Все полученные структуры белков были оптимизированы методом минимизации энергии в SYBYL 8.1. Частичные атомарные заряды рассчитаны по схеме Гастайгера-Хюккеля.

Структуры низкомолекулярных соединений

Структуры соединения **171**, как в кето- (**171К**), так и в енольной (**171Е**) формах, соединения **172**, а также абиратерона, галетерона, и их 3-кето- Δ^4 -производных (Рис. 1) были построены в молекулярном редакторе пакета SYBYL 8.1. Структуры были подвергнуты дальнейшей минимизации в SYBYL 8.1 при помощи метода градиентного спуска с применением зарядов Гастайгера-Хюккеля.

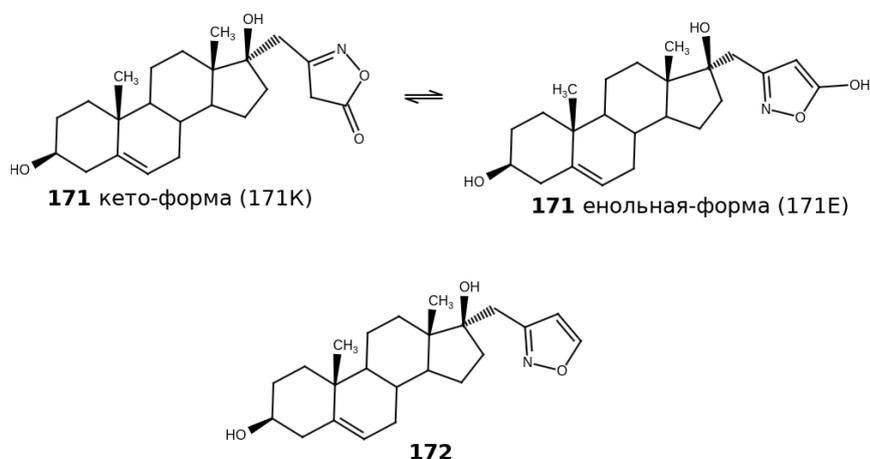


Рисунок 1. Соединения **171** и **172**.

Вычислительные методы.

Докинг исследуемых соединений осуществляли в программе Vina Autodock [Trott, 2010] с применением метода полностью гибкого докинга. В качестве подвижных выбрали остатки, расположенные в радиусе 5 Å от положения известного лиганда. Выбор наиболее вероятной позы лиганда осуществляли на основе величин оценочных функций и сопоставления с известными лигандами из комплексов белков. Взаимодействия лигандов в полученных позах с мишенями анализировались при помощи веб-сервиса PLIP [Adasme et al., 2021]

Молекулярная динамика производили в программном пакете GROMACS-2020 [Berendsen et al., 1995]. Для атомов белка было использовано силовое поле AMBER99SB-ILDN [Lindorff-Larsen et al., 2010], атомы лигандов были параметризованы при помощи силового поля GAFF [Wang et al., 2004]. Использовали растворитель, заданный в явном виде (модель воды TIP3P) с добавлением 0,150 М ионов NaCl для нейтрализации заряда системы.

Расчёты молекулярной динамики проводили на траектории в 300-1000 нс с шагом в 2 фс, при температуре в 310К и давлении в 1 бар. Для поддержания постоянства температуры и давления использовались модифицированный термостат Берендсена [Berendsen et al., 1980] и баростат Парринело-Ранмана [Parrinello et al., 1984]. Расчёты электростатических

взаимодействий производились с применением метода particle mesh Ewald (PME). Отсечка для расчётов несвязанных короткодействующих взаимодействий была установлена на 10 Å.

Анализ траекторий молекулярной динамики проводили с использованием функций GROMACS-2020 и VMD 1.9.1 [Humphrey et al., 1996]. Анализ взаимодействий лигандов и белка в ходе МД производился при помощи python-библиотеки ProLIF [Bouysset et al., 2021].

Расчет энергии взаимодействия в комплексах делали методом MM-GBSA [Kollman et al., 2000] Для вычислений использовались кадры, взятые из финальных этапов МД.

Метод главных компонент (PCA) использовали для анализа коллективных конформационных изменений белков. Было исследовано распределение конформаций спирали H12 AR на протяжении всей длины траектории. В работе использовали первые два собственных вектора PC1 и PC2, рассчитанные в программном пакете GROMACS-2020.

Генерация лигандов de novo проводилась с использованием программа AutoGrow4 [Spiegel et al., 2020]. Для оценки сродства к белку-мишени как молекулярных фрагментов, так и соединений, полученных в ходе генерации молекул использовался молекулярный докинг в программе QVina с оценочной функцией Vina AutoDock.

Вычисления проводились на сервере с характеристиками: Intel Core i9-9960X, 64 GB DDR4 RAM, Nvidia RTX 2080 Super.

Экспериментальные методы

Синтез 3-кето-Δ4-производного галетерона D4G был произведён в лаборатории феромонов АО «Щёлково Агрохим» (зав. лабораторией Стулов С.В.). Синтез соединений **171** и **172** был произведён в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии республики Беларусь (зав. лабораторией Хрипач В. А.).

Определение активности цитохромов P450 и взаимодействия с лигандами осуществляли методом абсорбционной спектроскопии при помощи прибора Cary 100 Scan UV–Vis (“Agilent”, Нидерланды). Эксперименты проводили к.б.н. Кузиков А.В. и к.б.н. Масамрехом Р. А. в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ РАН (зав. лабораторией д.б.н. Шумянцева В.В.). Наблюдаемые в ходе экспериментов спектральные изменения представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Спектральные изменения вызываемые абиратероном, галетероном, D4A и D4G при взаимодействии с со стероид-метабилизирующими CYP450.

Соединение	CYP					
	51A1	11A1	21A2	11B1/11B2	19A1	3A4
ABI	I	II	II	н.д.	Отс.	II
D4A	I	Отс.	II	н.д.	II	II
GAL	I	Отс.	I	н.д.	Отс.	II
D4G	I	Отс.	I	н.д.	Отс.	Отс.

(Пояснения: **I** — спектральные изменения типа I ; **II** — спектральные изменения типа II; **отс.** - спектральные изменения отсутствуют; **н.д.** - нет данных.)

Определение токсичности соединений на клеточных культурах линий рака простаты LnCap и PC-3, а также на клетках рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 методом МТТ-

теста при инкубации в 96 часов. Результаты представлены в Таблице 2. Эксперименты были выполнены к.б.н. Мехтиевым А.Р. в лаб. синтеза физиологически активных соединений ИБМХ РАН (зав. лабораторией к.х.н. Золотцев В.А.). Результаты теста представлены в Табл. 2.

Таблица 2. Результаты МТТ теста для соединений **171** и **172** (% от контроля).

Концентрация, мкМ	Клеточная линия							
	LnCap		PC3		MCF-7		MDA-MB-231	
	171	172	171	172	171	172	171	172
40	45 ± 6	33 ± 1	88±1	70±2	69±2	63±3	98±6	86±4
20	67 ± 4	58 ± 2	86± 3	81±7	68±0	64±3	90±8	118±9
10	77±10	73 ± 7	85±5	79±5	81± 4	60±3	77±2	111±4
1	71 ± 8	83 ± 2	95±7	101±1	77±1	93±11	109±3	95±3
0,1	82 ± 4	88 ± 1	109± 4	93±4	87±4	87±6	109±1	102±4

Видно, что соединения **171** и **172** проявляют наиболее заметную активность на клетках линии рака простаты LnCap, которые содержат андрогеновый рецептор. На андроген-независимых клетках линии PC3, а также на клетках рака груди (MCF-7 и MDA-MB-231) эти соединения демонстрируют значительно меньшую активность. Это дает основания полагать, что мишенью соединений **171** и **172** является андрогеновый рецептор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие соединений **171E**, **171K** и **172** с андрогеновым рецептором

В работе было исследовано взаимодействие соединения **171**, как в кето-, так и в енольной форме, и соединения **172** (Рис. 1) с нативным лиганд-связывающим доменом андрогенового рецептора и его мутантами W741L (W741L-AR) и T877A (T877A-AR). Далее по ходу текста кето- и енольная формы соединения **171** рассматриваются как самостоятельные соединения с обозначением **171K** и **171E** соответственно.

Комплексы соединений **171E**, **171K** и **172**, как с WT-AR, так и с мутантами W741L-AR и T877A-AR были построены методом молекулярного докинга. Для докинга была использована структура 2am9, спираль H12 в которой находилась в агонистической конформации. Мутации были внесены вручную в рецептор дикого типа. Докинг соединений **171E**, **171K** и **172** осуществлялся, как в WT-AR, так и в мутанты W741L и T877A. Полученные комплексы послужили стартовыми структурами для расчётов молекулярной динамики длиной в 1000 нс.

Все комплексы были стабильны, и после 800 нс симуляции для них наблюдались лишь незначительные флуктуации RMSD. При этом на финальных этапах динамики значения RMSD лежали в пределах 1.5 Å до 3 Å в зависимости от комплекса.

Для оценки стабильности положения лигандов в ходе МД были рассчитаны значения их RMSD во всех 11 комплексах (Рис. 2). Наибольшей стабильностью обладает тестостерон в комплексе с рецептором дикого типа (TES-WT). В случае с бикалутамидом и с исследуемыми

соединениями наблюдался резкий скачок RMSD до относительно высоких значений. Это может быть объяснено тем, что докинг не смог предсказать точных поз связывания, в связи с чем лиганды смещаются с изначальных позиций. При этом в большинстве комплексов графики выходят на плато уже в первой половине симуляции.

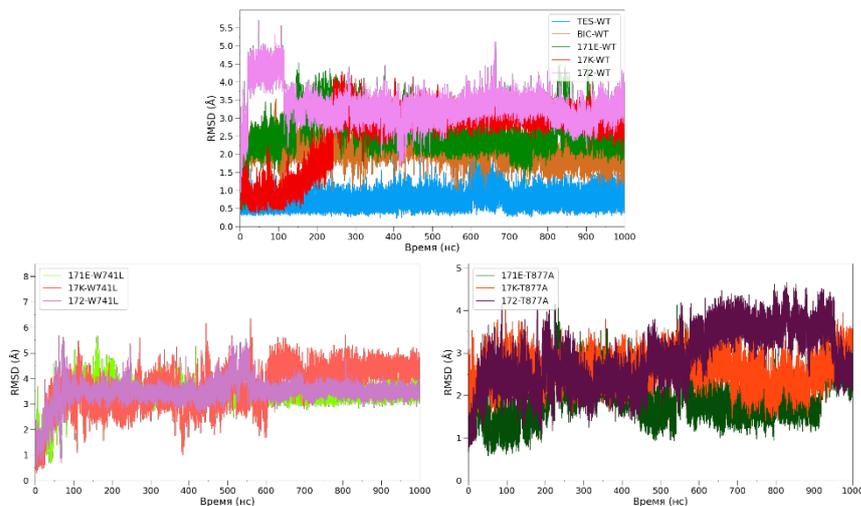


Рисунок 2. Значения RMSD лигандов в моделируемых комплексах.

Поскольку положение спирали H12 является ключевой детерминантой, определяющей агонистическую, либо антагонистическую конформацию AR, для оценки степени её подвижности были рассчитаны значения RMSF C_{α} -атомов её остатков. Так наименьшим флуктуациям спираль H12 подвержена в комплексе с тестостероном. Наиболее же значительные флуктуации H12 в WT-рецепторе вызывает бикалутамид. Из исследуемых соединений наименее выраженную подвижность H12 вызывало соединение **171E** как в WT, так и в мутантах W741L и T877A. Анализ значений RMSF спирали H12 показывает, что все исследуемые соединений способны вызывать заметные её флуктуации ($\geq 1\text{\AA}$), при этом наибольшую подвижность спирали вызывали соединения **171K** и **172**, как в рецепторе дикого типа, так и в мутантах W741L и T877A.

Для оценки того как хорошо сохраняется спиральная конформация H12 было определено количество остатков, входящих в эту спираль, на протяжении последних 200 нс молекулярной динамики. На рисунке 3 представлено среднее количество остатков, находящихся в спиральной конформации. Длина спирали H12 в кристаллической структуре составляет 16 остатков. В процессе молекулярной динамики H12 подвергается частичной деспирализации даже в комплексе тестостероном. Соединение **172** оказывает наиболее выраженное деспирализующее воздействие на H12 в мутанте T877A (7,4 ост.). Таким образом, наибольшее расплетание спирали H12 в диком рецепторе наблюдается с соединением **172**, в мутанте T877A с соединением **171**, а в мутанте W741L оба соединения оказывают схожее деспирализующее воздействие.

Для более детальной оценки поведения спирали H12 методом главных компонент был проведён анализ движений C_{α} -атомов для остатков 893-908. Основные движения спирали были спроецированы на два первых собственных вектора PC1 и PC2. В случае комплекса WT-AR с тестостероном H12 сохраняет исходную агонистическую конформацию. В случае с системой BIC-WT для H12 наблюдаются интенсивные колебательные движения спирали. По всей

видимости под воздействием бикалутамида, спираль H12 обретает высокую подвижность, что и может объяснять его антагонистическое воздействие.

В комплексах с соединением **171** наблюдали повышенную подвижность H12 и изменения её исходной конформации как с диким типом рецептора, так и с его мутантными формами. Соединение **172** так же вызывало увеличение подвижности спирали и её сдвиг в антагонистическую конформацию. Причем эти изменения были более выражены, чем для соединения **171**.

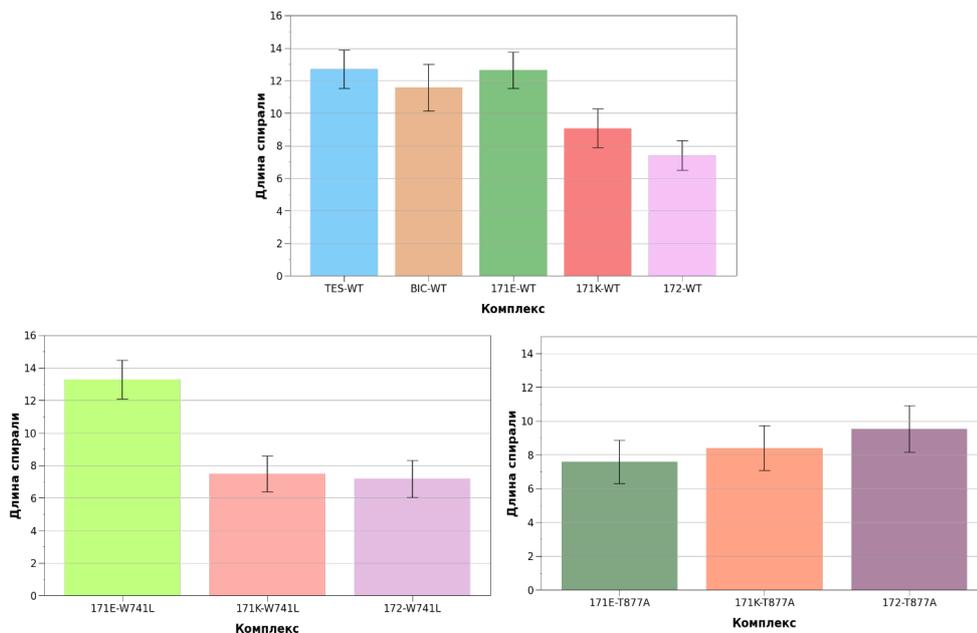


Рисунок 4. Средняя длина спирали H12 в различных моделируемых комплексах.

Соединения **171E**, **171K**, **172**, бикалутаמיד и тестостерон взаимодействуют с WT-рецептором преимущественно за счёт гидрофобных контактов. Стоит отметить, что Н-связи с R752 и Q711, характерные для кристаллических структур утрачиваются, а наблюдаемые взаимодействия с Q711 носят гидрофобный характер. Тем не менее Н-связи гидроксила при D-кольце стероидных лигандов и соответствующей ОН-группы бикалутамида сохраняются, однако в случае с TES и BIC Н-связь формируется боковой цепью N705, а в случае **171E**, **171K** и **172** с гидроксилом T877. В-кольцо бикалутамида напрямую воздействует на H12, вступая в гидрофобные взаимодействия остатками M895, I898, I899 и V903, принадлежащими спирали H12, чем и вызывает её смещение. Соединения **171** и **172** в рецепторе не взаимодействуют напрямую со спиралью H12, вместо этого, они вступают в гидрофобные взаимодействия с петлей L11_12.

Таким образом, можно заключить, что соединения **171** и **172** связываются с AR схожим образом. Вероятно, их антагонистическое воздействие связано не с прямым воздействием на H12, а обусловлено интенсивными гидрофобными контактами с петлей L11_12.

Для расчёта энергий связывания соединений **171E**, **171K** и **172** как с WT-AR, так и с его мутантными формами, а также TES и BIC использовали метод ММ-GBSA. Для расчётов энтальпийного вклада использовались 2000 кадров из последних 200 нс МД, а для расчётов энтропийного — 100 кадров того же временного промежутка. Результаты вычислений

представлены в таблице 3. В большинстве комплексов сродство исследуемых соединений (**171E**, **171K**, **172**) к AR выше, чем сродство TES и BIC к WT-AR. Однако исследуемые соединения обладают разной аффинностью по отношению к разным формам AR. Так в случае с AR дикого типа наиболее высокая энергия связывания наблюдается у соединения **171**, а энергия связывания соединения **172** заметно более низка и близка к аффинностям TES и BIC. Для мутанта W741L наиболее аффинным также оказывается соединение **171**, а для мутанта T877A оба соединения обладают схожими энергиями связывания.

На основе полученных в ходе молекулярной динамики данных можно предположить, что соединение **171** будет являться слабым антагонистом по отношению к рецептору дикого типа. Соединение **172** же, вероятно, будет являться более выраженным антагонистом AR, также резистентным к его мутантным формам, поскольку оно вносит более значительные возмущения в структуру и конформацию спирали H12, как в рецепторе дикого типа, так и в мутантах W741L и T877A.

Таблица 3. Рассчитанные свободные энергии связывания (ΔG_{bind}) для каждого из комплексов, а также вклады в общую энергию отдельных членов. Все значения приведены в ккал/моль.

Комплекс	ΔE_{ele}	ΔE_{vdW}	ΔE_{MM}	ΔG_p	ΔG_{np}	ΔG_{solv}	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG_{bind}
WT-TES	-20,3	-46,2	-66,5	22,9	-5,7	17,2	-49,3	21,5	-27,8
BIC-WT	-34,2	-56,0	-90,2	46,6	-8,0	38,6	-51,6	25,7	-25,9
WT-171E	-13,3	-59,5	-72,8	22,1	-7,3	14,8	-58,0	22,3	-35,7
WT-171K	-12,8	-59,1	-71,9	20,4	-7,1	13,3	-58,6	25,7	-32,9
WT-172	-11,3	-54,3	-65,6	20,0	-6,8	13,2	-52,4	23,8	-28,6
171E-W741L	-23,0	-57,4	-80,4	26,0	-7,0	19,0	-61,4	23,4	-38,0
171K-W741L	-11,1	-54,0	-65,1	22,0	-6,6	15,4	-49,7	21,8	-27,9
172-W741L	-12,4	-57,6	-70,0	18,1	-7,0	11,0	-58,9	23,2	-35,7
171E-T877A	-23,0	-56,5	-79,5	30,9	-7,1	23,8	-55,7	22,8	-32,9
171K-T877A	-13,5	-59,7	-73,2	26,2	-7,1	19,1	-54,1	22,6	-31,5
172-T877A	-19,7	-55,6	-75,3	8,1	-6,9	21,2	-54,1	21,2	-32,9

Исследование взаимодействия абиратерона, галетерона и их 3-кето- Δ 4-производных со стероид-метаболизирующими цитохромами P450.

Молекулярное моделирование взаимодействия D4A и D4G с CYP17A1

Молекулярный докинг метаболитов абиратерона и галетерона, D4A и D4G, соответственно, в CYP17A1 позволил установить, что оба соединения могут разместиться в активном центре фермента, при этом атом азота при C17-заместителях оказывается ориентированным в сторону железа гема и расположенным на расстоянии 2,4 Å от иона железа, что позволяет говорить об образовании между этими атомами координационной связи (Рис. 9).

Таким образом, по данным молекулярного докинга можно заключить, что указанные метаболиты абиратерона и галетерона будут являться ингибиторами типа II для CYP17A1.

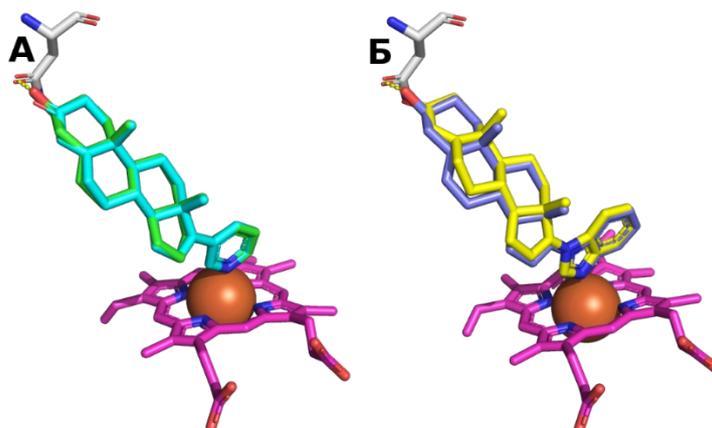


Рисунок 9. А - Положение в активном центре CYP17A1 абиратерона (голубой) и D4A (зелёный). Б - Положение в активном центре галетерона (жёлтый) и D4G (синий). Гем окрашен в пурпурный, остаток N202 в белый.

Исследование взаимодействия абиратерона и D4A с CYP51A1

CYP51A1 является ключевым ферментом синтеза холестерина, предшественника всех стероидных гормонов. Поэтому было исследовано возможное влияние абиратерона и D4A на этот фермент.

Ранее было показано, что абиратерон и D4A вызывают спектральные изменения типа I в CYP51A1 и могут быть окислены в электрохимической системе, содержащей CYP51A1 [Masamrekh et al., 2021]. Причем зависимость дифференциальных спектров от концентраций абиратерона и D4A была сигмоидальной. Для выявления причины сигмоидального характера кривых был проведён молекулярный докинг. Одной из возможных причин такой зависимости является одновременное связывания двух молекул ингибиторов в активном центре.

Молекулярный докинг показал, что CYP51A1 способен одновременно связывать по две молекулы как абиратерона, так и D4A, при этом обе молекулы располагались в одинаковых конформациях (Рис. 10). Первая молекула абиратерона или D4A расположилась в активном центре таким образом, что метильная группа атома C19 оказалась ближайшей к железу гема. Вторая молекула абиратерона или D4A расположилась во входе в активный центр фермента. Таким образом, сигмоидальное поведение зависимости спектральных изменений от концентрации лигандов, вероятнее всего, обусловлено связыванием двух молекул в активном центре CYP51A1.

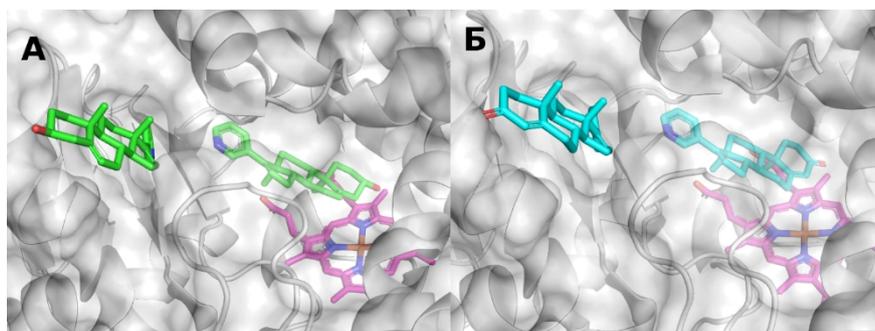


Рисунок 10.Связывание молекул абиратерона (А) и D4А (Б) с СУР51А1. Белок показан серым, гем изображён пурпурным.

Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона и D4А с СУР11А1

Цитохром Р450 11А1 является первым ферментом каскада по синтезу стероидных гормонов.

В случае с СУР11А1 докинг показал, что пиридиновые кольца, как абиратерона, так и D4А расположились практически параллельно гему, под небольшим углом к его плоскости. Для обоих лигандов расстояние между пиридиновым азотом и железом гема составило 2.4 Å. Суперпозиция абиратерона и D4А показала, что стероидные фрагменты обоих лигандов расположены одинаково (Рис. 11).

Однако спектральные данные для СУР11А1 показали, что абиратерон даёт спектр типа II, что соответствует образованию координационной связи между пиридиновым азотом абиратерона и железом гема [Masamrekh et al., 2020]. В случае с D4А же спектральных изменений не наблюдалось. Таким образом, докинг не смог выявить значимых различий в связывании абиратерона и D4А с СУР11А1. Кроме того, параллельное плоскости гема положение пиридинового кольца представляется маловероятным. Можно предположить, что при связывании происходят конформационные перестройки ряда аминокислотных остатков в районе гема, что позволит этому кольцу расположиться перпендикулярно плоскости кофактора.

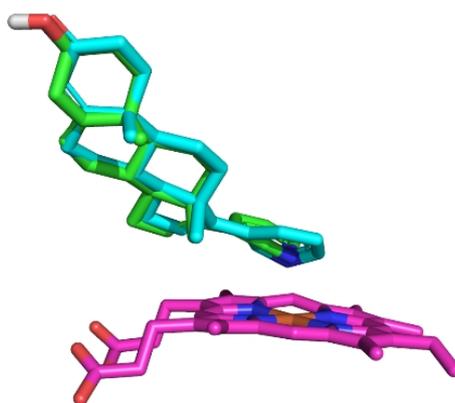


Рисунок 11. Суперпозиция абиратерона (зелёный) и D4А (голубой) в активном центре СУР11А1. Гем пурпурный.

Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона, галетерона и их производных с CYP21A2.

CYP21A2 расположен на ветке синтеза глюко- и минералокортикоидов.

Молекулярный докинг показал, что молекулы абиратерона и D4A смогли разместиться в активном центре CYP21A2, при этом азот пиридинового кольца был ориентирован в сторону железа гема. Расстояние между ними оказалось достаточным для образования координационной связи. Основной вклад в связывание вносят гидрофобные взаимодействия с неполярными остатками фермента, также для обоих лигандов удалось наблюдать водородную связь между кислородом их гидроксильной/кето-группы при C3 и ω -азотом Arg234 (Рис. 12).

Суперпозиция D4A с прогестероном взятым из кристаллической структуры показала, что оба лиганда связываются схожим образом: формируют множество гидрофобных контактов с белком и образуют водородные связи с Arg234. На основании полученных результатов было заключено, что абиратерон и D4A являются ингибиторами CYP21A2 второго типа.

Докинг галетерона и D4G показал, что оба лиганда оказались ориентированы схожим образом относительно гема CYP21A2 (Рис. 13). Бензимидазольные циклы галетерона и D4G были ориентированы в сторону гема, а ближайшим к иону железа атомом в обоих случаях оказался атом углерода в 6` позиции радикала. Функциональные группы в позиции 3 стероидного кольца А галетерона и D4G образовали водородные связи длиной 2.9 Å и 2.5 Å соответственно. Такое положение галетерона и D4G предполагает, что они должны быть ингибиторами первого типа.

Таким образом, проведенное молекулярное моделирование комплексов находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными, которые показали, что абиратерон и D4A являются ингибиторами CYP21A2 второго типа, а галетерон и D4G – первого.

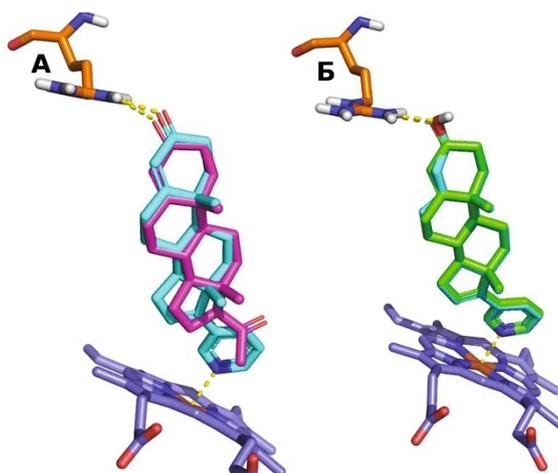


Рисунок 12. А - Суперпозиция прогестерона (пурпурный, получен из кристалла) и D4A (голубой, полчен в ходе докинга), связанные с CYP21A2. Б - Суперпозиция абиратерона (голубой) и D4A (зелёный), связанных с CYP21A2 по предсказаниям молекулярного докинга. Гем фиолетовый. Связи обозначены жёлтыми штрихами.

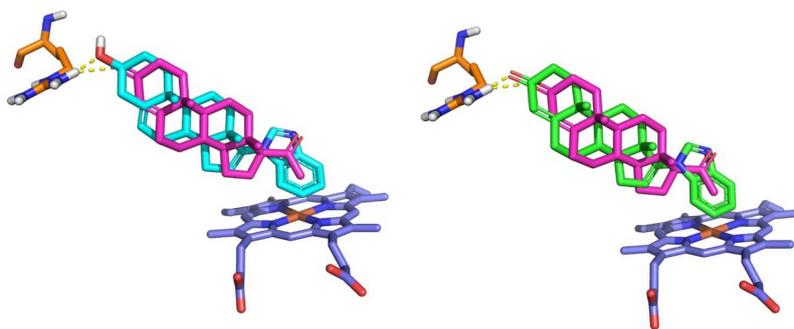


Рисунок 13. Суперпозиция галетерона (голубой) и D4G (зеленый) с прогестероном (пурпурный) в активном центре CYP21A2 (гем фиолетовый). Связи обозначены жёлтым пунктиром.

Молекулярный докинг абиратерона, галетерона и их метаболитов D4A и D4G в активные центры CYP11B1 и CYP11B2

Цитохромы P450 11B1 и 11B2 являются высокоомологичными белками. Различия в их структуре заключаются всего в нескольких аминокислотных остатках, расположенных вне активных центров ферментов. Тем не менее, в организме они отвечают за разные функции и проводят разные стереоспецифичные реакции. CYP11B1 является конечным ферментом в синтезе глюкокортикоидных гормонов, а CYP11B2 – минералокортикоидных.

Докинг абиратерона, D4A, галетерона и D4G в активный сайт CYP11B1 показал, что в активном сайте фермента смогли разместиться лишь C17-заместители указанных молекул, в то время как стероидные ядра расположились в канале, соединяющим поверхность белка с активным центром (Рис. 14). Бензимидазольные фрагменты галетерона и D4G оказались ориентированы параллельно плоскости гема, а пиридиновые кольца абиратерона и D4A – под углом в $\sim 45^\circ$. Полученные позы лигандов свидетельствуют о том, что абиратерон, D4A, галетерон и D4G, предположительно, должны являться лигандами типа II.

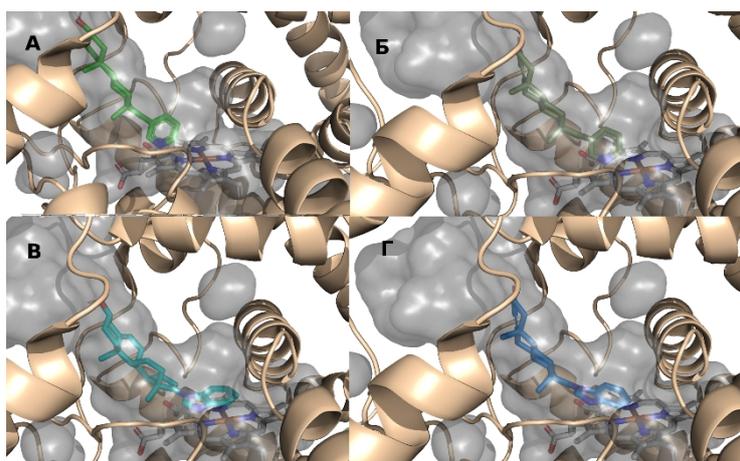


Рисунок 14. Расположение отдокированных абиратерона (А), D4А (Б), галетерона (В) и D4G (Г) в активном центре CYP11B1.

По результатам докинга абиратерона, D4A, галетерона и D4G в CYP11B2 молекулы показали схожий способ связывания: все лиганды полностью расположились в активном центре, стероидные ядра расположились вдоль плоскости гема, а окисляемые ферментом C18 и C11 атомы оказались ориентированы в сторону железа гема (Рис. 15). Подобное расположение отдокированных молекул соответствует субстратной ориентации лиганда и, вероятно, абиратерон, D4A, галетерон и D4G будут являться субстратами CYP11B2 и вызывать в нём спектральные изменения типа I.

Молекулярный докинг абиратерона и D4A в активный центр CYP19A1

CYP19A1 или ароматаза является ключевым ферментом синтеза эстрогенов.

Для выявления возможности связывания абиратерона и D4A мы провели молекулярный докинг этих соединений в активный центр CYP19A1. Однако докинг не смог выявить достоверных поз связывания для указанных лигандов. По-видимому, причина этого может быть связана с тем, что используемый в качестве мишени фермент был адаптирован к связыванию стероидного ингибитора с плоским кольцом А стероидного скелета. Тогда как в D4A его геометрия отличается от плоской. В связи с этим можно предполагать, что наблюдаемые в эксперименте различия в способности абиратерона и D4A взаимодействовать с CYP19A1 так же обусловлены различиями в структуре кольца А.

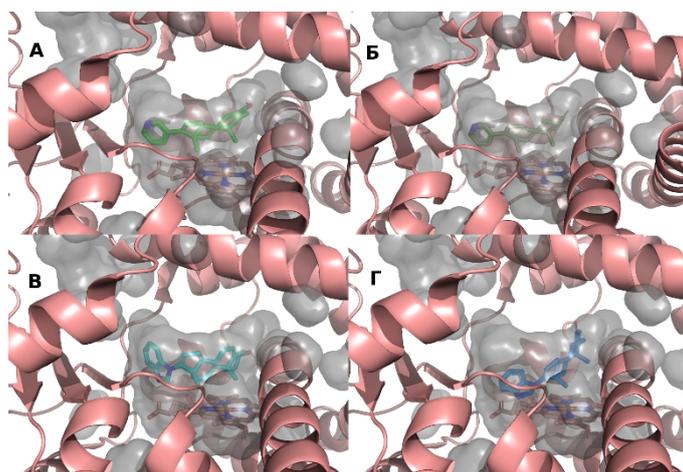


Рисунок 15. Расположение отдокированных абиратерона (А), D4A (Б), галетерона (В) и D4G (Г) в активном центре CYP11B2.

Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона с CYP3A4

Цитохром P450 3A4 является одним из основных цитохромов, метаболизирующих ксенобиотики. Для него было показано, что стероидные соединения являются его субстратами.

Молекулярный докинг показал, что в активном центре CYP3A4 способны разместиться сразу две молекулы абиратерона. Первая молекула абиратерона расположилась таким образом, что азот пиридинового цикла оказался в непосредственной близости от железа гема, что позволяет предполагать возможность образования координационной связи между этими атомами и соответствует ингибиторам типа II (Рис. 12а). Гидроксильная группа А-кольца стероидного фрагмента абиратерона образовала водородную связь с Glu374 в полярном кармане активного центра. Вторая молекула абиратерона расположилась дальше от гема. При этом стероидные ядра обеих молекул расположились в антипараллельной ориентации друг относительно друга. Причем положение молекул и паттерны образования водородных связей

для обеих молекул были схожи с такими для кетоконазола из кристаллической структуры. (Рис. 12b). Таким образом, положительная кооперативность связывания абиратерона с CYP3A4, вероятно, обусловлена возможностью связывания сразу двух молекул абиратерона в активном центре фермента.

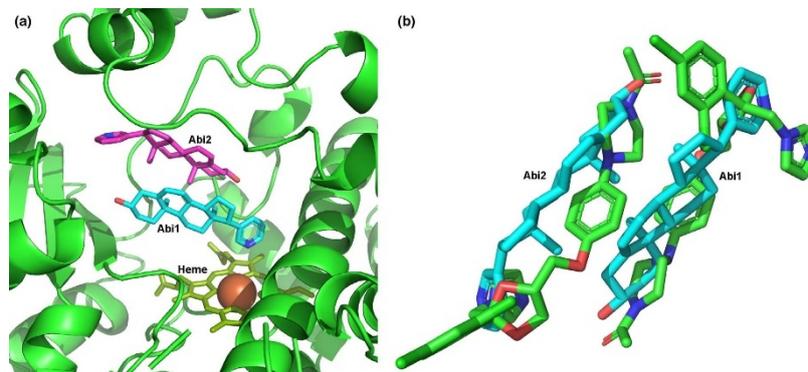


Рисунок 16. Модель комплекса CYP3A4 с двумя молекулами абиратерона в активном центре фермента (а). Суперпозиция молекул абиратерона (голубые), полученных в ходе докинга с молекулами кетоконазола (зелёные) из PDB ID 2V0M (b)

Поиск ингибиторов фосфорилирования HSP90

В цитоплазме неактивированный AR находится в комплексе с другими белками, в том числе HSP90. В 2019 году было показано, что для диссоциации комплекса AR и HSP90 и последующей транслокации рецептора в ядро, необходимо дополнительное фосфорилирование остатка Thr-90 [Dagar et al., 2019]. Поэтому разработка соединений, способных связываться с HSP90 в области Thr-90 и препятствовать его фосфорилированию, может стать новым перспективным направлением в терапии рака простаты.

В работе был апробирован оригинальный алгоритм поиска соединений, способных связываться с заданным участком белка, для которого ранее не были описаны известные лиганды. Он заключается в том, что на первом этапе происходит генерация новых молекул с помощью программы конструирования лигандов *de novo*. На следующем этапе отобранные сгенерированные молекулы используются для построения фармакофорной модели. Эта фармакофорная модель далее используется для поиска лигандов в базах данных низкомолекулярных веществ.

Для конструирования лигандов на основе трёхмерной структуры предполагаемого сайта связывания была использована программа AutoGrow4. Было произведено 10 независимых запусков Autogrow4, в каждом из которых генерировалось 10 поколений. Общее количество сгенерированных молекул составило 429118 штук.

Из сгенерированных молекул, основываясь на их аффинности, было отобрано 2042 штуки для дальнейшего визуального анализа, который показал, что значительная часть сгенерированных соединений (~30%) обладала двумя схожими подструктурами: ароматическим или циклическим алифатическим фрагментом, к которому либо непосредственно, либо через один атом прикреплен атом азота. При этом эти фрагменты располагались таким образом, что концевой атом азота оказывался в непосредственной близости от остатка Thr-90 и образовывал водородную связь с его гидроксильной группой. Особенно следует отметить две молекулы, сгенерированные AutoGrow (1 и 2), которые расположились фактически по всей длине

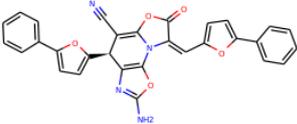
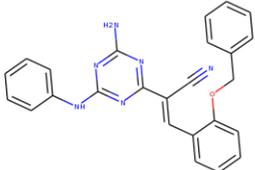
бороздки, при этом атомы азота при ароматических фрагментах были ориентированы в сторону Thr-90 и образовали с ним водородную связь. Было решено использовать две эти молекулы как основу для генерации фармакофора. Далее молекулы **1** и **2** были вручную объединены в молекулу **3**. После чего молекула **3** была вручную модифицирована в молекулы **4 - 18** путём замены и/или добавления отдельных атомов в её структуру.

После этого молекулы **1 — 18** были использованы для генерации фармакофоров при помощи веб-сервиса PharmaGist [Schneidman-Duhovny et al., 2008]. Всего на основе этих моделей было первоначально сгенерировано 4 фармакофорные модели. Однако, поиск по этим фармакофорным моделям не дал положительного результата. Для дальнейшего фармакофорного поиска были использованы лишь некоторые фармакофорные признаки из каждого полученного фармакофора, которые отбирались вручную. В результате были построены еще 7 фармакофорных моделей, которые были использованы для поиска по базе данных ZINC при помощи веб-сервиса ZINCPharmer [Koes et al., 2012]. В результате было найдено 803 соединения, соответствующих критериям использованных фармакофорных моделей.

Для оценки возможности связывания соединений, найденных в ходе фармакофорного поиска, был осуществлен молекулярный докинг. Критериями для отбора молекул для последующего анализа служили величины оценочной функции (менее -6.0 ккал/моль), возможность образования молекулами Н-связей с остатком Thr-90, а также положение молекул в исследуемой бороздке. Таким образом из базы данных ZINC было отобрано 16 молекул.

Следующим этапом стала оценка стабильности комплексов при молекулярной динамике на короткой траектории. В результате лишь 3 соединения из 16 образовали стабильные комплексы с HSP90 (**19**, **20**, **21**). Все три соединения обладают молекулярными массами от 352 до 514 Да, и, кроме соединения **20** (LogP=1.2), являются относительно гидрофобными (Табл. 4).

Таблица 4. Соединения, отобранные по итогам молекулярной динамики.

Номер соединения	Структурная формула	Мол. масса	LogP	Доноров Н-связи	Акцепторов Н-связи	Вращающихся связей
19 (ZINC20530423)		514.5	4.169	1	9	4
21 (ZINC11296605)		420.476	4.841	2	7	7

Далее была проведена более длительная МД с этими соединениями. Соединение **20** ушло в раствор после 30 нс, а соединения **19** (ZINC20530423) и **21** (ZINC11296605) оставались связанными с поверхностью белка на всем протяжении динамики (табл. 4). Значения RMSD лигандов достигали 9 Å в первые 10 нс симуляции, что говорит о смещении соединений в ходе

динамики с позиций предсказанных докинггом (Рис. 17Б). Значения RMSD основной цепи белка обоих комплексов оставались стабильными (Рис. 17А).

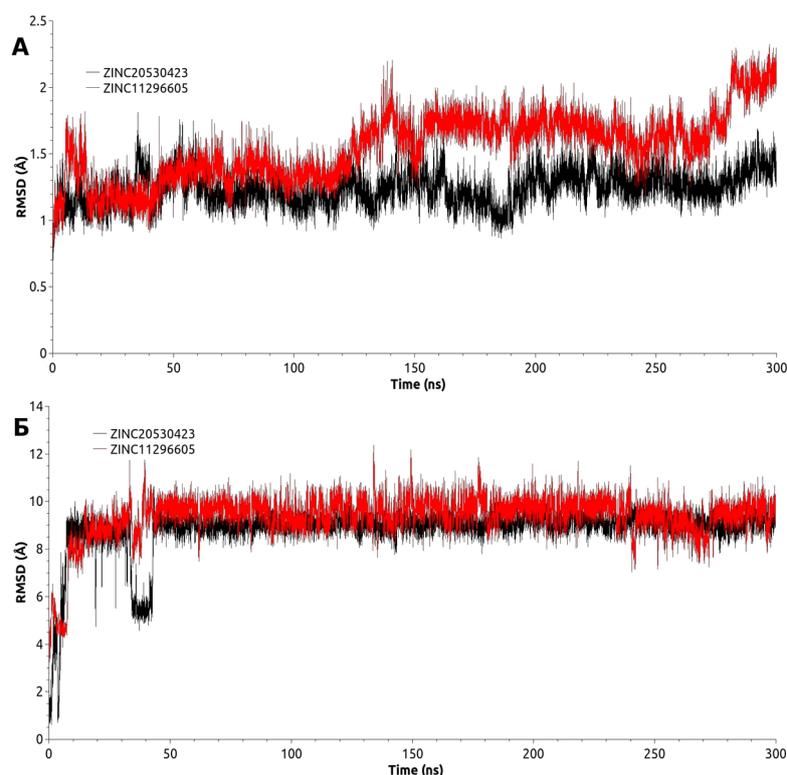


Рисунок 17. А - Значения RMSD основной цепи белка в ходе молекулярной динамики комплексов с соединениями **19** (ZINC20530423) и **21** (ZINC1126605). Б - Значения RMSD соединений **19** (ZINC20530423) и **21** (ZINC1126605) в ходе молекулярной динамики.

Для оценки сродства соединений **19** и **21** к HSP90 были рассчитаны свободные энергии образования комплексов HSP90-**19** и HSP90-**21** при помощи метода MM-GBSA. (Табл. 5.).

Таблица 5. Свободные энергии связывания (ΔG_{bind}) соединений **19** и **21** с HSP90 и вклад в энергию различных членов.

Комплекс	Вклад (ккал/моль)						
	ΔE_{ele}	ΔE_{vdw}	ΔG_{p}	ΔG_{np}	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG_{bind}
HSP90- 19	-22,68	-35,89	37,31	-5,10	-26,35	-21,43	-4,92
HSP90- 21	-26,93	-31,75	36,26	-4,56	-26,97	-21,53	-5,44

Таким образом, в результате проведенных исследований соединения **19** (ZINC20530423) и **21** (ZINC1126605) могут быть рекомендованы для экспериментальной проверки на их способность ингибировать фосфорилирование HSP90 и блокировать активацию роста клеток в ответ на стимулирование агонистами.

Заключение

В работе был детально исследован механизм взаимодействия стероидных гибридов **171** и **172** с лиганд-связывающим карманом андрогенового рецептора. Было выявлено, что наиболее вероятным антагонистом AR будет являться соединение **172**, так как оно вносит наибольшие возмущения в структуру H12.

Также было изучено взаимодействие абиратерона, галетерона и их соответствующих 3-кето- Δ 4-метаболитов D4A и D4G с ферментами CYP, вовлеченными в стероидогенез. В результате удалось получить модели, которые хорошо согласуются с наблюдаемыми экспериментальными данными и объясняют их. Однако, в ряде случаев молекулярный докинг не смог выявить достоверных поз связывания для исследуемых молекул.

Помимо этого, в работе был апробирован оригинальный алгоритм поиска соединений, способных связываться с заданным участком белка, для которого ранее не были описаны известные лиганды. Этот алгоритм заключается в de novo генерации лигандов, связывающихся с интересующим участком. Далее эти лиганды используются для построения фармакофорной модели, которая, в свою очередь, используется для поиска низкомолекулярных соединений по химическим базам данных. Благодаря этому алгоритму удалось найти два соединения — потенциальных ингибитора фосфорилирования HSP90.

ВЫВОДЫ

1. Исследования методом молекулярной динамики комплексов андрогенового рецептора дикого типа и его мутантных форм, W741L-AR и T877A-AR, с новыми стероидными гибридами **171** и **172** показали, что они являются антагонистами всех изученных форм AR. Соединение **172** должно быть более эффективным антагонистом, чем соединение **171**. Паттерны взаимодействия соединений **171** и **172** отличаются от таковых для известного антагониста бикалутамида. Если бикалутамид вступает во взаимодействие со спиралью H12, то исследованные соединения взаимодействуют с петлей L11_12. Полученные заключения согласуются с экспериментальными данными по активности соединений **171** и **172**, полученных на клетках линии рака простаты LnCap.
2. Результаты молекулярной динамики комплексов AR с лигандами показали, что при связывании антагонистов с AR не происходит значительного смещения спирали H12, как это наблюдается у эстрогенового рецептора. Предположено, что в AR антагонистам достаточно вызвать небольшой сдвиг H12, чтобы привести к нарушению геометрии поверхностных сайтов AF2 и BF3 и невозможности рекрутинга на них коактиваторов.
3. При исследовании взаимодействия абиратерона, галетерона, D4A и D4G со стероид-метаболизирующими CYP было показано, что построенные модели могут с высокой достоверностью предсказать механизм связывания лигандов в активных центрах цитохромов P450. На основе построенных моделей можно предсказывать тип ингибирования (I или II типа) цитохромов P450, объяснять сигмоидальные зависимости на кривых связывания лигандов с ферментами. Так, для цитохрома P450 21A1 была выявлена причина разного типа ингибирования для абиратерона и галетерона. Для CYP51A1 и CYP3A4 наблюдаемая сигмоидальная зависимость связана с возможностью аккомодации второго лиганда в активных центрах ферментов.

4. Предложен подхода по поиску новых лигандов для новых сайтов связывания в белках. Подход апробирован на сайте связывания, расположенным рядом с фосфорилируемым остатком Thr-90 в шапероне HSP90. С использованием данного подхода предложены два соединения для дальнейшей экспериментальной проверки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах:

1. Latysheva A. S., Zolotsev V.A., Veselovsky A.V, Scherbakov, K.A., Morozevich G.E., Pokrovsky V.S., Novikov R.A., Timofeev V.P., Tkachev Ya. V, Misharin A.Y. New steroidal oxazolines, benzoxazoles and benzimidazoles related to abiraterone and galeterone // *Steroids*. 2020. T. 153.
2. Latysheva A. S., Zolotsev A.V., Veselovsky, A.V., Scherbakov K.A., Morozevich, G.E., Zhdanov D.D., Novikov R.A., Misharin A.Y. Oxazolinyl derivatives of androst-16-ene as inhibitors of CYP17A1 activity and prostate carcinoma cells proliferation: Effects of substituents in oxazolinyl moiety // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2023. T. 230. C. 106280.
3. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Haurychenka Ya.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Strushkevich N.V., Shkel T.V., Gilep A.A. Usanov S.A., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. Estimation of the inhibiting impact of abiraterone D4A metabolite on human steroid 21-monooxygenase (CYP21A2)// *Steroids*. 2020a. T. 154. C. 108528.
4. Masamrekh R. A. и др. Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Haurychenka Ya.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Filimonov D.A., Dmitriev A.V., Zavialova M.G., Gilep A.A., Shkel T.V., Strushkevich N.V., Usanov S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug–drug interactions // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2020b. T. 34. № 1. C. 120–130.
5. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Haurychenka Y.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking // *Steroids*. 2020c. T. 162. C. 108693.
6. Masamrekh R.A., Filippova T.A., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. Interactions of galeterone and its 3-keto- Δ^4 metabolite (D4G) with one of the key enzymes of corticosteroid biosynthesis - steroid 21-monooxygenase (CYP21A2). // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2021. T. 35. № 2. C. 423–431.
- 7А. Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Филиппова Т.А., Щербakov К.А., Веселовский А.В., Шумянцева В. В. Взаимодействие абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A с цитохромом P450 2C9 (CYP2C9) // *Биомедицинская химия*. 2022. Т. 68 №3. С. 201-211.
- 7Б. Masamrekh R. A. Kuzikov A.V., Filippova T.A., Scherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V. The interactions of abiraterone and its pharmacologically active metabolite D4A with cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) // *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2022. T. 68. № 3. C. 201–211.

Материалы научных конференций:

8. Гавриченко Я.И., Филиппова Т.А., Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Щербаков К.А. Взаимодействие метаболитов противоопухолевых препаратов абиратерона и галетерона со стероид 21-монооксигеназой (CYP21A2). 24-я Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» 20-24 апреля 2020, Пушино, Россия, 165.
9. Щербаков К.А., Веселовский А.В., Мехтиев А.Р. Моделирование взаимодействия новых потенциальных антиандрогенов AVK-171 и AVK-172 с лиганд-связывающим доменом андрогенового рецептора. 27-я Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» 10-23 апреля 2023, Пушино, Россия, 74