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

На правах рукописи

Щербаков Кирилл Андреевич

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАНДРОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ СТЕРОИДНЫХ ГИБРИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

1.5.8. – математическая биология, биоинформатика

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук Веселовский Александр Владимирович

СОДЕРЖАНИЕ

| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
|---|---|
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 9 |
| 1.1 Рак простаты и его патогенез | 9 |
| 1.2 Структура и функции андрогенового рецептора1 | 1 |
| 1.2.1 N-концевой домен1 | 3 |
| 1.2.2 ДНК-связывающий домен и шарнирный участок | 3 |
| 1.2.3 Лиганд-связывающий домен1 | 5 |
| 1.2.4 Агонисты андрогенового рецептора1 | 6 |
| 1.2.5 Мутантные формы AR и развитие нечувствительных к кастрации форм рака | |
| простаты | 8 |
| 1.3 Андрогеновый рецептор как мишень для разработки новых противоопухолевых | |
| препаратов | 3 |
| 1.3.1 N-концевой домен как мишень для противоопухолевых препаратов | 3 |
| 1.3.2 ДНК-связывающий домен как мишень для противоопухолевых препаратов2 | 3 |
| 1.3.3 Лиганд-связывающий домен как мишень для противоопухолевых препаратов2 | 4 |
| 1.3.4 Антагонисты лиганд-связывающего кармана андрогенового рецептора2 | 6 |
| 1.4 Молекулярное моделирование взаимодействия антиандрогенов с лиганд- | |
| связывающим карманом AR2 | 7 |
| 1.4 Ферменты семейства цитохром Р450З | 3 |
| 1.4.1 Стероидметаболизирующие цитохромы Р450 как мишени для лечения рака | |
| простатыЗ | 8 |
| 1.5 HSP90 как мишень для разработки новых препаратов против рака простаты4 | 5 |
| 1.6. Методы молекулярного моделирования | 8 |
| 1.6.1. Метод молекулярного докинга4 | 8 |
| 1.6.2. Метод молекулярной динамики5 | 1 |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 5 |
| 2.1. Объекты | 5 |
| 2.1.1 Структуры белков | 5 |
| 2.2.2 Структуры низкомолекулярных соединений | 5 |
| 2.2. Компьютерные методы | 6 |
| 2.2.1. Докинг | 6 |
| 2.2.2. Молекулярная динамика | 6 |
| 2.2.3. Расчет энергии взаимодействия в комплексах5 | 7 |
| 2.2.4. Метод главных компонент (PCA)5 | 7 |
| 2.2.5. Доля нативных контактов | 8 |
| 2.2.4. Генерация лигандов <i>de novo</i> | 8 |
| 2.2.5. Построение фармакофорных моделей5 | 9 |
| 2.2.6. Построение сети взаимодействий остатков (RIN) | 9 |
| 2.3 Оборудование | 9 |
| 2.4. Экспериментальные методы | 0 |
| 2.4.1. Синтез соединений | 0 |
| 2.4.2. Определение активности цитохромов Р450 | 0 |
| 2.3.2. Определение токсичности соединений на клеточных культурах | 1 |
| Глава З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 3 |
| 3.1 Взаимодействие соединений 171Е. 171К и 172 с андрогеновым рецептором | 3 |
| 3.1.1 Общая структура и стабильность комплексов | 3 |
| 3.1.2 Оценка степени деспирализации H126 | 7 |
| 3.1.3 Анализ распределения конформаций спирали H12 методом главных компонент6 | 8 |
| 3.1.4 Расчет доли нативных контактов для спирали Н127 | 2 |

| 3.1.5 Паттерны взаимодействия соединений 171Е, 171К и 172 с андрогеновым |
|---|
| рецептором73 |
| 3.1.6 Расчёт свободных энергий связывания соединений 171Е, 171К и 172 и разложение |
| свободных энергий связывания по остаткам77 |
| 3.2 Исследование взаимодействия абиратерона, галетерона и их 3-кето-Δ4-производных со |
| стероид-метаболизирующими цитохромами Р45080 |
| 3.2.1 Молекулярное моделирование взаимодействия D4A и D4G с CYP17A181 |
| 3.2.2 Исследование взаимодействия абиратерона и D4A с СҮР51А183 |
| 3.2.3 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона и D4A с СҮР11А184 |
| 3.3.4 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона, галетерона и их |
| производных с СҮР21А285 |
| 3.3.5 Молекулярный докинг абиратерона, галетерона и их метаболиов D4A и D4G в |
| активные центры СҮР11В1 и СҮР11В287 |
| 3.3.6 Молекулярный докинг абиратерона и D4A в активный центр СҮР19А189 |
| 3.3.7 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона с СҮРЗА490 |
| 3.3 Поиск ингибиторов фосфорилирования HSP9091 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ107 |
| ВЫВОДЫ114 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ115 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ116 |
| БЛАГОДАРНОСТИ127 |

введение

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 (T) И дигидротестостероном (DHT). Действие T и DHT осуществляется через особый тип транскрипционного фактора - андрогеновый рецептор (AR). Связывая AR, мужские половые гормоны активируют рецептор, после чего AR транспортируется в ядро, где тот 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 [1]. 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 [2]. Второй подход подразумевает снижение уровня тестостерона и дигидротесторерона путём ингибирования активности фермента цитохром Р450 17αгидроксилаза, 17,20-лиаза (СҮР17А1) [2]. СҮР17А1 катализирует 17α-гидроксилирование прогестерона и прегненолона в соответствующие 17α-гидроксилированные метаболиты, метаболизируются до дегидроэпиандростерона и которые затем 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 [3], флутамид — T877A [4], а энзалутамид — F786L [5]. В связи с этим особый интерес представляет разработка препаратов резистентных к указанным мутациям. Недавно были синтезированы два новых стероидных гибрида 3,17 - дигидрокси-андрост-17-ил)метил)изоксазол-5(4Н)-он (**171**) и 17-((изоксазол-3-ил)метил)-андрост-5-ен-3,17 -диол (**172**) как потенциальные антагонисты AR. Исследование

антиандрогенной активности данных соединений показало, что они наиболее эффективно подавляли рост только клеточной линии LNCaP (андроген-зависимая клеточная линия рака простаты). Таким образом, актуальной задачей представляется изучение механизма воздействия этих соединений на андрогеновый рецептор человека.

В случае же применения ингибиторов СΥР17А1 возможны серьезные побочные эффекты вследствие недостаточной их селективности. Например, популярный препарат абиратерон способен взаимодействовать со стероид 21-гидроксилазой (СҮР21А2) и и 11βгидроксилазой, 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 гипертнезия [6–8]

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-Δ4-метаболитов (D4A и D4G) [9, 10]. 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 будет взаимодействовать и с другими изоферментами P450, вовлеченными в стероидогенез. В связи с этим представляется необходимым детальное изучение взаимодействия 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 серьёзных 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 фосфорилировании по остатку Thr-90 [11]. 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, при помощи методов молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1) Исследовать механизмы взаимодействия новых стероидных гибридов **171** и **172** с лиганд-связывающим доменом AR и его известных мутантов, вызывающих устойчивость к антагонистам, методами докинга и молекулярной динамики.

 Установить молекулярные механизмы взаимодействия абиратерона, галетерона и их 3-кето-Δ4-производных со стероид-метаболизирующими цитохромами Р450 методом молекулярного докинга.

 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, а также 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-Δ4-метаболитов с ключевыми ферментами стероидогенеза. Было показано, что модели цитохромов Р450 с лигандами, построенные методом докинга, позволяют предсказывать тип ингибирования этих лигандов. Данные модели позволяют объяснить сигмоидальный характер кривых зависимости связывания от концентрации лигандов, свидетельствующий об их кооперативном связывании. На основе полученных

молекулярных моделей высказано предположение о том, какие препараты могут являться более предпочтительными для лечения рака простаты.

Был предложен новый подход по поиску лигандов для новых сайтов связывания. Он заключается в последовательном использовании методы *de novo* конструирования, 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 стероид-метаболизирующих цитохромов P450 с абиратероном, галетероном и их метаболитами, D4A и D4G, позволили объяснить ряд наблюдаемых в экспериментах спектральных изменений при связывании, 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 рецепотру дикого типа, так и к его мутантным формам.

Для стероид-метаболизирующих цитохромов P450 выявление механизмов взаимодействия абиратерона, галетерона, D4A и D4G с ними 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 дикого типа андрогенового рецептора, 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 стероидметаболизирующих 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 апробации 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 Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (5-7 октября 2020, Пущино, Россия); 27-я Международная Пущинская школаконференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (10-13 апреля 2023, Пущино, Россия);

Публикации

По материалам диссертации были опубликованы 7 научных статей из числа рекомендованных ВАК РФ изданий.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рак простаты и его патогенез

Одним из широко распространённых заболеваний предстательной железы у мужчин старшего возраста являются её злокачественные опухоли. Большинство видов рака простаты, как правило, являются медленно растущими, однако встречаются и быстро растущие формы [2, 6]. Рак простаты является инвазивным, его клетки способны метастазировать в другие части тела.

Ранние стадии рака простаты могут протекать без видимых симптомов. В некоторых случаях симптомы всё же удаётся наблюдать, однако они могут быть спутаны с симптомами доброкачественной гиперплазии предстательной железы и включают в себя преимущественно ночной диурез, трудности с мочеиспусканием, наличие крови в моче и боли при мочеиспускании.

Однако, до 2/3 пациентов никаких симптомов не ощущают [12]. Трудности с мочеиспусканием при развитии рака простаты связаны с тем, что растущая опухоль сдавливает простатическую область уретры. Поскольку семявыносящие протоки выводят семенную жидкость непосредственно в простатическую часть уретры, рак простаты способен вызывать трудности с достижением и поддержанием эрекции и болезненную эякуляцию.

Метастатический же рак простаты вызывает более обширные симптомы. Наиболее распространённым из которых являются боли в костях, зачастую в области позвоночника, таза и рёбер. Клетки опухоли, метастазировавшие в спинной мозг вызывают такие симптомы как покалывание, слабость в ногах, недержание кала и мочи.

Одним из наиболее распространённых онкомаркёров, характерных для рака простаты, является простатический специфический антиген (ПСА или PSA). В небольших количествах ПСА наблюдается в сыворотке крови у мужчин со здоровой простатой, однако уровень ПСА зачастую повышается при наличии различных заболеваний простаты, в том числе и её злокачественных опухолей [13]. Маркёром, характерным для поздних стадий рака простаты является онкопротеин BCL-2. Данный белок принадлежит к семейству регуляторных белков BCL-2, регулирующих клеточную смерть путём индуцирования или ингибирования апоптоза [14]. Одним из относительно новых онкомаркёров РПЖ является антиген рака простаты 3 (РСАЗ). Сверхэкспрессия этого белка наблюдается более чем в 95% образцов рака простаты [15].

Основными факторами, влияющими на развитие рака простаты, являются возраст, расовая принадлежность и наследственность [16]. Рак простаты крайне редко наблюдается у мужчин младше 45 лет, а средний возраст диагностирования заболевания — 70 лет. Так же рак простаты более распространён среди представителей негроидной расы. А риск развития рака простаты, у людей, имевших это заболевания среди родственников первой степени родства, выше в 4 раза в сравнении с контролем [16].

Генетическая предрасположенность к раку простаты зачастую может возникать в следствие наличия редких мутаций. Исследования генетических основ рака простаты предполагают наличие рецессивных, доминантных и Х-сцепленных моделей развития заболевания [16]. В результате ряда исследований был установлен ген, однозначно определяющий предрасположенность к развитию рака простаты — гомеобоксный ген *HOXB13* [17]. Результатом более чем 20 полногеномных исследований рака простаты стало установление 77 SNP, ассоциированных с развитием заболевания [18]. Часть этих SNP присутствует в некодирующей области 8q24, в непосредственной близости от онкогена *с-МYC*. По всей видимости, эти SNP вызывают изменение конформации хроматина в области *с-MYC*, что влияет на уровень его экспрессии.

Редкая мутация зародышевой линии в BRCA2 наблюдается у людей, чьи родственники перенесли рак груди или рак яичников [19]. Другими факторами риска служат мутации в генах HPC1, андрогенового рецептора и рецептора витамина D [20].

При подтверждении диагноза рака простаты, первым решением, которое необходимо принять врачу становится выбор правильного метода лечения. Некоторые медленно растущие формы рака простаты, в особенности у мужчин старшего возраста, могут и вовсе не требовать лечения [21]. Если же терапия необходима, то решение о виде лечения принимается на основе стадии заболевания, степени дифференциации опухоли по шкале Глисона и уровню сывороточного ПСА. Зачастую первым этапом в лечении становится химическая, либо хирургическая кастрация пациента. Связано это с тем, что рак простаты по своей природе является гормон-зависимым, т.е. злокачественные клетки растут и развиваются под действием мужских половых гормонов — тестостерона (T) и дигидротестостерона (DHT), основная продукция которых происходит в яичках (90-95%) и коре надпочечников [2]. Т и DHT оказывают свою пролиферативное воздействие путём связывания с андрогеновым рецептором (AR) опухолевых клеток. Синтез же T и DHT осуществляется ферментом семейства цитохром Р450 — СҮР17А1. Таким образом, эффективным методом лечения рака простаты может являться назначение препаратов

антагонистов AR и ингибиторов СҮР17А1, например, абиратерона, ципротерона, флутамида, бикалутамида.

Однако спустя 2-3 года после кастрации и лечения указанными препаратами, возникает рецидив заболевания - данная форма носит название «рак простаты, нечувствительный к кастрации» (CRPC — castration resistant prostate cancer). На этом этапе для роста и развития злокачественных клеток более не требуется циркуляции в крови андрогенов, активация AR становится возможным без их участия, а антагонисты рецептора, напротив, становятся его агонистами. Происходит это за счёт возникновения ряда мутаций в самом AR [2].

1.2 Структура и функции андрогенового рецептора

Андрогеновый рецептор относится к семейству ядерных рецепторов стероидных гормонов к которому также принадлежат и его структурные аналоги: эстрогеновый рецептор (ER), глюкокортикоидный рецептор (GR), прогестероновый рецептор (PR) и минералокортикоидный рецептор (MR) [22]. AR является лиганд-зависимым фактором транскрипции, контролирующим работу целевых генов. Связывание AR с его природным лигандами дигидротестестероном и тестостероном, в конечном итоге, необходимо для развития и поддержания мужского фенотипа [4].

Тестостерон синтезируется в клетках Лейдига, в яичках и частично в передней доле гипофиза [4]. Будучи синтезированным, тестостерон связывается с сывороточным альбумином и в таком виде транспортируется по организму [4]. Однако, в клетки простаты способны проникать только свободные формы Т. Внутри клеток тестостерон восстанавливается до более активного метаболита — дигидротестостерона цитозольным ферментом 5α-редуктазой [4].

Находясь в неактивном состоянии AR располагается в цитоплазме, будучи связанными с белками теплового шока — шаперонами (HSP40, HSP70 и HSP90), которые придают рецептору стабильность [2]. DHT с высокой аффинностью связывается с AR, что вызывает в нём конформационные изменения, приводящие к диссоциации шаперонов и активации рецептора. Далее происходит взаимодействие N- и C-концов AR, связывание его с импортином-α и транслокация рецептора в ядро, где происходит димеризация AR и рекрутинг коактиваторов [23]. В ядре димеры AR связываются в промотерных областях таких генов, как гены PSA или трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) с

особыми участками ДНК - элементами ответа на андрогены (ARE) [2]. Описанный механизм активации целевых генов андрогеновым рецептором представлен на рис. 1.



Рис. 1. Механизм активации целевых генов андрогеновым рецептором [2]

Ген AR находится на хромосоме Xq11-12, его 5`-конец ориентирован к центромере. Ген имеет протяжённость ~ 90 kb, содержит в своём составе восемь экзонов общей длиной ~ 2757 пар оснований и транскрибируется в 10.6-kb мРНК [24]. Подобно другим членам семейства ядерных рецепторов, отдельные экзоны AR кодируют отдельные функциональные области белка [24]. Первому экзону соответствует N-концевой домен, экзоны 2 и 3 кодируют ДНК-связывающий домен, а экзоны 4 и 8 С-концевой лигандсвязывающий домен [24].

Структурно-функциональная организация AR соответствует таковой у других представителей семейства ядерных рецепторов, подобно им AR состоит из трёх основных функциональных доменов: N-концевого домена (NTD, остатки 1-555), ДНК-связывающего домена (DBD, 556-623) и C-концевого лиганд-связывающего домена (LBD, остатки 665-919), который соединяется с DBD посредством гибкого шарнирного участка (остатки 623-665) [25]. Все три домена необходимы для нормального функционирования AR. DBD отвечает за связывание AR с промотерами и энхансерами целевых генов. AR также содержит сайты рекрутинга коактиваторов — AF1 и AF2 (от англ. Activation Function) [4]. AF1 расположен на DBD и является конститутивно активным, в то время как AF2, образованный спиралями H3, H11 и H12 для своей активации требует связывания рецептора с лигандом [4].

1.2.1 N-концевой домен

NTD составляет более половины длины всего рецептора и целиком кодируется первым экзоном [4]. В NTD содержатся полиглутаминовые (CAG) и полиглицновые (GGC) повторы длина которых сильно варьируется внутри человеческой популяции. Было показано, что длина полиглутаминовых повторов непосредственно влияет на фолдинг и структуру AR-NTD [26]. Удаление поли-Q повторов приводит уменьшению альфаспиральности домена, в то время как увеличение их количества отражается в увеличении длины и количества α-спиральных участков [4]. Описанные конформационные изменения в NTD, вероятно, оказывают прямое влияние на белок-белковые взаимодействия, что хорошо объясняет зависимость транскрипционной активности AR от длины повторов [27]. Например, делеция поли-Q участка приводит к четырёхкратному снижению уровня активации AR [28]. Тем не менее, до сих пор не было получено кристаллической структуры AR-NTD, что связано с низкой степенью упорядоченности этого домена. Предполагается, что подобные неупорядоченные белки подвергаются процессу фолдинга благодаря специфичным белок-белковым взаимодействиям [29]. Вероятно, именно структурная пластичность частично свёрнутого белка и позволяет NTD взаимодействовать с большим числом разнообразных партнёров. Подобные кооперативные взаимодействия со многими партнёрами и обуславливают высокую аффинность, которая обеспечивается множеством низко специфичных взаимодействий [29]. Эксперименты с делеционным мутагенезом показали, что целый NTD необходим для нормальной транскрипционной активности AR. AF1 является важнейшим эффекторным участком NTD и состоит из двух отдельных участков Tau-1 и Tau-5, оба из которых необходимы для нормального функционирования рецептора [30]. Эти участки содержат особые мотивы (FQNLF в Tau-1 и WHTLF в Tau-5), которые играют ключевую роль в междоменном взаимодействии NTD и LBD [30].

1.2.2 ДНК-связывающий домен и шарнирный участок

DBD богат цистеином и является высоко консервативным доменом у всех рецепторов стероидных гормонов [4]. Кристаллические структуры AR-DBD показывают, что каждый мономер DBD содержит ядро, состоящее из двух цинковых пальцев, каждый из которых состоит из четырёх остатков цистеина, координирующих один ион цинка [4].

AR, подобно другим стероидным рецепторам, функционирует в виде димера и связывает на промотере два эквивалентных полусайта (5'-AGAACA-3'), разделённых

трёхнуклеотидным спейсером IR3 [31]. Альфа-спираль N-концевого цинкового пальца напрямую взаимодействует с нуклеотидами т.н. гормон-отвечающих элементов (hormone response elements) в большой бороздке ДНК. Три остатка на N-конце этой α-спирали (Gly-Ser-Val) образуют P-бокс, идентичный в PR, MR и GR и распознают общие специфичные элементы на ДНК. Основной вопрос состоял в том, каким образом стероидные рецепторы проявляют свою специфичность, если они способны связывать общие для всех NR элементы ДНК. В ходе исследований удалось идентифицировать селективные андрогенотвечающие элементы (ARE), которые и обуславливают специфичность AR. ARE представляют собой гексамерные полусайты в виде прямо ориентированных повторов [4]. Селективность достигается димеризацией AR «голова к голове» посредством D-бокса [31]. Поскольку DBD является высоко консервативным доменом у различных стероидных рецепторов до сих пор остаётся предметом споров вопрос о том, каким образом ARE не распознаются другими стероидными рецепторами [4]. На основе кристаллографических данных было сделано предположение, что AR обладает дополнительным интерфейсом, который стабилизирует комплекс димера AR с ARE [4].

Другим важным элементом AR является сигнал ядерной локализации (NLS, остатки 617-633). NLS располагается между DBD и шарнирным участком и участвует в транслокации рецептора в ядро [32]. Пассивному транспорту через ядерные поры подвергаются белки, масса которых не превышает 20-40 кДа [33]. AR же обладает массой в 110кДа и может быть транслоцирован через пору лишь посредством активного транспорта. Недавние исследования показали, что связывание лиганда рецептором приводит к экспонированию NLS, что позволяет последнему рекрутировать транспортный белок импортин-α [33]. Подробности этого взаимодействия удалось определить при изучении кристаллической структуры комплекса импортина-α с AR-NLS (PDB ID: 3BTR) [34]. NLS содержит два кластера основных аминокислот, разделённых спейсором из 10 остатков [4]. Этот участком также является высоко консервативным среди всех ядерных изогнутую В комплексе с AR импортин принимает рецепторов. форму И электростатически взаимодействует со вторым кластером основных аминокислот NLS [4]. Также было показано, что шарнирный участок принимает участие в связывании ДНК, рекрутинге коактиваторов, N/C-взаимодействии и является мишенью для ацетилирования, метилирования и убквитинилирования [35].

1.2.3 Лиганд-связывающий домен

В последние годы было разрешено множество кристаллических структур лигандсвязывающих доменов стероидных рецепторов [4]. Несмотря на существенную разницу в аминокислотных последовательностях LBD различных представителей этого семейства (иногда сходство составляет менее 20%), их трёхмерная укладка LBD является схожей [24]. LBD стероидных рецепторов укладывается в 12-спиральную структуру, в которой спираль 12 обладает значительной подвижностью [24]. В общих чертах укладку LBD можно представить, как трёхслойную структуру, образованную антипараллельными αспиралями. AR-LBD, в отличие от других представителей семейства, содержит в своём составе лишь 11 α-спиралей, а также 4 β-тяжа, которые образуют два антипараллельных βлиста (рис. 2). Спирали H1 и H3 образуют первый слой LBD, в отличие от LBD других стероидных рецепторов, LBD-AR не имеет в своём составе спирали H2, которая у него заменена длинным гибким линкером. Второй слой образован спиралями Н4, Н5, Н8, Н9 и первым β-листом. Третий слой состоит из спиралей Н10 и Н11. Лиганд-связывающий карман (LBP) образован N-концами спиралей H3, H5 и H11. Спираль H12, которая составляет основу сайта AF2, выполняет роль своеобразной крышки, закрывающейся при связывании рецептором агониста [4].



Рисунок 2. Структура лиганд-связывающего домена андрогенового рецептора [4].

1.2.4 Агонисты андрогенового рецептора

Двумя ОСНОВНЫМИ природными лигандами AR являются тестостерон И дигидротестостерон (рис. За). DHT отличается от T отсутствием двойной связи между 4-м и 5-м углеродными атомами А-кольца, что приводит к двукратному росту аффинности [4]. Первой разрешённой кристаллической структурой AR-LBD стал его комплекс с синтетическим агонистом R1881 [36]. На основе этой структуры удалось установить, что андроген располагается в лиганд-связывающем кармане, образованном спиралями H3, H5 и H11 (PDB: 1E3G). Позднее также были получены структуры AR в комплексе с его природными агонистами Т и DHT. Все три комплекса обладают высоко идентичными конформациями и схожим механизмом связывания лигандов. R1881, DHT и T обладают 18, 16 и 15 точками контакта с рецептором соответственно [4]. Контакты осуществляются за счёт гидрофобных остатков, которые взаимодействуют преимущественно со стероидным ядром лигандов (рис. 36). Также важную роль во взаимодействии играют и полярные остатки: кето-группа А-кольца образуют 2 Н-связи с остатками Q711 и R752, гидроксил в 17β-положении также образует 2 H-связи с N705 и T877 (рис. 3б) [4].



Рисунок За. Структурные формулы тестостерона, дигидротестостерона и R1881.



Рисунок 3б. Контакты, образуемые агонистами с LBD: R1881(слева), DHT(посередине) и T(справа) [4]. Во всех случаях образуется по 4 H-связи между лигандом и белком.

Конформации боковых цепей остаются в одинаковом положении во всех трёх комплексах, что свидетельствует о том, что указанные взаимодействия важны для распознавания лигандов [4]. Тщательный анализ структур с DHT и T показал, что наличие ненасыщенной связи между C4 и C5 атомами искажает геометрию А-кольца, что вызывает изменение ориентации кето-группы при C3. Это приводит к изменению длины и угла водородной связи с R752 и уменьшает аффинность тестостерона к AR [37].

Как указывалось выше, связывание агонистов с AR вызывает смещение спирали H12 к спиралям H3 и H4, и образованию на поверхности LBD сайта связывания коактиваторов AF2 [4]. Многие ядерные рецепторы осуществляют свою транскрипционную активность путём связывания коактиваторов, которые содержат короткий богатый лейцином мотив LxxLL, известный как NR-бокс (от англ. Nuclear receptor) [38]. Было показано, что AR может с высокой аффинностью связывать некоторые LxxLL-мотивы в коактиваторах p160 [39]. Однако, методом фагового дисплея, было установлено, что AR отдаёт предпочтение фенилаланин-богатым мотивам FxxLF [40]. Боковые цепи ароматических остатков F₁, L₄ и F₅ коактиватора проникают в гидрофобную бороздку на поверхности LBD, образованную спиралями 3, 4 и 12 (рис. 4) [4].

Заряженные остатки Lys в H3 и Glu в H12 остаются высоко консервативными в различных ядерных рецепторах. Эти остатки располагаются на границе бороздки сайта распознавания корегуляторов и электростатически взаимодействуют с основной цепью коактиватора, образуя «зарядовый зажим» между F_1 и E897 LBD и F_5 и K720 AR (Рис. 4) [4].



Рисунок 4. Взаимодействие AR-LBD (фиолетовый) с FxxLF-мотивом (желтый) Средний рисунок показывает ключевые для этого взаимодействия остатки. Справа * отмечены высоко консервативные остатки спиралей H3 и H12 у различных ядерных рецепторов [4].

Однако, сайт AF2 играет роль не только места связывания корегуляторов, но также важен для взаимодействия N- и C-концов AR [40]. Также было обнаружено, что сайт BF3 (binding function 3) является аллостерическим регулятором способности AF2 связывать корегуляторы [41]. LBD также обладает и другой важной функцией — регуляция транспорта AR в ядро.

1.2.5 Мутантные формы AR и развитие нечувствительных к кастрации форм рака простаты

Как уже отмечалось выше, после наступления длительной ремиссии у пациентов, прошедших через химическую или хирургическую кастрацию, неизбежно развивается CRPC. У данной формы рака простаты имеется множество механизмов развития. Вкратце можно выделить четыре основных механизма:

1) повышение чувствительности AR к природным лигандам;

2) мутации, которые придают способность AR активироваться в ответ на другие лиганды, в том числе антагонисты;

3) лиганд-независимая активация AR;

4) AR-независимые механизмы [4].

В контексте данной работы нас в наибольшей степень интересует второй механизм. В данном случае в AR происходят мутации (Т877A, L701H, W741L и F876L), которые позволяют связывать и распознавать как агонисты и антиандрогены, так и другие стероидные гормоны (эстроген, прогестерон и глюкокортикоиды), что приводит к

инициации транскрипционной активности AR и усилению пролиферации клеток рака простаты. Поскольку AR является одним из основных факторов, способствующих развитию CRPC, важным остаётся вопрос о том, как различные мутации в нём влияют на его функционирование.

Мутация AR T877A

Мутация Т877А присуща клеточной линии LNCaP. Данный мутант AR обладает повышенной аффинностью к эстрогенам и прогестерону, способен также OH флутамидом [40]. Из активироваться антиандрогенами, например, сравнения кристаллографических структур Т877А и WT-AR в комплексе с DHT было выявлено, что конформации обоих комплексов схожи [4]. Основные взаимодействия лиганда, как в WT, так и в Т877А происходят с одними и теми же боковыми цепями AR за исключением мутировавшего остатка. Замена треонина на аланин в 877-й позиции приводит к увеличению свободного пространства вокруг D-кольца DHT (рис. 5). Дополнительное пространство позволяет размещаться в лиганд-связывающем кармане более массивным лигандам, таким как эстроген, прогестерон и антиандрогены и активировать рецептор. Дополнительным доказательством этой гипотезе послужили результаты экспериментов, в ходе которых треонин был заменён на более массивный аспартат, что привело к утрате рецептором способности связывать андрогены и активироваться [42].



Рисунок 5. Сравнение структур WT-AR (сверху) и T877A-AR (снизу), связанных с DHT. Для T877A хорошо заметно увеличение свободного пространства у D-кольца DHT

[4].

Мутации L701H/Т877А

Две одновременные мутации L701Н и Т877А были обнаружены в андрогеннезависимых линиях клеток рака простаты MDA 2a и 2b. Такая двойная мутация позволяет андрогеновому рецептору активироваться в отсутствии андрогенов и существенно повышает чувствительность рецептора к кортизолу и кортизону, связывание AR с которыми инициирует рост злокачественных клеток простаты. Данный мутант также способен активироваться прогестероном и эстрогеном. Однако, лишь одной мутации Т877А недостаточно, чтобы AR обрёл способность активироваться кортизолом. Исследование полученной кристаллической структуры L701H/T877A в комплексе с 9афлюорокортизолом (PDB: 1GS4) показало, что пространственная укладка данного мутантного комплекса в целом совпадает с укладками полученных ранее комплексов AR с агонистами [43]. Основные отличия наблюдаются в картине сетке водородных связей образуются Н-связи между с D-кольцом 9α-флюорокортизола и остатками рецептора А877, H701 и S778 [43]. В частности, водородная связь между S778 и H701 ориентирует имидазольное кольцо гистидина таким образом, что Н701 обретает способность образовать H-связь с гидроксильной группой D-кольца, в то же время A877 вступает с Dкольцом в ван-дер-Ваальсовы контакты (рис. 6). В WT-рецепторе же T877 мешал бы связыванию 9α-флюорокортизола, а гидрофобный L701 не смог бы быть вовлечённым в формирование благоприятной для связывания сети Н-связей [43].



Рисунок 6. Структура двойного мутанта AR L701H/T877A в комплексе с 9αфлюорокортизолом [4].

Мутация V730М

Мутация V730М наблюдается на поздних стадиях карциномы простаты и способствует усилению активации AR андрогенами [44]. Анализ кристаллических структур WT-AR показал, что мотивы LxxLL, характерные для других коактиваторов NR не могут образовать H-связь с остатком E897 спирали H12, а также вступают в меньшее количество гидрофобных контактов в сайте AF2 в сравнении с мотивами FxxLF. В WTрецепторе V730 располагается у сайта связывания коактиваторов и вместе с M734 и I737 образует гидрофобную бороздку, способствующую связыванию FxxLF-мотивов [4]. Мутация V730M изменяет геометрию бороздки таким образом, что повышается аффинность к LxxLL при сохранении аффинности к FxxLF (рис. 7). Это способствует рекрутингу таких коактиваторов, как SRC, характерных для поздних стадий рака простаты.



Рисунок 7. Наложение структур AR в комплексе с пептидами, содержащими мотив FxxLF (PDB: 1XOW) и мотив LxxLL (PDB: 1T7F). Остаток V730 заменён на M730. [4]

Мутация W741L

Одним из наиболее распространённых методов лечения рака простаты является введение пациенту антиандрогеновых препаратов. Однако, антиандрогены первого поколения, такие как бикалутамид, флутамид или нилутамид, со временем начинают действовать как агонисты AR в клетках линии LNCaP. В этой линии были обнаружены мутации AR W741L и W741C, ответственные за способность рецептора распознавать бикалутамид (BIC) в качестве агониста [3]. Структурные исследование комплекса AR-W741L с бикалутамидом показали, что BIC при связывании с данным мутантом обретает особую «изогнутую» конформацию [45]. Подобная пространственная ориентация бикалутамида способствует образованию оптимальных гидрофобных контактов между лигандом и рецептором, также существенный вклад в связывание вносят и H-связи, образующиеся в двух областях (рис. 8). Циано группа A-кольца BIC образует H-связи с

остатками Q711 и R752, подобно гидроксильной группе А-кольца DHT или R1881. Дополнительная водородная связь наблюдается между амидным азотом и хиральной OHгруппой BIC и остатками L704 и N705. В отличие от стероидов, остаток T877 не участвует в образовании H-связи с BIC. При мутации W741L замена массивной боковой цепи триптофана на более компактную цепь лейцина увеличивает свободное пространство в лиганд-связывающем кармане, что позволяет расположиться в нём B-кольцу BIC и принять AR агонистическую конформацию. Таким образом, в данном мутанте связывание BIC не приводит к смещению спирали H12 и способствует образованию функционального сайта AF2 [45].



Рисунок 8. Структура AR в комплексе с бикалутамидом. Остатки Q711, R752, L704 образуют Н-связи с BIC. Дополнительно с L741 показан и WT-W741, чтобы показать возможные пространственные пересечения W741 и В-кольца BIC[4].

Мутация F876L

Одним из новейших антиандрогеновых препаратов является энзалутамид. Он показал высокую эффективность в снижении количества PSA в плазме крови у пациентов, однако, его лечебный эффект зачастую является кратковременным. Причиной исчезновения эффективности энзалутамида является появления в AR мутации F876L, которая приводит к тому, что энзалутамид начинает действовать как агонист, а его сродство к рецептору возрастает в 6 раз в сравнении с WT [5]. Для понимания эффектов, оказываемых мутацией F876L Balbas et al. провели исследование в котором заменили F876 на более массивный тирозин, а также на схожий алифатический изолейцин. Лишь мутация F876I позволила энзалутамиду действовать, как агонист, как и в случае с F876L [5], что

указывает на то, что данный эффект является следствием изменения геометрии лигандсвязывающего кармана.

1.3 Андрогеновый рецептор как мишень для разработки новых противоопухолевых препаратов

Андрогеновый рецептор, в виду своей ключевой роли в развитии рака простаты, является одной из основных мишеней при разработке лекарственных молекул для лечения этого заболевания. В виду модульной структуры рецептора, конечными мишенями могут являться различные его домены. Наличие кристаллических структур DBD и LBD позволяет производить поиск подходящих молекул методами молекулярного моделирования, виртуального скрининга и фармакофорного поиска.

1.3.1 N-концевой домен как мишень для противоопухолевых препаратов

NTD, в виду отсутствия у него чёткой трёхмерной структуры, является нетривиальной мишенью. Тем не менее ведутся работы и в направлении поиска его антагонистов. Так одним из предложенных подходов является сверхэкспрессия пептидов AR-NTD, которые будут служить в качестве молекул-ловушек, связывающих белки, которые необходимы для активации эндогенного AR полной длины [46]. Было показано, что экспрессия подобных молекул-ловушек *in vivo* способствовала десятикратному снижению уровня PSA в сыворотке крови и четырёхкратному уменьшению объёмов опухоли [46].

Также найдена молекула **EPI-001**, которая взаимодействует с сайтом AF1 на NTD, нарушая взаимодействие рецептора с корегуляторами и ARE-участками ДНК, и является эффективной даже в случае CRPC [47]. К тому же данная молекула показала высокую специфичность к AR и оказывала слабое влияние на другие ядерные рецепторы. Было показано, что **EPI-001** и его аналог **EPI-002** ковалентно связываются с NTD AR [47]. Однако данные молекулы могут быть недостаточно эффективны против AR дикого типа.

1.3.2 ДНК-связывающий домен как мишень для противоопухолевых препаратов

ДНК-связывающий домен также является мишенью для разработки препаратов против рака простаты. Например, известен синтетический пиррол-имидазольный полиамид, который связывает элементы ARE на ДНК, что приводит к невозможности связывания с ними AR [48]. Данное соединение способствуют снижению экспрессии PSA. Также были разработаны и циклические пиррол-имидазольные полиамиды, которые, подобно линейным, нацелены на последовательность ДНК 5'-WGWWCW-3', т.е. на элементы ARE. Эксперименты показали, что подобные циклические полиамиды с высоким сродством связываются с элементами ARE и служат эффективными ингибиторами связывания AR-DBD с ДНК [49]. Однако, подход нацеленный на изменение конформации целевых участков ДНК имеет ограниченную применимость. Связано это с тем, каждый такой полиамид нацелен лишь на часть AR-зависимых генов [4]. Для того чтобы преодолеть это ограничение в качестве мишени следует выбирать не ДНК, а ДНК-связывающий рецептора. непосредственно домен Так был произведён высокопроизводительный скрининг ~160 000 соединений против DBD-AR, по итогам которого было найдено соединение, способное ингибировать связывание AR и ДНК [50].

Основной сложность с разработкой антагонистов, нацеленных на DBD является то, что DBD высокогомологичны среди всего семейства ядерных рецепторов и, как следствие, такие антагонисты будут обладать низкой специфичностью, что неизбежно приведёт к наличию множества побочных эффектов.

1.3.3 Лиганд-связывающий домен как мишень для противоопухолевых препаратов

Самой популярной мишенью в андрогеновом рецепторе для леченья рака простаты остаётся лиганд-связывающий домен. В составе LBD находятся сразу три пригодных для разработки лекарственных молекул сайта: это поверхностные регуляторные сайты AF2 и BF3, а также лиганд-связывающий карман (LBP).

AF2 является сайтом рекрутинга коактиваторов, а также местом, через которое осуществляется взаимодействие N- и C-концов рецептора. Таким образом, заблокировав этот сайт можно нарушить процессы, необходимые для активации AR. AF-2 связывает пептиды, содержащие мотивы LXXLL и FXXLF. Ряд исследований показал, что такие пептиды способны не просто связываться с AR, но и блокировать *in vitro* взаимодействие AR с коактиваторами, несущими мотив L/FXXLL/F [51]. Пептиды могут быть полезны при разработке новых лекарственных молекул для выявления ключевых взаимодействий между белками и построения фармакофорных моделей. Однако использование пептидов в качестве фармакологических агентов обычно весьма затруднено в виду их быстрой метаболической деградации, низкой биодоступности и плохой проницаемости для клеточных мембран. Поэтому подходом популярным, как при разработке ингибиторов

белок-белковых взаимодействий вообще, так и антагонистов AF2 в частности является применение т.н. пептидомиметиков — низкомолекулярных соединений, способных имитировать вторичную структуру пептида и пространственное положение ключевых функциональных групп. Так для AF2 используются пептидомиметики, имитирующие αспираль с мотивом FXXLLF[51]. Например, Gunther et al. для разработки пептидомиметика для AR-AF2 использовали 2,4,6-тризамещенный пиримидин [52]. Этот скелет был использован ранее, как аналог связывающего ER мотива LXXLL, для имитации боковых цепей лейцина в качестве заместителей на скелете были использованы алкильные группы [53]. Для оптимизации же взаимодействия с AR-AF2 к пиридиновому ядру были добавлены нафтильные и фенильные группы, призванные имитировать боковые цепи фенилаланина и триптофана, через которые коактиваторы AR вступают во взаимодействие с AF2. Полученные таким способом соединения показали способность ингибировать активность AR не путём замещения дигидротестотерона в LBP, более того, часть из этих соединений оказалась активна в клетках линии LNCaP [51].

Другим подходом при разработке малых молекул-ингибиторов AF2 является комбинация методов конструирования лекарств на основе структуры (SBDD от англ. Structure Based Drug Design), виртуального скрининга и фармакофорного поиска. Так Caboni et al. на основе семи кристаллических структур LBD-AR в комплексе с коактиваторными пептидами удалось построить фармакофорные модели, учитывающие ключевые взаимодействия пептидов с AF2, среди которых взаимодействие с заряженными остатками К720 и Е897, а также наличие у пептидов ароматических остатков фенилаланина, придающих им специфичность по отношению к AR. Полученные фармакофорные модели были использованы для виртуального скрининга по семи базам данных вендеров химических соединений: Amsterdam, Peakdale46, Asinex47 Platinum collection, Specs48, Maybridge49 и ZINC. Соединения, соответствовавшие критериям фармакофорной модели, были затем отдокированы в AF2-AR [54]. В итоге авторами было отобрано четыре молекулы для экспериментальной проверки, одна из которых обладала низкой токсичностью и была способна подавлять экспрессию PSA. Аналогичный подход использовали Liu et al. [55], однако, для создания фармакофорной модели они использовали не комплексы AR с коаквтиваторными пептидами, а комплексы AR с известными антагноистами AF2. По итогам виртуального скрининга авторами были отобраны 12 соединений, одно из которых в ходе экспериментальных проверок показало активность против AR, как мутантного, так и дикого типов, при этом соединение связывалось непосредственно с AF2.

Другим сайтом белок-белковых взаимодействий на поверхности AR-LBD является BF3. BF3 прилегает непосредственно к AF2, образован спиралями H1, H3-H5 и H9 и является сайтом рекрутинга коактиваторов FKBP52 и Bag-1L [51]. Впервые Estébanez-Perpiñá et al. показали, что флуфенамовая кислота, трийодотиронин и трийодтиронин уксусная кислота способны связываться с BF3 и препятствовать взаимодействию AR с коактиваторами [41]. Кристаллические структуры этих соединений в комплексе с AR-LBD показали, что эти молекулы занимают, как сайт BF3, так и сайт AF2 и, следовательно, являются смешанными антагонистами AF2/BF3 [51].

Истинные селективные антагонисты AR-BF3 удалось обнаружить Cherkasov et al. в ходе исследования, совмещающего виртуальный скрининг, экспериментальную проверку и оптимизацию наиболее эффективных соединений путём изучения свойств структураактивность [54,56]. Авторами был произведён виртуальный скрининг базы данных ZINC по итогам которого было отобрано 213 соединений, чья активность была оценена на клеточных линиях. Всего было найден четыре соединения с субмикромолярной активностью, не обладавших при этом выраженной цитотоксичностью. Связывание этих соединений с AR было изучено методом рентгеноструктурного анализа, по итогам которого удалось показать, что соединения связываются непосредственно с сайтом BF3.

1.3.4 Антагонисты лиганд-связывающего кармана андрогенового рецептора

Несмотря на наличие в AR множества сайтов, пригодных для разработки лекарственных молекул, в клинической практике на данный момент применяются лишь антагонисты лиганд-связывающего кармана, которые при связывании конкурируют с природными лигандами AR: тестостероном и дигидротестостероном [57]. Высоко аффинные антагонисты LBP образуют H-связи с остатками T877, N705, Q711, и R752, и вступают с рецептором в многочисленные гидрофобные взаимодействия. По химической структуре антагонисты LBP-AR можно разделить на два больших класса: стероидные и нестероидные. Главным недостатком стероидных антиандрогенов является широкий спектр побочных эффектов, обусловленный их структурным сходством с другими стероидными молекулами. Типичными препаратами этого класса являются: ципротерона ацетат, оксендолон и сприронолактон (рис. 9) [4]. Другим перспективным антагонистом AR является **ТОК-001**, известный под тривиальным названием галетерон. Уникальность галетерона заключается в том, что он обладает тройным механизмом действия: является антагонистом LBP-AR, способствует деградации AR и ингибирует СYP17A1 [58]. Следует

отметить, что некоторые из стероидных антагонистов LBP-AR имеются массивный заместитель при C17-атоме стероидного ядра.



Рисунок 9. Стероидные антиандрогены.

К нестероидным антагонистам AR относятся такие производные толуидида, как флутамид, бикалутамид, нилутамид (рис. 10) [4]. К достоинствам этих препаратов можно отнести наличие антиандрогенных свойств при отсутствии нежелательных андрогенных, а к недостаткам более низкую в сравнении со стероидными препаратами аффинность по отношению к AR [59].



Рисунок 10. Нестероидные антиандрогены.

1.4 Молекулярное моделирование взаимодействия антиандрогенов с лигандсвязывающим карманом AR

Для AR дикого типа были детально описаны механизмы связывания и действия агонистов, в то время, как для антагонистов имеются лишь кристаллические структуры их комплексов с мутантными AR, в которых они вызывают агонистический ответ. Однако, имеются данные по действию антагонистов на другие ядерные рецепторы, например, ER с 4-гидроксилтамоксифеном (4-OHT) [60], RU-486 с GR [61], GW6471 с PRAP-α [62]. После

изучения этих структур, стало известно, что спираль H12 смещается с сайта связывания коактиваторов, что препятствует их рекрутингу (рис. 11). В случае ER структура 4-OHT не позволяет молекуле полностью разместиться в лиганд-связывающем кармане LBP и один из массивных заместителей 4-OHT оказывается обращённым в сторону спирали H12, что не позволяет ей занять позицию, необходимую для взаимодействия с коактиваторами [4]. Аналогичный механизм наблюдается и в случае с PRAP-α: связывание антагониста GW6471 вызывает смещение петли H12 к петле H3, что нарушает геометрию сайта связывания коактиваторов и блокирует его. Также подобное смещение H12 приводит к рекрутингу корепрессоров [62].



Рисунок 11. Спираль H12 ядерных рецепторов является высоко подвижной и способна принимать различные конформации. При связывании агониста она удерживается у спиралей H3, H4 и H11, участвуя в образовании сайта связывания коактиваторов AF2. При связывании антагониста H12 смещается таким образом, что блокирует сайт AF2. [4]

Однако для AR, в виду отсутствия для него кристаллических комплексов белков дикого типа с антагонистами, до сих пор остаётся не до конца ясным вопрос о механизмах антагонистического воздействия антиандрогенов. Предполагается, что оно схоже с действием антагонистов на другие ядерные рецепторы: т.е. связывание антагонистов препятствует нормальному размещению спирали H12, вызывает её смещение и искажение сайта AF2.

В отсутствии экспериментальных структурных данных, описывающих механизмы действия антагонистов LBP-AR, особо важную роль играют методы молекулярного

моделирования. Ряд исследований с использованием метода молекулярной динамики (МД) комплексов AR с антиандрогенами, такими как бикалутамид, подтверждают эту теорию.

В одной из работ [63] было проведено МД-исследование комплекса AR с бикалутамидом, помещённым в лиганд-связывающий карман LBD. Авторы произвели пространственное выравнивание исходного комплекса AR с DHT и комплекса AR с бикалутамидом, полученного в ходе МД, и пришли к выводу, что искажения геометрии затрагивают не только лиганд-связывающий карман, но и весь лиганд-связывающий домен [63]. Особенно заметны искажения спиралей H3, H4 и H12, образующих AF2, наибольшему же смещению подвергается спираль H12. Однако, как и в других ранних работах, короткая длина траектории MД (5,3 нс) не позволяет выявить крупномасштабных изменений конформации рецептора.

Следует отметить целый ряд более поздних работ, в которых подробно изучены механизмы взаимодействия применяемых в клинической практике антиандрогенов с мутантными и дикими формами AR методами молекулярной динамики [64–73].

Так, в работе [64] на траектории в 45 нс подробно изучили взаимодействие Rбикалутамидап (R-BIC) и синтетического андрогена S1, как с WT-AR, так и с мутантом W741L. Удалось установить ключевую роль остатка M895 в переходе AR из антагонистической конформации в агонистическую. В комплексе бикалутамида с рецептором дикого типа массивный W741 ориентирует бикалутамид таким образом, что тот вступает в контакт с M895 и отталкивает его, что в свою очередь, приводит спираль H12 в антагонистическую конформацию. В мутанте же W741L остаток M895 показывает увеличение энергии взаимодействия с бикалутамидом. M895 поворачивается сторону L741, что уменьшает расстояние между M895 и бикалутамидом. Это, в свою очередь, усиливает взаимодействие между бикалутамидом и M895 и стабилизирует положение H12 в агонистической конформации.

В другой работе Liu et al. изучили взаимодействие бикалутамида с другими мутантными формами AR (W741C, W741C/T877A, T877A, F876L, F876L/T877A, L701H) на траектории в 60 нс [65]. Механизм, благодаря которому бикалутамид становится агонистом мутантов W741C и W741C/T877A аналогичен таковому для мутанта W741L: при замене массивного W741 на компактный цистеин В-кольцо бикалутамида сдвигается в сторону C741, что увеличивает пространство между бикалутамидом и H12, что позволяет H12 плотнее «прижаться» к рецептору. В то же время, мутации, расположенные вдали от В-кольца бикалутамида, не способны превратить его из антагониста в агонист.

Далее Liu et al. [66] исследовали механизм возникновения резистентности к гидроксифлутамиду (HF) в мутантах F876L/T877A, W741C/T877A и Т877A на траектории в 60 нс. Исследователям удалось установить, что гидроксифдутамид обладает большим сродством к мутанту Т877А в сравнении с WT-рецептором, но меньшим к мутантам F876L/T877A и W741C/T877A. Также в комплексах гидроксифлутамида с T877A, F876L/T877А и W741C/T877А больший вклад в связывание лиганда вносит остаток M895 в сравнении, как с WT-рецептором, так и с мутантами W741С и F876L, по отношению к которым гидроксифлутамид сохраняет антагонистические свойства. Расстояние между М895 и НF заметно меньше в комплексах Т877А, F876L/T877А и W741C/T877А по сравнению с WT и с мутантами W741C и F876L. Это свидетельствует о том, что M895 вместе со спиралью H12 находится ближе к LBP, что способствует образованию функционального сайта AF2. В системах, где T877 не заменён на аланин в начале динамики гидроксифлутамид образует H-связь с N705, однако, в ходе динамики гидроксил НF поворачивается в сторону T877 и образует с ним стабильную H-связь. В системах же, где содержится мутация T877A положение гидроксила HF остаётся неизменным, т.е. он остаётся ориентированным в сторону N705.

Описанные выше работы, хотя и помогли пролить свет на то, каким образом определённые мутации AR способствуют превращению антагонистов в агонисты, однако не позволили наблюдать заметных конформационных изменений в области спирали H12 из-за коротких траекторий динамики в десятки наносекунд,.

В работе [67] на микросекундной траектории Liu Na et al. изучили как различные лиганды влияют на конформацию AR и его взаимодействие с коактиваторами. Исследователям удалось наблюдать заметные конформационные изменения в структуре рецептора, вызванные связыванием с антиандрогенами. Особенно заметны искажения конформации были в области сайта AF2. Так RMSD AF2 антагонистических комплексов составляет около 4Å, а агонистических — 2Å. Также в комплексе с антиандрогенами наблюдалась десприализация H12, изменение ориентации её С-конца и смещение петли между спиралями H3 и H4 относительно экспериментальной структуры. В то же время агонисты стабилизировали спиральную конформацию H12. В ходе моделирования коактиваторы в комплексах с антагонистами начинали терять спиральную структуру и имели тенденцию к покиданию сайта AF2. Также связывание антагонистом ослабляло энергию взаимодействия AR и коактиваторов.

Взаимодействие AR с агонистами и антагонистами на траектории в 1000 нс было изучено Duan et al. [68]. Исследователям не удалось наблюдать каких-либо заметных

конформационных изменений в первые 200 нс динамики, а флуктуации преимущественно затрагивали концевые и петлевые участки. После 200 нс в комплексе с антагонитстами наблюдали заметное изменение структуры спирали H12, значения RMSF её C_{α} -атомов достигали 2Å для N-конца и 3Å для C-конца. Также HFT и BIC уменьшали количество структурированных остатков в H12 с 16, наблюдаемых в агонистических комплексах, до $8\sim10$, что соответствует $1\sim2$ виткам спирали. Авторы предложили механизм, согласно которому антагонисты вызывают деспирализацию H12. В отличие от антагонистов, агонисты вступают во взаимодействие с W741. Это ограничивает подвижность W741 и позволяет контактировать ему с H874. Без этих ограничений H874 поворачивается в сторону H12 и образует H-связь NH-группой имидазола с кислородом основной цепи I899. Эта связь будет конкурировать с H-связью между I899 и V903, что будет дестабилизировать структуру H12 и приводить к её деспирализации. Мутации же по остаткам 877 и 876 могут препятствовать образованию H-связи между H874 и I899 из-за чего H12 сохраняет спиральность.

В работе [69] авторы на траектории в 1000 нс изучили поведение AR в комплексе с агонистами и антагонистами. Авторам удалось установить, что чистые антагонисты не образуют водородных связей с AR, в то время агонисты/антагонисты (бикалутамид, гидроксифлутамид) и чистые агонисты (тестостерон) формируют Н-связи с остатками N705 Также T877. для агонистов/антагонистов оказался И важным вклад электростатических взаимодействий. С использованием random accelerated molecular dynamics (RAMD) авторы смогли идентифицировать три канала, которым по предположительно может происходить выход тестостерона из лиганд-связывающего кармана. По их предположениям первый канал является наиболее вероятным каналом для входа/выхода лигандов.

В работе [70] авторы изучили то, каким образом DHT и HFT оказывают влияние на структуру AF2 и взаимодействие AR с коактиваторным пептидом SRC3. Комплексы с DHT изучались на траектории в 300 нс, а комплексы с HFT на траектории в 500 нс. Пептид SRC3 показал более высокую аффинность к комплексу с агонистом. В то же время связывание AR с SRC3 усилило аффинность рецептора по отношению к DHT, но ослабило к HFT. Связывание HFT вместо DHT изменяет и паттерн взаимодействия SRC3 с остатками AF2, так в комплексе AR с HFT заметно уменьшается вклад остатков L704, W741, M742, M895 и I899 в связывание SRC3.

Ещё одно исследование, проведённое на микросекундной траектории осуществлено группой под руководством Sakkiah [71]. Помимо стандартных процедур вычисления

RMSD, RMSF и анализа конформационных изменений спирали H12 авторы изучили то, каким образом связывание антагониста BIC и синтетического агониста R1881 влияет на распределение электростатического потенциала на поверхности AF2. Авторам удалось установить, что формы поверхности электростатического потенциала весьма схожа у комплексов WT-AR с R1881 и мутанта W741L с BIC, в то же время поверхность электростатического потенциала комплекса WT-AR и BIC заметно отличается от первых двух. Таким образом можно сделать вывод, что форма поверхностей электростатической и антагонистической конформациях AR, что и будет обуславливать различия во взаимодействиях с коактиваторами.

Недостатками исследований, произведённых методами традиционной молекулярной динамики является то, что при моделировании взаимодействия LBP с антагонистами, удавалось наблюдать лишь незначительные смещение спирали Н12 и искажение общей конформации рецептора. В связи с этим Gim et al. [72] методом ускоренной молекулярной динамики (accelerated MD) изучили взаимодействие, как AR дикого типа, так и мутанта F876L с двумя агонистами (дигидротестотерон и RU59063) и тремя антагонистами (бикалутамид, энзалутамид и апалутамид). По результатам исследования удалось установить, ЧТО энзалутамид и апалутамид способны вызывать масштабные конформационные изменения в рецепторе. Так значения RMSD атомов основной цепи достигали 4,5Å, а спираль H12 значительно сместилась относительно исходной позиции, соответствующей агонистической конформации рецептора. Для энзалутамида были изучены две возможные конформации при связывании с AR: при первой Nметилбезамидный фрагмент лиганда был ориентирован в сторону спирали Н11, при второй же конформации этот фрагмент занял пространство между спиралями Н4 и Н12. Описанные выше значительные конформационные изменения AR происходили лишь в том случае, когда энзалутамид связывался во второй конформации. Бикалутамид также оказался способен вызывать конформационные изменения и смещение спирали Н12, однако менее значительные. Изучение же взаимодействия энзалутамида с мутантом F876L показало, что никаких антагонистических изменений в структуре лиганд-связывающего кармана не происходит.

Одной из последних статей, посвящённых моделированию AR является работа Kocak et al. [73]. В работе авторы на траектории в 2000 нс исследуют то, каким образом конформация бикалутамида влияет на подвижность спирали H12, стабильность связанного с AR коактиватора и то, каким образом мутация L01H позволяет AR активироваться

такими глюкокортикоидами, как преднизолон (PRE) и дексаметазон (DEX). Авторы исследовали две конформации BIC, возможные при связывании с AR, открытую и закрытую, и установили, что только закрытая конформация способна вызывать заметные флуктуации спирали H12. При исследовании стабильности коактиватора в различных комплексах авторы установили, что RMSD коактиватора показывает схожее поведение в комплексах WT-AR/DHT, L701H-AR/PRE и L701H-AR/DEX, что согласуется с агонистическим действием преднизолона и дексаметазона на мутант L701H. В то время как комплекс бикалутамида с WT-AR показывает более значительные флуктуации RMSD коактиватора, что свидетельствует о дестабилизации его связывания с рецептором. Изучение влияния мутации L701H на связывание AR с DHT, PRE и DEX показало, что в L701H-AR не наблюдается изменения RMSD для DHT, в сравнении с комплексом дикого типа. В то же время наблюдается заметное уменьшение RMSD при аналогичной мутации для DEX и PRE, что говорит о большей стабильности глюкорктикоидов в мутанте. PRE и DEX образуют H-связь с H701 в мутанте, чем и стабилизируют своё положение в месте связывания. Также эта H-связь наблюдается и для DHT. Таким образом, именно возможность образования H-связи между PRE и DEX и мутантным остатком L701H и служит ключевым фактором, способствующим активации L701H-AR ЭТИМИ глюкокортикоидами.

Описанные выше МД-исследования служат весомым аргументом в пользу гипотезы о том, что антагонисты AR действуют подобно антагонистам других ядерных рецепторов, т.е. путём изменения положения спирали H12 и нарушения геометрии сайта AF2, что приводит к невозможности рекрутировать на него коактиваторы.

1.4 Ферменты семейства цитохром Р450

Цитохромы P450 (СҮР) представляют собой суперсемейство гем-содержащих ферментов, которые обладают монооксигеназной активностью [74]. Эти ферменты в восстановленном состоянии при связывании в активном центре монооксида углерода имеют максимум поглощения света на длине волны в 450 нм, за что и получили своё название. Цитохромы P450 найдены во всех царствах живой природы, где они выполняют разнообразные функции. У млекопитающих эти ферменты сосредоточены в гепатоцитах и других типах клеток, где они окисляют стероиды, жирные кислоты и ксенобиотики. Таким образом эти ферменты играют важную роль по детоксификации и выведению

ксенобиотиков, синтезу и распаду гормонов, синтезу холестерина и метаболизму витамина D.

Классификацию цитохромов Р450 производят с разных позиций. Основная цитохромов осуществляется по классификация схожести ИХ аминокислотных последовательностей. Суперсемейство цитохромов Р450 представлено более чем 13 тысяч генов, относящимся более чем к 400 семействам. Цитохромы Р450 принято обозначать сокращением СҮР, после которого следует цифра, обозначающая семейство СҮР (например, СҮР1, СҮР2, СҮР3) [75]. После цифры следует буква, обозначающая подсемейство (например, СУР1А) и ещё одна цифра, которая представляет индивидуальный ген/изоформу/изофермент (например, СУР11А1). Члены суперсемейства СҮР могут сильно различаться по аминокислотной последовательности, субстратной специфичности, тканевой локализации. Схожесть аминокислотных последовательностей внутри семейства может достигать 40%, в то время как внутри подсемейства гомологичность достигает уже 55%. У человека найдено 57 различных генов и 58 псевдогенов СҮР, относящиеся к 18 различным семействам и 44 подсемействам [75]. Так ферменты из семейств 1-3 (СҮР1А2, 2С9, 2С19, 2D6, 2Е1 и ЗА4) принимают активное участие в метаболизме ксенобиотиков, а остальные семейства несут важные эндогенные функции.

По другой классификации цитохромы P450 можно разделить на два больших класса, один из которых ответственен за метаболизм ксенобиотиков, а другой за биосинтез эндогенных молекул [75]. Ещё одним видом классификации СҮР является деление их на многофункциональные (moonlight proteins) и однофункциональные (non-moonlight proteins) [75]. Многофункциональные белки осуществляют несколько отдельных, как правило несвязанных друг с другом функций. Например, цитохромы, метаболзирующие ксенобиотики – это однофункциональные белки, а цитохромы, синтезирующие гормоны – многофункциональные. Многофункциональные белки выполняют множество различных функций в разных тканях (например, СҮР7В1, СҮР17), либо содержат несколько каталитических сайтов (СҮР170А1) [76]. Например, СҮР7В1 участвует в синтезе гормонов в мозгу, синтезе солей желчных кислот в печени, метаболизме лигандов эстрагенового рецептора в простате, а СҮР170А1 обладает монооксигеназной и терпенсинтазной активностями благодаря наличию двух различных активных центров [77].

Структура цитохромов Р450 характеризуется наличием последовательности FXXGX_bXXCXG, где X_b – это основный остаток [78]. Цистеин в данной

последовательности выступает в качестве аксиального лиганда для гема, связываясь с ним через железо. Именно цистеин-тиолатная форма двухвалентного железа в комплексе с монооксидом углерода и обеспечивает цитохромам P450 характерный максимум поглощения при длине волны в 450 нм [79].

Несмотря на низкую гомологию аминокислотных последовательностей у различных цитохромов P450 (идентичность последовательностей близкородственных цитохромов P450 может приближаться к 100%, в то время как схожесть последовательностей дальнородственных цитохромов P450 может быть около 5%), все цитохромы P450 имеют схожую трехмерную структуру. Структурной основой этих ферментов являются четыре спирали, три из которых параллельны друг другу (D, L, I), а одна антипараллельна (E) (Puc. 12) [80]. Спирали I и L непосредственно контактируют с гемом [81].

Несмотря на схожую пространственную укладку, цитохромы Р450 имеют широкий спектр различных по химической структуре субстратов. Считается, что субстратная специфичность отдельных цитохромов Р450 обусловлена тем как конкретный фермент позиционирует лиганд в активном сайте. Принято считать, что распознавание и связывание субстрата осуществляется шестью сайтами распознавания: область В'-спирали (SRS1), части спиралей F и G (SRS2 и SRS3), часть петли I (SRS4), соединительная β2-область К-петли (SRS6), шпилька β4 (SRS5) (Рис. 13) [78]. Области SRS являются подвижными участками белка, которые смещаются при связывании субстрата и обеспечивают индуцированное соответствие белка лиганду.



Рисунок 12. Общая трёхмерная структура белков семейства цитохром Р450.



Рисунок 13. Пространственное расположение сайтов распознавания субстрата (SRS) в цитохромах P450.

Размеры активных сайтов Р450 значительно различаются. К примеру, в человеческом Р450 2Е1 объём активного сайта составляет ~190 Å³, а в СҮРЗА4 человека - 1385 Å³ или СУР2С8 человека - 1438 Å³ [81]. Размеры активного сайта также связаны с его субстратной специфичностью. Также на специфичность влияет и форма активного центра [81]. Например, протяжённая полость в СҮР2С8 имеет L-образную форму, в то время как активный сайт СҮРЗА4 представляет собой более открытую полость, что и определяет его широкую субстратную специфичность [81]. Форма же активных сайтов цитохромов Р450 1A1, 1A2 и 1B1 благоприятствует связыванию плоских молекул, таких как нафтофлавон и полициклические ароматические углеводороды. Цитохромы Р450 с высокой субстратной специфичностью, например, те, которые окисляют стероиды, имеют остатки, участвующие в образовании водородных и ионных связей с субстратом, которые ориентируют субстрат в активном сайте правильным образом [82]. Например, остатки N202 в СУР17А1 и D309 в СУР19А1 образуют водородные связи с 3-кето группой стероидов.

Важной особенностью цитохромов P450 является подвижность их активных центров. Ранее, на примере комплекса камфорного цитохрома P450 со своим субстратом, было установлено, что активный сайт находится в закрытом состоянии [83]. Закрытой оставалась и структура свободного фермента [81]. Однако удалось наблюдать и открытые структуры свободного от лигандов белка. Также была обнаружена открытая структура у белка, который был одновременно связан с редокс-партнёром путидаредоксином и камфорой в активном сайте [83]. В открытой структуре комплекса с камфорой субстрат закрывал от растворителя сайт связывания кислорода во входном канале и, вероятно,
структура белка оставалась недостаточно закрытой для того, чтобы эффективно метаболизировать камфору. На данный момент принято считать, что цитохромы Р450 переходят из открытой структуры в закрытую, и обратно [81]. Подобная высокая подвижность СҮР имеет важные следствия, которые стоит учитывать при молекулярном моделировании этих ферментов. Во-первых, структура цитохрома Р450 в отсутствии лиганда вряд ли будет пригодна для предсказания комплекса фермента с интересующим лигандом. Во-вторых, даже если разрешена структура комплекса цитохрома Р450 с субстратом, положение последнего не всегда может соответствовать положению лиганда во время катализа. Например, в опубликованных структурах СУР1А1 и СУР1А2 в комплексе с α-нафтофлавоном основной окисляемый атом субстрата расположен на расстоянии около 12 Å от железа гема [84]. Также стоит учитывать, что в виду своей подвижности, структура даже одного и того же цитохрома Р450 может зависеть от того, с каким лигандом он связан. Например, явные структурные различия внутри белка заметны между комплексами СҮРЗА4 с кетоконазолом и эритромицином [85]. Также СҮР2Е1, имея небольшой по размерам активный центр, способен связывать такие крупные лиганды, как жирные кислоты [86].

Кооперативные свойства, как гомотрофные, так и гетеротрофные, наблюдаемые при связывании субстратов с цитохромами P450, известны достаточно давно. Их долгое время пытались объяснить различными гипотезами, например, классическим аллостерическим регулированием, когда аллостерический сайт удалён от активного, либо же возможностью связывания одновременно двух лигандов в непосредственной близости друг от друга [81]. Последняя гипотеза получила подтверждение в 2006 году, когда удалось разрешить структуру СҮРЗА4, в активном центре которого находилось сразу две молекулы кетоконазола [85]. Также по две молекулы субстрата были обнаружены в кристаллических структурах СҮР2С8 [87], СҮР158А2[88], СҮР2D6[89], СҮР21А2[90].

Другой гипотезой, объясняющей кооперативные свойства цитохромов P450, является олигомеризация цитохромов. Известно несколько кристаллических структур олигомеризованных цитохромов P450, в которых молекулы лиганда оказываются связанными между отдельными субъединицами белка [91]. Например, две молекулы пальмитиновой кислоты оказываются связанными в области F–G петель димера СҮР2С8, через которые осуществляется взаимодействие мономеров [87].

1.4.1 Стероидметаболизирующие цитохромы Р450 как мишени для лечения

рака простаты

Стероидметаболизирующие ферменты семейства цитохром Р450 являются одними из основных молекулярных мишеней при лечении некоторых видов злокачественных опухолей. Так при лечении рака молочной железы мишенью может служить СҮР19А1, а при лечении рака простаты — СҮР17А1. Известными ингибиторами СҮР17А1 являются галетерон и абиратерон, последний при этом широко применяется в клинической практике. Механизм действия галетерона и абиратерона на СҮР17А1 обусловлен образованием координационной связи между атомом азота гетероцикла, связанного с атомом С17 стероидного скелета, и атомом железа гема. Известно, что абиратерон и галетерон окисляются в организме ферментом β-гидроксистероиддегидрогеназой (Зβ-HSD) до соответствующих З-кето-Δ4-метаболитов (D4A и D4G) (рис. 14), при этом образовавшиеся метаболиты являются более эффективными ингибиторами СҮР17, чем исходные соединения [9, 10].



Рисунок 14. Превращение абиратерона и галетерона в 3-кето- Δ 4метаболиты.

Поскольку абиратерон, галетерон и их 3-кето-Δ4метаболиты (D4A и D4G) имеют в своей основе стероидное ядро, можно предположить, что указанные соединения будут взаимодействовать и с другими цитохромами P450, вовлечёнными в стероидогенез. Полный путь метаболизма стероидов в организме человека, а также участвующие в нём ферменты представлены на рис. 15.

Цитохром Р450 51А1 (СҮР51А1) или стерол 14α-деметилаза является микросомальным ферментом и катализирует трёхступенчатую реакцию по превращению ланостерола в 4,4-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3βол (рис. 16), при этом для каждой из реакций необходимо по молекуле кислорода и NADPH[92].

После удаления 14α-метильной группы образуются различные стерины. Так у растений и грибов образуются эргостерин и ситостерин, соответственно, а у животных

холестерин. Холестерин у людей и других животных служит предшественником в синтезе желчных кислот, оксистеринов, глюкокортикоидов, минералокортикоидов и половых гормонов. Таким образом, CYP51A1 является одним из ключевых ферментов в биосинтезе половых гормонов. Поскольку рак простаты является гормон-зависимым, CYP51A1 может рассматриваться как перспективная мишень для противоопухолевых соединений.



Рисунок 15. Метаболизм стероидов в организме человека

Было изучено взаимодействие абиратерона, галетерона, D4A и D4G с CYP51A1 при помощи абсорбционной спектроскопии [93]. Все указанные соединения показали способность связываться с ферментом и вызывать спектральные изменения типа І. При этом зависимость разности поглощений CYP51A1 между минимумом и максимумом концентраций абиратерона, D4A и галетерона имела сигмоидный вид, что говорит о

связывания. Наблюдаемая кооперативность кооперативном характере может свидетельствовать о том, что в активном центре СҮР51А1 способно одновременно молекулы указанных соединений. Другим объяснением разместиться по две кооперативности может быть образование олигомерных комплексов фермента. Для D4G связывание имело гиперболический характер, указывало отсутствии что на кооперативности.



Рисунок 16. Реакции, катализируемые СУР51А1.

Цитохром Р450 11А1 (СУР11А1 или **Р450scc)** митохондриальный фермент, катализирующий первую реакцию в процессе стероидогенеза по превращению холестерина в прегненолон в ходе трёхстадийного процесса [94]. Процесс включает две реакции гидроксилирования боковой цепи холестерина, в результате которых получается сначала 22R-гидроксихолестерин, а затем 20α,22R-дигидроксихолестерин. На последнем этапе происходит разрыв связи между атомами C20 и C22, что приводит к образованию прегненолона и изокапронового альдегида (Рис. 17). Для каждого этапа монооксигеназной реакции необходимо по 2 электрона. Первоначальный источник электронов - NADPH. Электроны передаются от NADPH к P450scc через два белка-переносчика электронов: адренодоксинредуктазу и адренодоксин [95]. Все три белка вместе составляют комплекс расщепления боковой цепи холестерина.



Рисунок 17. Реакции, катализируемые СУР11А1.

Прегненолон является предшественником в биосинтезе всех стероидных гормонов, в связи с чем применение ингибиторов CYP11A1 может являться перспективным направлением фармакотерапии рака простаты. Известным ингибитором CYP11A1, который применяется для лечения рака предстательной железы является аминоглутетимид который, однако, способен приводить к нарушению работы печени, почек и щитовидной железы [93].

По данным Масмреха и др. абиратерон при связывании с CYP11A1 способен образовывать с железом гема координационную связь посредством атома пиридинового радикала и тем самым является ингибитором типа II [93]. Галетерон, D4A и D4G не вызывали спектральных изменений CYP11A1. Таким образом, согласно экспериментальным данным галетерон, D4A и D4G не способны связываться с активным центром CYP11A1 и, как следствие, не могут являться его ингибиторами.

Цитохром P450 21A2 (СУР21А2) или стероид-21-гидроксилаза гидроксилирует прогестерон и 17α-гидроксипрогрестерон по 21-му положению с образованием дезоксикортикостерона и дезоксикортизола, соответственно (Рис. 18). Дезоксикортизол, в свою очередь, служит непосредственным предшественником для синтеза кортизола. Как

уже отмечалось выше, AR, несущий двойную мутацию L701H/T877A, обретает способность активироваться кортизолом, что приводит к дальнейшему развитию заболевания даже при подавленном синтезе тестостерона и дигидротестостерона [4]. Таким образом, ингибирование CYP21A2 на поздних стадиях заболевания может остановить его прогрессирование.



Рисунок 18. Реакции, катализируемые СҮР21А2.

В ходе экспериментов по абсорбционной спектроскопии Масмрех и др. установили, что абиратерон и D4A [96] при связывании с СУР21А2 вызывают спектральные изменения типа II, а галетерон и D4G спектральные изменения типа I [97]. Таким образом, можно заключить, что абиратерон и D4A будут являться ингибиторами CYP21A1 и образовывать координационную связь с железом гема фермента, а галетерон и D4G будут являться субстратами СҮР21А2. Однако по результатам масс-спектрометрии с ионизацией распылением в электрическом поле не было вывялено каких-либо продуктов метаболизма этих соединений, опосредованного монокосигеназными реакциями СҮР21А2. Это может свидетельствовать о том, что галетерон и D4G либо не являются субстратами CYP21A2, либо их окисление этим ферментом осуществляется крайне медленно. В то же время было показано, что галетерон проявляет свойства конкурентного ингибитора по отношению к CYP21A2 со значением константы ингибирования (K_i) в 12 ± 3 мкМ. Для D4G подобных ингибиторных свойств по отношению к СУР21А2 наблюдать не удалось. Исходя из полученных данных видно, что абиратерон и D4A являются более сильными ингибиторами СҮР21А2, чем галетерон и D4G. На основании этого можно предположить, что при применении абиратерона в качестве лекарства будут более ярко выражены побочные эффекты, связанные с нарушением синтеза кортикостероидов, чем в случае применения галетерона.

Цитохром Р450 11В1 (СҮР11В1) - стероидная 11β-гидроксилаза или стероид 11βмонооксигеназа является митохондриальным ферментом и обнаруживается в клубочковой и фасцикулярной зонах коры надпочечников [98, 99]. СҮР11В1 синтезирует кортикостерон и кортизол из 11-дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола путём их 11βгидроксилировани (рис. 19) [100]. Как уже отмечалось выше AR, содержащий одновременно две мутации L701H и Т877А, обретает способность активироваться кортизоном и кортизолом и обнаруживается в андроген-независимых линиях клеток рака простаты MDA 2a и 2b. Таким образом, в случае обнаружения подобного мутантного AR у пациента, СҮР11В1 может являться потенциальной молекулярной мишенью для лечения рака простаты.



Рисунок 19. Реакции, катализируемые СҮР11В1

СУР11В2 или альдостеронсинтаза синтезирует альдостерон путём присоединения карбонильного кислорода к С18 метильной группе кортикостерона. Поскольку СУР11В2 является единственным ферментом в организме человека, способным синтезировать альдостерон, он играет важную роль в поддержании баланса электролитов и регуляции [101]. Несмотря абсолютную артериального давления на идентичность по центров, ферменты CYP11B1 аминокислотному составу активных И CYP11B2 демонстрируют разную специфичность по отношению к лигандам. Так Brixius-Anderko et al. изучили взаимодействие противоракового препарата фадрозола, молекула которого существует в виде двух энантиомеров, с СҮР11В1 и СҮР11В2 [102]. Авторы установили, что СУР11В1 связывал S-фадрозол, а СУР11В2 – R-фадрозол. Исследователи отмечают,

что несмотря на идентичность активных центров у обоих ферментов СҮР11В, расположение и ориентация массивных гидрофобных остатков W116, F231, W260, F381, F497 и I488, входящих в состав активного центра, существенно отличаются в расположении и ориентации. Авторы связывают эти различия с изменением в положениях элементов вторичной структуры активного центра, которое, в свою очередь, вызвано различиями в аминокислотном составе белков за пределами активного центра.

Цитохром P450 19A1 (СҮР19A1, ароматаза, эстрогенсинтетаза, строгенсинтаза) – микросомальный фермент, который катализирует превращение андростендиона и тестостерона в эстрон и эстрадиол, соответственно. Субстраты ароматазы подвергаются С19-деметилированию, происходящему в три этапа (Рис. 20). На первом этапе происходит гидроксилирование С19-метильной группы стероидного ядра андрогенов, далее происходит окисление получившейся С19-гидроксильной группы до карбонильной, после чего окисленный фрагмент отщепляется в виде муравьиной кислоты, а А-кольцо становится ароматическим.



Рисунок 20. Реакции, катализируемые СҮР19А1.

Известна роль эстрогенов в развитии некоторых видов рака молочной железы. Но также имеются данные о важной роли эстрогенов в канцерогенезе простаты [103,104]. Воздействие как андрогенов, так и эстрогенов на выращиваемые злокачественные клетки простаты, стимулирует их пролиферацию. Таким образом, СҮР19А1 также может рассматриваться в качестве потенциальной молекулярной мишени для лечения рака простаты.

В ходе экспериментов Масмрех и др. установили, что абиратерон, галетерон и D4G не взаимодействуют с активным центром СҮР19А1 [93]. Однако, D4A вызвал спектральные изменения типа II СҮР19А1, что говорит о том, что азот пиридинового радикала метаболита образует координационную связь с железом гема фермента.

Результаты исследования указывали на возможность связывания сразу двух молекул D4A с активным центром ароматазы. Было показано, что D4A, вероятнее всего, является ингибитором смешанного типа по отношению к СҮР19A1.

Цитохром Р450 ЗА4 (СҮРЗА4) участвует в фазе I метаболизма ксенобиотиков и окисляет около 50% лекарственных молекул [105,106] включая кодеин, циклоспорин, диазепам, эритромицин, а также абиратерон и энзалутамид [107]. Известно, что абиратерон способен выступать в качестве ингибитора СҮРЗА4 . СҮРЗА4 участвует в биоактивации многих соединений, так пролекарства превращаются им в лекарства, а протоксины в токсины. СҮРЗА4 обладает низкой субстратной специфичностью, что может служить источником множества межлекарственных взаимодействий на уровне этого фермента. Низкая субстратная специфичность СҮРЗА4 обеспечивается большим объемом активного центра, что дает ферменту способность связывать более одного лиганда одновременно; известна кристаллическая структура СҮРЗА4 с двумя молекулами кетоконазола в активном центре [85].

Таким образом, ингибирование реакций, осуществляемых СҮРЗА4 может служить источником побочных эффектов. В связи с этим представляет интерес изучение взаимодействия стероидных антиандрогенов, таких как абиратерон и галетерон с активным центром СҮРЗА4.

Масмрех и др. при помощи метода дифференциальной абсорбционной спектроскопии изучили взаимодействие абиратерона, D4A, галетерона и D4G с активным центром CYP3A4 [108]. По итогам экспериментов удалось установить, что абиратерон, D4A и галетерон вызывают спектральные изменения типа II при связывании с CYP3A4, т.е. являются его ингибиторами и образуют координационную связь гетероатомами азота с железом гема фермента. Для D4G спектральных изменений определить не удалось. Также стоит отметить, что для абиратерона и D4A наблюдался кооперативный характер связывания, в то время как для галетерона кооперативности не наблюдалось.

1.5 HSP90 как мишень для разработки новых препаратов против рака простаты

Шаперон HSP90 широко распространён среди всех эукариотических организмов и участвует в протекании ряда фундаментальных процессов: контроль клеточного цикла, гормон-опосредованная передача сигнала и ответ на стресс. В организме человека HSP90 способствует «созреванию» нескольких сотен белков. В клетке HSP90 локализован в цитозоле, ядре и органеллах, например, митохондриях. Цитозольная форма HSP90 существует в двух изоформах: изоформа HSP90а экспрессируется в ответ на стресс,

изоформа Hsp90β экспрессируется конститутивно. Свои специфичные изоформы HSP90 экспрессируются в органеллах.

HSP90 существует в виде гомодимера, каждая субъединица которого состоит из трёх доменов: N-концевого АТФ-связывающего домена, обладающего АТФ-азной активностью, за которым следует заряженный участок переменной длины; среднего домена (M-домена), содержащего сайты связывания для клиентских белков и кошаперонов; C-концевого домена, который участвует в димеризации субъединиц, а также содержит мотив MEEVD, который также необходим для связывания некоторых кошаперонов [109,110].

Димер HSP90 представляет собой динамическую структуру, которая испытывает циклические конформационные изменения при связывании и гидролизе АТФ. В апо-форме димер HSP90 преимущественно представлен в виде открытой V-образной конформации, когда белок димеризован посредством С-концевых доменов. Связывание АТФ инициирует движение N-концевых доменов друг навстречу другу и шаперон занимает первое промежуточное состояние I1. Далее белок принимает закрытое состояние, именуемое промежуточное состояние I2 в которым происходит димеризация N-концевых доменов и их взаимодействие с М-доменами. Гидролиз АТФ происходит именно во время нахождения белка в состоянии I2. После гидролиза АТФ происходит диссоциация Nконцевых доменов, высвобождение АДФ и Рі и возвращение белка в исходную открытую V-образную конформацию. Лимитирующей стадией в ходе этого цикла является гидролиз АТФ, скорость которого является крайне низкой. Так у дрожжей гидролиз одной молекулы АТФ происходит за минуту, гидролиз АТФ в человеческом HSP90 осуществляется за 10 минут [111]. Несмотря на столь значительные конформационные изменения глобальной структуры HSP90, локальные конформации внутри отдельных доменов остаются относительно неизменными [112]. Стоит также отметить, что описанные выше конформации HSP90 наблюдаются и в отсутствие нуклеотидов [109]. Например, как открытые, так и закрытые конформации HSP90 удавалось наблюдать и для апо-форм фермента. Это говорит о том, что подобные конформационные переходы способны происходить спонтанно и самостоятельно, и что между открытыми и закрытыми формами существует динамическое равновесие.

Подобно HSP90 другим белкам. активность регулируется различными посттрансляционными модификациями среди которых фосфорилирование, ацетилирование, нитрозилирование и сумоилирование. Фосфорилирование HSP90 осуществляется преимущественно по остаткам Ser, также возможно и фосфорилирование по Thr и Tyr [113]. Фосфорилирование в целом замедляет прохождение HSP90 через

конформационный цикл, что способствует созреванию клиентских белков и образованию стабильных комплексов с кошаперонами [113]. Аналогично гиперацетилирование HSP90 приводит к невозможности связываться с некоторыми кошаперонами, утрате шаперонной активности и нарушениям в активации глюкокортикоидного рецептора. Sнитрозилирование снижает АТФазную активность HSP90, что препятствует активации синтазы оксида азота [113]. Таким образом, различные посттрансляционные модификации могут значительно влиять на шаперонную активность HSP90.

Также одними из основных регуляторов активности HSP90 являются его кошапероны. Сайты связывания кошаперонов расположены во всех трёх доменах HSP90. Различные кошапероны связываются с HSP90 на различных этапах его конформационного цикла. Одни кошапероны связываются с HSP90 в конкурентной манере, в то время как другие способны связываться одновременно или кооперативно [110]. Некоторые кошапероны являются модуляторами цикла HSP90, оказывая на него как активирующее, так и ингибирующее воздействие. Другие кошапероны выполняют функцию рекрутинга клиентских белков. Таким образом, воздействуя на возможность связывания HSP90 с кошаперонами, можно регулировать его шаперонную активность.

Множество онкогенных белков, таких как суппрессор опухолей р53, онкопротеин SRC. протеинкиназы, теломеразы, ядерные рецепторы гормонов, В частности андрогеновый и эстрогеновый рецепторы, являются клиентскими белками HSP90 [110]. Поскольку опухолевые клетки находятся в стрессовом состоянии, вызванном быстрой пролиферацией и наличием мутантных белков, экспрессия HSP90 в них, как правило, повышена, что дополнительно способствует их выживанию. Имеются данные о том, что повышенный уровень экспрессии HSP90 в опухолевых клетках при раке молочной железы ухудшает прогнозы по выживаемости [114,115]. Мутации могут негативно сказываться на препятствовать корректному стабильности белков И сворачиванию мутантной полипептидной цепи. Шапероны же, способствуя корректному фолдингу мутантных белков, способствуют их накоплению в клетках, что приводит к дальнейшему росту опухоли. В связи с этим раковые клетки являются более чувствительными к ингибиторам HSP90, чем здоровые [115]. Таким образом, HSP90 может служить перспективной молекулярной мишенью при лечении различных онкологических заболеваний.

По этой причине ведётся разработка ингибиторов шаперонной активности HSP90. Так известны ингибиторы АТФзной активности HSP90, которые связываются с нуклетидсвязывающим карманом NTD, среди этих соединений имеются, как природные вещества (ансамицин и гелданамицин), так и синтезированные [115]. Известны вещества с

совершенно иным принципом действия, которые связываются с С-доменом HSP90 и препятствуют рекрутингу кошаперонов.

Ещё одним перспективным направлением разработки средств против рака простаты может стать созданием молекул, препятствующих фосфорилированию HSP90 по определённым остаткам. Известно, что андрогеновый рецептор является клиентским белком HSP90. Шаперон HSP90, взаимодействуя с AR, поддерживает конформацию лиганд-связывающего домена AR, необходимую для связывания андрогенов и их аналогов. При связывании агониста происходят конформационные изменения AR, в результате чего HSP90 и другие шапероны диссоциируют, а AR активируется, транслоцируется в ядро где инициирует экспрессию целевых генов. В 2019 г. Dagar et al. было обнаружено, что для диссоциации комплекса HSP90 и AR и транслокации последнего в ядро необходимо фосфорилирование остатка Thr-90 α-изоформы HSP90 [11]. Таким образом, перспективным направлением в терапии рака простаты может стать разработка низкомолекулярных соединений, связывающихся с HSP90 в области Thr90 И препятствующих его фосфорилированию.

1.6. Методы молекулярного моделирования

Основными вычислительными методами, использованными в данной работе, стали методы молекулярного докинга и молекулярной динамики.

1.6.1. Метод молекулярного докинга

Докинг является методом молекулярного моделирования, который позволяет предсказывать положение двух молекул друг относительно друга при их связывании, а также энергию образования полученных в ходе связывания комплексов. Методом докинга исследуется взаимодействие макромолекулы-мишени, как правило белка, и некоего лиганда, обычно низкомолекулярного соединения. Однако применимость докинга не ограничивается исключительно белками и малыми молекулами. Так мишенями для низкомолекулярных соединений могут служить не только белки, но и ДНК, РНК и липиды. Также при помощи докинга могут исследоваться и взаимодействия двух макромолекул. Существует так называемый белок-белковый докинг, где и мишенью и лигандом являются молекулы белка. Также методами докинга исследуются и взаимодействия полноразмерных молекул белка с небольшими пептидами.

Оценка конформационного пространства всей макромолекулы целиком является вычислительно сложной задачей, в связи с чем в программах докинга применяют

различные приближения. При лиганд-белковом докинге используются три основных уровня аппроксимации [116–119]: 1) полностью жёсткий докинг — когда и белок, и лиганд представлены в виде полностью жёстких тел, вращение невозможно ни вокруг связей белка, ни вокруг связей лиганда; 2) полугибкий докинг — когда лиганд является конформационно подвижным, а белок по-прежнему рассматривается как жёсткое тело; 3) полностью гибкий докинг — когда учитывается конформационная подвижность, как белка, так и лиганда. В полностью гибком докинге, как правило, учитывается конформационная подвижность лишь части белка. При этом положения атомов основной цепи остаются замороженными, а конформационная подвижность боковых цепей моделируется при помощи библиотек ротамеров. Другим способ учёта подвижности белка является использование конформационных ансамблей, полученных из траекторий молекулярной динамики или из экспериментальных ЯМР-данных. В данной работе подвижность сайта связывания белка в ходе докинга учитывалась при помощи библиотеки ротамеров программы Vina Autodock.

Программы докинга используют различные алгоритмы для вычисления положения докириуемых молекул друг относительно друга. Основными алгоритмами являются: метод постепенного конструирования, метод Монте-Карло, метод симулирования отжига, табупоиск, метод сопоставления форм, генетические алгоритмы [116–119]. В генетическом алгоритме (ГА) применяется оператор кроссинговера, который скрещивает две исходные хромосомы (родителей) с получением дочерней хромосомы (потомка). Дочерняя хромосома может оказаться лучше обеих родительских, если унаследует от них лучшие признаки. Помимо операций кроссинговера также применяются и операции мутации. Оценка хромосом происходит на основе качества лиганд-белковых взаимодействий. Если в результате применения операторов мутаций и кроссинговера дочерние хромосомы получаются лучше родительских, то они их заменяют. Таким образом, только лучшие из дочерних хромосом попадут в следующее поколение родительских. Программа Vina Autodock использует модифицированный генетический алгоритм — Ламарковский генетический алгоритм (ЛГА). ЛГА использует два пространства: генотипическое и фенотипическое. В генотипическом пространстве применяются операторы мутации и кроссинговера, а в фенотипическом происходит минимизация энергии системы. Таким образом, в генетическом пространстве при помощи мутаций и кроссинговера изменяются гены, которые порождают новые фенотипы для фенотипического пространства, далее фенотипы подвергаются минимизации энергии, после чего изменённые новые минимизацией фенотипы записываются обратно в гены [116].

Другой важной составляющей программ докинга являются оценочные функции. Если алгоритмы докинга предсказывают конформации рецептора и лиганда в комплексе, то оценочные функции вычисляют свободную энергию образования полученного комплекса. Оценочная функция должна соответствовать двум основным требованиям. С одной стороны, когда нас интересует способ связывания единичной малой молекулы с биологической макромолекулой, оценочная функция должна наиболее высоко оценить «правильную» конформацию рассчитываемого комплекса. С другой стороны, при виртуальном скрининге оценочная функция должна не только успешно определять «правильную» позу лиганда, но и достоверно ранжировать лиганды по аффинности. К настоящему времени существует множество различных классических оценочных функций, которые разделяются на три основные категории [116,120,121]:

1) Оценочные функции, основанные на силовых полях. В этом типе оценочных функции энергия взаимодействия рецептора и лиганда рассчитывается, как энергия взаимодействия отдельных атомов через ван-дер-Ваальсовы и электростатические взаимодействия, энергию деформации валентных углов и валентных связей, энергию изменения двугранных углов. В общем случае энергия взаимодействия здесь рассчитывается через уравнение силового поля, коэффициенты которого получают из экспериментальных данных и *ab initio* квантовых вычислений. Главным недостатком данного типа оценочных функций является то, что они не учитывают эффект растворителя и энтропийный эффект. В результате чего наивысшую оценку получают большие и заряженные лиганды.

2) Эмпирические оценочные функции. Идея, лежащая в основе этого типа оценочных функций, состоит в том, что энергию образования комплекса можно описать в виде индивидуальных, не связанных друг с другом членов. Такими членами могут служить контакты определённого типа между лигандом и белком или изменения поверхности, доступной для растворителя. Коэффициенты для отдельных членов получают путём регрессионного анализа из экспериментально установленных энергий связывания или из рентгеноструктурных данных.

3) Оценочные функции, основанные на знаниях. Этот тип функций основан на структурной информации, полученной из экспериментально установленных структур комплексов. Предполагается, что чем чаще встречается определённый тип взаимодействия между атомами белка и лиганда, тем сильнее это взаимодействие.

Помимо классических оценочных функций, в настоящее время активно развиваются функции, основанные на машинном обучении. Данный тип оценочных функций обладает

высокой эффективностью при виртуальном скрининге. Так одна из таких функций смогла верно идентифицировать 88,6% лигандов [121].

1.6.2. Метод молекулярной динамики

Классическая молекулярная динамика (МД) является одним из основных методов *in silico* изучения биологических макромолекул. Применительно к белкам МД позволяет изучать конформационные изменения белков, стабильность лиганд-белковых комплексов, оценивать аффинность лиганда к белку и исследовать фолдинг. В МД множество конфигураций системы генерируется путём решения классических уравнений движения Ньютона. В результате чего получается траектория, которая описывает изменения во времени положения и скорости частиц, составляющих изучаемую систему.

Траекторию МД получают путём решения дифференциальных уравнений движения, описывающих второй закон Ньютона [122]. Основными элементами молекулярной динамики являются потенциал взаимодействия (или потенциальная энергия) частиц, из которого вычисляются силы, и уравнения движения, определяющие динамику частиц. Математически второй закон Ньютона для каждого атома *i* системы состоящей из *N* атомов записывается следующим образом:

(1.1)

 $F_i = m_i a_i$

где *m_i* масса атома, *a_i* ускорение атома, *F_i* — сила, действующая на атом.

Эквивалентно второй закон Ньютона может быть записан в виде классических уравнений движений Гамильтона [123]:

$$p_{i} = \frac{\partial H}{\partial r_{i}}$$

$$r_{i} = \frac{\partial H}{\partial p_{i}}$$
(1.3)

где p_i и r_i импульс и координаты *i*-го атома, соответственно. *H* — гамильтониан, который определяется, как функция координат и импульса, и выражается следующим образом [123]:

$$H(p_i,r_i) = \sum_{i=1}^{N} \frac{p_i^2}{(2m_i)} + V(r_i)$$
(1.4)

В свою очередь, сила, действующая на атом может быть рассчитана, как производная энергии при изменении положения атома [122]:

$$F_i = m_i a_i = -\nabla_i V = \frac{dE}{dr_i}$$
(1.5)

Зная массы атомов и силы, действующие на них, мы можем рассчитать положение каждого из атомов на очень коротких временных промежутках, порядка фемтосекунд. Скорости могут быть рассчитаны из ускорений:

$$a_i = \frac{dv_i}{dt} \tag{1.6}$$

А положения атомов могут быть получены из скоростей:

$$v_i = \frac{dr_i}{dt} \tag{1.7}$$

Таким образом, зная начальные положения атомов мы можем рассчитать силы и ускорения, действующие на них. В свою очередь, зная силы и ускорения мы можем рассчитать новые координаты атомов. Описанный алгоритм повторяется итеративно на каждом из шагов молекулярной динамики. Расчёты будут тем точнее, чем меньше временной шаг. В большинстве МД-исследований на сегодняшний день длина временного шага составляет 2 фс.

Также для расчётов сил и ускорений из уравнений движения необходимо знать потенциальную энергию системы, которая представляет собой энергию взаимодействия всех атомов системы. Потенциальная энергия рассчитывается при помощи так называемого силового поля. Силовое поле — это уравнения, которые связывают потенциальную энергию системы с её внутренними координатами. В большинстве силовых полей потенциальная энергия разбивается на связанные и несвязанные компоненты и выражается в виде уравнения [124]:

$$E_{tot} = \sum_{i=1}^{N_{CBR3eŭ}} E_{_{CBR3e\breve{u}}} + \sum_{i=1}^{N_{J270B}} E_{_{J270B}} + \sum_{i=1}^{N_{OBY2P}} E_{_{OBY2P}} + \sum_{i=1}^{N_{HC}} E_{_{HC}}$$
(1.8)

где E_{tot} - полная энергия системы, E_{cesset} — энергия колебания валентных связей (1-2 взаимодействия), E_{yenos} — энергия колебания валентных углов (1-3 взаимодействия), E_{desyep} — энергия изменения двугранных углов (1-4 взаимодействия), E_{hc} — энергия несвязанных взаимодействий.

1-2 и 1-3 взаимодействия описываются обычно гармоническим потенциалом, который справедлив только для длин связей и величин углов, близких к равновесным.

Отсюда же следует и невозможность применения классической МД к процессам, происходящим с образованием и разрушением связей. 1-4 взаимодействия описываются потенциалом Фурье. Несвязанные взаимодействия состоят из трёх компонентов: 1) кулоновские или электростатические взаимодействия; 2) ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (vdW); 3) отталкивающие взаимодействия. Электростатические взаимодействия рассчитываются по закону Кулона, vdW и отталкивающие по уравнению потенциала Леннард-Джонса.

Каждый из членов уравнения 1.8 описывается отдельными уравнениями, каждое из которых имеет собственные параметры. Эти параметры индивидуальны для каждого типа атомов и берутся из квантово-химических расчётов и экспериментальных данных.

Также молекулярная динамика позволяет производить вычисления свободной энергии связывания. На сегодняшний день существует множество продвинутых методов вычисления свободной энергии по точности сопоставимых с экспериментом. К числу таких методов относятся [125]: funnel metadynamics [126], umbrella sampling [127], steered MD [128], алхимические методы пертурбации свободной энергии [129]. Однако эти методы требуют значительных вычислительных ресурсов и высокой квалификации исследователя. Поэтому наиболее популярными на сегодняшний день методами вычисления свободной энергии комплексообразования являются методы MM/PBSA (где MM - молекулярная механика, PBSA - площадь поверхности, доступная для растворителя, рассчитанная из распределения Пуассона-Больцмана) и MM/GBSA (где GBSA - площадь поверхности, доступная для растворителя, рассчитанная по методу обобщенного Борна) [130]. В данной работе был применён метод MM/GBSA.

Основная идея метода MM-PBSA/GBSA состоит в том, чтобы по отдельности рассчитать свободную энергию сольватации лиганда, свободную энергию сольватации рецептора, свободную энергию сольватации комплекса, а также энергию взаимодействия рецептора и лиганда в вакууме.

Свободную энергию взаимодействия лиганда и рецептора ΔG_{bind} можно рассчитать по уравнению [131]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} - T^* \Delta S$$
(1.9)

где

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{p}} + \Delta G_{\text{np}} \tag{1.10}$$

$$\Delta E_{\rm MM} = \Delta E_{\rm ele} + \Delta E_{\rm vdW} \tag{1.11}$$

где

 ΔE_{MM} - энергия взаимодействия лиганда и рецептора, рассчитанная на основе молекулярной механики, ΔE_{ele} и ΔE_{vdW} вклад энергии полярных и неполярных взаимодействий, соответственно. ΔG_{solv} - свободная энергия сольватации, ΔG_p и ΔG_{np} вклад полярных и неполярных взаимодействий в сольватацию, соответственно. -T* ΔS — изменение конформационной энтропии при связывании, рассчитанное при помощи анализа нормальных мод. Зачастую при изучении структурно схожих молекул член -T* ΔS не вычисляется, так как в таком случае предполагается, что его величина будет схожей для разных систем и этим членом можно пренебречь. В таком случае уравнение 2.1 примет вид:

$$\Delta G_{bind}^{0} = E_{MM} + \Delta G_{solv}$$
(1.12)

Стоит отметить, что рассчитанная по формуле 2.4 энергия не является истинной свободной энергией связывания, т.к. не учитывает изменение конформационной энтропии при образовании комплекса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты

2.1.1 Структуры белков

Пространственные структуры белков и их комплексов были получены из банка PDB [132]. В работе использовали структуры: WT-AR в к комплексе тестостероном [133] (PDB ID: 2am9, разрешение: 1,64 Å), W741L-AR в комплексе с бикалутамидом [45](PDB ID: 1z95, разрешение: 1,8 Å), CYP17A1 с абиратероном и галетероном [134] (PDB ID: 3ruk разрешение 2,60 Å и 3swz, разрешение 2,40 Å), CYP51A1 с кетоконазолом [135] (PDB ID: 3ld6, разрешение 2,80 Å), CYP11A1 в комплексе с холестеролом [136] (PDB ID: 3n9y, разрешение 2,10 Å), комплекс CYP21A2 с прогестероном [103] (PDB ID: 4y8w, разрешение 2,64 Å), комплекс CYP11B1 с фадрозолом [102] (PDB ID: 6m7x, разрешение 2,49 Å), комплекс CYP11B2 с деоксикортикостероном [101] (PDB ID: 4dvq, разрешение 2,49 Å), комплексы CYP19A1 со стероидным ингибитором HDDG046 (PDB ID: 4gl7, разрешение 3,90 Å) и с субстратом [137] (PDB ID: 3s79, разрешение 3,90 Å) а также комплекс CYP3A4 с кетоконазолом (2v0m, разрешение 2,80 Å). А также структура HSP 90 в комплексе с ATФ [138] (PDB ID:3t0h, разрешение 1.2Å).

В структуры WT-AR были внесены точечные мутации W741L и T877A, структура 1z95 была ремутирована из 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 при помощи метода градиентного спуска и с зарядами Гастайгера-Хюккеля.

2.2.2 Структуры низкомолекулярных соединений

Структуры соединения **171**, как в кето- (**171К**, ИЮПАК: 17-((5-гидроксиизоксазол-3ил)метил)-андрост-5-ен-3 ,17 -диол), так и в енольной (**171Е**, ИЮПАК: 3,17дигидрокси-андрост-17-ил)метил)изоксазол-5(4Н)-он) формах, соединения **172**, 17-((изоксазол-3-ил)метил)-андрост-5-ен-3,17-диол), а также абиратерона, галетерона, и их 3кето-Δ4-производных (Рис. 21) были построены в молекулярном редакторе пакета SYBYL 8.1. Структуры были подвергнуты дальнейшей минимизации в SYBYL 8.1 при помощи метода градиентного спуска и с зарядами Гастайгера-Хюккеля.





Рисунок 21. Соединения 171 и 172.

2.2. Компьютерные методы

2.2.1. Докинг

Докинг исследуемых соединений осуществлялся в программе Vina Autodock [139] 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 [140].

2.2.2. Молекулярная динамика

Все расчёты молекулярной динамики производились в программном пакете GROMACS-2020 [141]. Для атомов белка были использовано силовое поле AMBER99SB-ILDN [142], атомы лигандов были параметризованы при помощи силового поля GAFF [143]. Использовали растворитель, заданный в явном виде (модель воды TIP3P) и с добавлением ионов 0,150 M NaCl для нейтрализации заряда системы. При построении ячейки для моделирования MД использовали отступ 12 Å от поверхности комплекса до границ бокса.

Для всех комплексов предварительно была проведена минимизации энергии на протяжении 50000 шагов. Минимизированные структуры были подвергнуты сначала уравновешиванию в NVT-ансамбле на протяжении 2,5 нс, а затем в NPT-ансамбле на

траектории в 5 нс с шагом в 2 фс. На этих этапах движения тяжёлых атомов лигандов и белка были ограничены. Далее для всех структур проводились расчёты молекулярной динамики на траектории в 300-1000 нс с шагом в 2 фс. Расчёты проводились при температуре в 310К и давлении в 1 бар. Для поддержания постоянства температуры и давления использовались термостат Берендсена [144] и баростат Парринело-Ранмана [145]. 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, встроенных в GROMACS-2020 и VMD 1.9.1 [146]. Рассчитывались величины RMSD основной цепи белков и значений RMSF для Сα-атомов для оценки степени флуктуации структур белков. Анализ взаимодействий лиганда и белка в ходе МД производился при помощи python-библиотеки ProLIF [147].

2.2.3. Расчет энергии взаимодействия в комплексах

Энергию взаимодействия рассчитывали методом MM-GBSA [147]. Для вычислений использовались кадры, взятые из финальных этапов МД.

2.2.4. Метод главных компонент (РСА)

Метод главных компонент позволяет преобразовать вероятно коррелированные переменные в некоррелированные переменные, называемые главными компонентами. РСА позволяет эффективно изучать коллективные конформационные изменения белковых молекул. В данной работе при помощи РСА было проанализировано распределение конформаций спирали H12 на протяжении всей длины траектории. РСА основан на получении ковариационной матрицы, которая рассчитывается по следующему уравнению:

$$\sigma_{ij} = \langle (\mathbf{x}_i - \langle \mathbf{x}_i \rangle) (\mathbf{x}_j - \langle \mathbf{x}_j \rangle) \rangle$$
(2.1)

где x_i и x_j - координаты i-го и j-го атома, $\langle x_i \rangle$ и $\langle x_j \rangle$ представляет собой усреднение по всем рассмотренным конформациям. В данной работе для построения ковариационной матрицы использовались С_α-атомы спирали H12 андрогенового рецептора. Полученная матрица σ_{ij} является симметричной и может быть диагонализирована для получения собственных векторов (PC1, PC2, . . . PCn) и их собственных значений λ n. Собственные вектора описывают направления независимых движений атомов, а собственные значения силу этих движений. Обычно первые несколько векторов полностью описывают

конформационные изменения в молекуле. В данной работе для анализа использовались первые два собственных вектора PC1 и PC2.

2.2.5. Доля нативных контактов

Понятие доли нативных контактов используется для оценки разницы взаимодействия аминокислотных остатков друг с другом между изучаемой структурой и некой референсной структурой, обычно полученной из рентгеноструктурного анализа или ЯМР. Доля нативных контактов, рассчитанная для целой белковой молекулы обозначается как Q, а для конкретного остатка k, как Q_k . Значение Q_k рассматриваемого кадра S может быть вычислено по формуле [148]:

$$Q_{k}(S) = \frac{1}{N_{k}} \sum_{(k,j)} \frac{1}{1 + \exp\left(\left[\beta \left(r_{ij}(S) - \lambda r_{ij}^{0}\right)\right]\right)}$$
(2.2)

гле r^{0}_{ij} — расстояние между тяжелыми атомами в нативной структуре r_{ij} — расстояние между теми же атомами в кадре *S*, параметр сглаживания β принят равным 5,0 Å⁻¹, а флуктуации контактов учитываются параметром $\lambda = 1,8$, суммирование производится по всем N_k парам k-го остатка. Считается, что остатки находятся в контакте, если в последовательности они отстоят друг от друга более чем на три остатка, а расстояние между их тяжёлыми атомами составляет менее 4,5 Å. Анализ доли нативных контактов производился при помощи собственного скрипта, написанного на Python.

2.2.4. Генерация лигандов de novo

Для генерации молекул *de novo* была использована программа AutoGrow4 [149]. AutoGrow4 стартует с исходной популяции соединений. Эта исходная популяция называется «поколение 0» и состоит из химически разнообразных молекулярных фрагментов. Далее AutoGrow4 создаёт первое поколение, путём применения к элементам исходной популяции трёх операторов: элитизм, мутация и кроссовер. Последующие поколения создаются аналогично из соединений непосредственно предшествующего поколения. Оператор элитизма переносит субпопуляции наиболее приспособленных соединений из одного поколения в другое без изменений. Оператор мутации производит виртуальную химическую реакцию, что приводит к получению изменённого дочернего соединения из родительского. Семьдесят девять из 94 стандартных реакций AutoGrow4 используют два реагента. Один из реагентов берётся из предыдущего поколения, а другой из одной из библиотек молекулярных фрагментов AutoGrow4. Оператор кроссовера объединяет два соединения, взятых из предыдущего поколения в одно новое соединение. Для оценки сродства к белку-мишени, как молекулярных фрагментов, так и соединений, полученных в ходе применения указанных выше операторов, используется молекулярный докинг. По умолчанию в качестве программы для докинга используется программа QVina, а в качестве оценочной функции стандартная оценочная функция Vina AutoDock.

2.2.5. Построение фармакофорных моделей

Для генерации моделей фармакофора использовали веб-сервис PharmaGist [150]. При генерации фармакофора были использованы следующие значения весов для фармакофорных признаков: ароматический – 5,0, анион/катион — 3,0, донор/акцептор Н-связи — 3,0, гидрофобный — 1,0. Для поиска потенциальных лигандов в базе данных ZINC12 [151] использовали веб-сервис ZINCPharmer [152].

2.2.6. Построение сети взаимодействий остатков (RIN)

Для расчетов сети взаимодействий остатков были использованы участки траектории МД 100-300 нс. Из каждой траектории было извлечено по 200 структур с интервалом в 1 нс. Все извлечённые структуры были использованы для построения RIN с помощью программы RING [153]. Все RIN были построены с использованием стандартных значений отсечек для различных типов контактов: солевой мостик - 4,0 Å; S-S связи -2,5 Å; л- л взаимодействия - 6,5 Å; л-катионные - 5,0 Å; Н-связь - 3,5 Å; VDW - 0,5 Å. Каждая из 200 RIN, построенных для каждой из исследуемых структур, была объединена в общую сеть. В процессе объединения все близкие контакты в каждой из 200 структур были собраны в один файл. Для каждого обнаруженного контакта рассчитывалась частота появления, и для дальнейшего анализа использовались только те взаимодействия, которые были обнаружены более чем в 70 RIN. Единая сеть была построена на основе устойчивых контактов, представленных как минимум в 70 из 200 структур. В качестве веса взаимодействия использовалась частота его появления. Все соответствующие пептидные связи были добавлены вручную в виде ребер к графам RIN с весом равным 200. Визуализация и дальнейший анализ RIN выполнялись при помощи программы Cytoscape и подключаемого модуля DyNet [154].

2.3 Оборудование

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

2.4. Экспериментальные методы

2.4.1. Синтез соединений

Синтез производного 3-кето-Δ4-производного галетерона D4G был произведён в лаборатории феромонов AO «Щёлково Агрохим» (зав. лабораторией Стулов Сергей Владимирович). Синтез D4G производился путём окисления галетерона методом Оппенауэра. Регистрация продукта производилась путём масс-спектрометрии. Выход финального продукта составил 40%.

Синтез соединений **171** и **172** был произведён в лаборатории лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии Республики Беларусь (зав. лабораторией Хрипач В. А.).

2.4.2. Определение активности цитохромов Р450

Взаимодействие абиратерона, галетерона, D4A и D4G с CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP21A1 и CYP3A4 осуществлялось методом абсорбционной спектроскопии на приборе Cary 100 Scan UV–Vis ("Agilent", Нидерланды). Измерения производились в калий-фосфатном буфере при pH 7,2-7,4, состав среды, а также концентрации ферментов и лигандов менялись в зависимости от изучаемой системы. Эксперименты проводились к.б.н. Кузиковым Алексеем Владимировичем и к.б.н. Масамрехом Рами Ахмадом в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ (зав. Лабораторией д.б.н. Шумянцева Виктория Васильевна). Наблюдаемые в ходе экспериментов спектральные изменения представлены в Таблице 1.

| Соединение | Цитохром Р450 | | | | | | | | | |
|------------|---------------|------|------|-----------|------|------|--|--|--|--|
| | 51A1 | 11A1 | 21A2 | 11B1/11B2 | 19A1 | 3A4 | | | | |
| ABI | Ι | II | II | н.д. | Отс. | II | | | | |
| D4A | Ι | Отс. | II | н.д. | II | II | | | | |
| GAL | Ι | Отс. | Ι | н.д. | Отс. | II | | | | |
| D4G | Ι | Отс. | Ι | н.д. | Отс. | Отс. | | | | |

Таблица 1. Спектральные изменения, вызываемые абиратероном, галетероном, D4A и D4G при взаимодействии с со стероид-метаблизирующими цитохромами P450.

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

Спектральные изменения типа II говорят о том, что исследуемый лиганд образует координационную связь с железом гема цитохрома P450 и является ингибитором фермента. Спектральные изменения типа I свидетельствуют о том, что лиганд связывается в активном центре цитохрома P450, но может быть, как его субстратом, так и ингибитором. По данным Macaмpex и др. абиратерон является субстратом CYP51A1, ингибирует CYP21A2 и CYP3A4, но не связывается с CYP19A1. D4A является субстратом CYP51A1, ингибитором CYP21A2, CYP19A1 и CYP3A4, но не связывается с CYP11A1. Стоит отметить, что для абиратерона и D4A наблюдалась сигмоидальная зависимость дифференциальных спектров при связывании с CYP51A1 и CYP3A4, что говорит о кооперативном связывании этих лигандов ферментами. Галетерон и D4G оказались субстратами CYP51A1, ингибиторами CYP21A2, но не показали связывания с CYP11A1 и CYP19A1. При этом галетерон оказался ингибитором CYP3A4, а D4G не показал связывания с этим ферментом.

2.3.2. Определение токсичности соединений на клеточных культурах

Токсичность соединений **171** и **172** изучалась к.б.н. Мехтиевым Арифом Раминовичем в лаборатория синтеза физиологически активных соединений ИБМХ (зав. лабораторией к.х.н. Золотцев Владимир Александрович). Токсичность изучалась на клетках линий рака простаты LnCap и PC-3, а также на клетках рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 методом MTT-теста при инкубации в 96 часов. Результаты представлены в Таблице 2.

Как видно из таблицы 2 соединения **171** и **172** проявляют наиболее заметную активность при концентрации в 40 мкМ на клетках линии LnCap, которые содержат андрогеновый рецептор, при этом наиболее активным оказывается соединение **172**. На андроген-независимых клетках линии PC3, а также на клетках рака груди (MCF-7 и MDA-MB-231) соединения **171** и **172** демонстрируют значительно меньшую активность. Это дает нам основания полагать, что мишенью соединений **171** и **172** является андрогеновый рецептор.

| | Клеточная линия | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------|--------|--------|-------|-------|-------|------------|-------|--|--|
| Концентрация , мкМ | 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 | | |

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

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Взаимодействие соединений 171Е, 171К и 172 с андрогеновым рецептором 3.1.1 Общая структура и стабильность комплексов

В работе было исследовано взаимодействие соединения **171** в кето- и енольной форме, и соединения **172**, обладающих общим стероидным скелетом, с нативным лигандсвязывающим доменом андрогеновым 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 **171К** и **171Е**, соответственно.

Комплексы тестостерона и бикалутамида с AR дикого типа были получены из банка PDB. 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. Исследуемые мутации были внесены вручную в рецептор дикого типа. Докинг соединений **171E**, **171K** и **172** осуществлялся, как в WT-AR, так и в полученные мутанты W741L и T877A. Все полученные комплексы послужили стартовыми структурами для расчётов молекулярной динамики длиною в 1000 нс.

Для оценки стабильности комплексов в ходе МД были рассчитаны значения RMSD атомов основной цепи белка (Рис. 22). Видно, что все комплексы выходят на плато и после 800 нс симуляции и наблюдаются лишь незначительные флуктуации RMSD. При этом на финальных этапах динамики значения RMSD лежат 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. 23). Так наибольшей стабильностью обладает тестостерон в комплексе с рецептором дикого типа (TES-WT). В случае же, как с бикалутамидом, так и с исследуемыми соединениями наблюдается 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. Однако заметные флуктуации RMSD лигандов наблюдаются в мутанте Т877А после 800 нс, особенно в случае соединений **171E** и **172,** вероятно в результате замены треонина на аланин в положении 877 лиганды обретают большую подвижность в сайте связывания.



Рисунок 22. Значения RMSD основной цепи LBP-AR в моделируемых комплексах.



Рисунок 23. Значения RMSD лигандов в моделируемых комплексах.

Рисунок 24 демонстрирует, что значения RMSF имеют схожее распределение во всех исследуемых системах, однако значительно более высокими значениями RMSF в сравнении с другими комплексами обладает комплекс 171Е-Т877А в районе остатков 678-684. В остальном же значения RMSF демонстрируют схожее распределение во всех исследуемых системах: наибольшим флуктуациям подвержены петлевые участки (688– 699, 752-762, 771–779, 817–825, 843–855 и 879–892), в то время как спирали обладают большой стабильностью. Заметные флуктуации (≥1Å) флуктуации в ряде комплексов наблюдаются в районе спирали Н12. Более подробно этот участок представлен на рисунке 25.



Рисунок 24. Значения RMSF C_α остатков моделируемых комплексов.



Рисунок 25. Значения RMSF C_α остатков спирали H12 моделируемых комплексов.

Наименышим флуктуациям спираль H12 подвержена в комплексе с агонистом тестостероном. Наиболее же значительные флуктуации H12 в WT-рецепторе вызывает бикалутамид. Из исследуемых соединений наименее выраженная подвижность H12 наблюдалась для комплексов с соединением **171E**, как в WT, так и в мутантах W741L и T877A. Анализ значений RMSF спирали H12 показывает, что все исследуемые соединений (**171E**, **171K** и **172**) способны вызывать заметные её флуктуации (≥1Å), при этом наибольшую подвижность спирали наблюдали для соединений **171K** и **172**, как в рецепторе дикого типа, так и в мутантах W741L и T877A.

Для визуальной оценки конформационных изменений спирали H12 в каждом из комплексов была произведена кластеризации конформаций последних 200 нс МД на основе значений RMSD атомов основной цепи. В качестве репрезентативной конформации выбиралась центральная структура наиболее населённого из кластеров. Суперпозиции репрезентативных конформации каждого из комплексов с кристаллической структурой комплекса WT-AR и тестостерона представлены на рисунке 26. Спираль H12 практически не подвергается смещению и конформационным изменения в комплексе TES-WT. Наиболее заметный сдвиг H12 был в комплексах 171E-WT и 172-WT, в то время как в других комплексах её смещение не столь значительно.



Рисунок 26. Суперпозиция репрезентативных конформаций моделируемых комплексов с кристаллической структурой комплекса тестостерона и WT-AR (PDB ID: 2am9). Спираль H12 выделена более насыщенными цветами.

3.1.2 Оценка степени деспирализации Н12

Как отмечалось выше одним из признаков антагонистического воздействия лиганда на AR-LBP является деспирализация H12. Для оценки того, как хорошо сохраняется спиральная конформация Н12 в ходе динамики была рассчитана вторичная структура этой спирали на протяжении последних 200 нс симуляции с помощью программы DSSP. На рисунке 27 представлено среднее количество остатков, находящихся в спиральной конформации на указанном временном промежутке. Длина спирали H12 В кристаллической структуре составляет 16 остатков. Как видно из рисунка частичной деспирализации Н12 подвергается даже в комплексе агонистом тестостероном при средней её длине в 13 остатков, что свидетельствует об утрате примерно одного витка спирали. Чуть большей деспирализации (~11,6 остатков) Н12 подвергается в комплексе ингибитора бикалутамида с рецептором дикого типа. Соединение **171E** в случае с WT-AR и W741L-AR не вызывает существенной деспирализаци H12 в сравнении с тестостероном, так средняя длина спирали в обоих комплексах остаётся приблизительно равной 12,6 и 13,3 остаткам соответственно. Тем не менее, соединение 171Е оказывается выраженное деспирализующее воздействие на H12 в мутанте T877A, где средняя длина спирали составляет около 7,6 остатков, т.е. Н12 теряет около двух витков. Соединение 171К инициирует выраженную деспирализацию H12, как в WT-AR, так и в мутантах W741L-AR и T877A-WR со средней длиной спирали в 9,1, 7,5 и 8,4 остатков, соответственно.



Рисунок 27. Средняя длина спирали H12 в различных моделируемых комплексах.

Аналогично под воздействием соединения **172** H12 подвергается значительной деспирализации в WT-AR, W741L-AR и T877A-AR со средней длиной спирали в 7,4, 8,5 и 8,6 остатков, соответственно.

Таким образом, можно заключить, что наибольшее деспирализующее воздействие на H12 в WT-рецепторе оказывает соединение **172**, а в мутантах W741L и T877A соединения **171К** и **171E**, соответственно.

3.1.3 Анализ распределения конформаций спирали H12 методом главных компонент

Как отмечалось выше заметным флуктуациям спираль H12 была подвержена во всех системах. Для выявления скоррелированных движений, которые бы могли определять агонистическую/антагонистическую конформацию рецептора, методом главных компонент был проведён анализ движений С_α-атомов для остатков 893-908.

Проекции траекторий каждой из систем на первые два собственных вектора (PC1 и PC2) представлены на рис. 28-31. Видно, что для системы WT-AR (рис. 28A) точки, описывающие конформационное распределение H12 в системе, расположены в компактной области. Поскольку точки, соответствующие начальному и конечному этапам динамики расположены в непосредственной близости друг от друга, это свидетельствует о том, что H12 сохраняет исходную агонистическую конформацию в течении симуляции. Однако удаётся наблюдать медленное движение спирали H12 преимущественно вдоль вектора PC1, при этом H12 незначительно смещается с исходных позиций к концу динамики. В случае с системой BIC-WT (рис. 28Б) для H12 наблюдаются интенсивные движения вдоль вектора PC1. При этом движения имеют колебательный характер и являются более быстрыми, чем в системе TES-WT. Так, спираль H12 подвергается значительному смещению примерно к 700 нс, однако возвращается в исходное положение к концу динамики. По всей видимости, под воздействием бикалутамида, спираль H12 обретает высокую подвижность, что и может объяснять его антагонистическое воздействие.

В системе 171E-WT (рис. 29А) спираль H12 на большой части траектории не подвергается значительному смещению. Однако, на непродолжительное время происходит сдвиг H12 вдоль вектора PC2. Таким образом, можно предположить, что конечная конформация спирали H12 будет близка к агонистической, однако, соединение **171E** всё же способно вызывать конформационные изменения в H12, оказывая на WT-рецептор антагонистическое воздействие в течении непродолжительного времени. В случае с

системами 171E-W741L и 171E-T877A наблюдается быстрое смещение спирали H12 вдоль вектора PC1 (Рис. 29Б и 29В). При этом в исходное положение H12 не возвращается. Это даёт основания полагать, что енольная форма соединения **171** будет являться антагонистом мутантов W741L и T877A.



Рисунок 28. Проекция движений Сα-атомов спирали H12 на два первых собственных вектора PC1 и PC2 для системы: А) TES-WT, Б) BIC-WT.

Соединение **171** в кето-форме способно инициировать конформационные переходы в спирали H12 WT-рецептора. Так H12 обладает значительной подвижностью и совершает быстрые движения вдоль векторов PC1 и PC2 (Рис. 30А). При этом к концу динамики конформация H12 отлична от исходной агонистической. Под воздействием соединения **171К** спираль H12 в W741L-AR совершает быстрое движение вдоль вектора PC1, а её положение на финальных этапах динамики отлично от исходного агонистического (Рис. 30Б). В комплексе 171К-Т877А спираль H12 уже в начале динамики смещается с исходных позиций и совершает интенсивные колебательные движения вдоль вектора PC1 (рис. 30В). При этом **171К** вызывает выраженную деспирализацию H12 во всех трёх комплексах.



Рисунок 29. Проекция движений Сα-атомов спирали H12 на два первых собственных вектора PC1 и PC2 для системы: А) 171E-WT, Б) 171E-W741L, В) 171E-Т877А.

В комплексе 172-WT спираль H12 обретает значительную подвижность, а её конечное положение отлично от исходного агонистического (Рис. 31А). Движения в равной степени сосредоточены вдоль векторов PC1 и PC2. В случае с комплексом 172-W741L также наблюдается быстрое смещение спирали H12 вдоль вектора PC1, при этом конечное положение H12 отличного от исходного (рис. 31Б). Под воздействием соединения **172** спираль H12 в мутанте T877A обретает значительную подвижность, принимая в ходе динамики четыре метастабильных состояния (рис. 31В). Согласно данным PCA соединение **172** вызывает наиболее резкие переходы в положении и конформации H12 для всех форм AR в сравнении с обеими формами соединения **171**. Также соединение **172** вызывает выраженную деспирализацию H12, как в WT-рецепторе, так и в мутантах W741L и T877A.



Рисунок 30. Проекция движений Сα-атомов спирали H12 на два первых собственных вектора PC1 и PC2 для системы: А) 171К-WT, Б) 171К-W741L, В) 171К-Т877А.



Рисунок 31. Проекция движений Сα-атомов спирали H12 на два первых собственных вектора PC1 и PC2 для системы: А) 172-WT, Б) 172-W741L, В) 172-Т877А.

3.1.4 Расчет доли нативных контактов для спирали Н12

Понятие доли нативных контактов (Q) зачастую используется в исследованиях по фолдингу белка. Значение Q характеризует сохранность контактов аминокислотных остатков в рассматриваемой конформации в сравнении с некой референтной конформацией, как правило кристаллической структурой. Значение же Q_k характеризует нативность контактов конкретного остатка в рассматриваемой конформации, тогда как $<Q_k>$ обозначает нативность контактов, усреднённых по нескольким конформация. Параметр $<Q_k>$ позволяет определить то, насколько изменился паттерн контактов остатков в ходе молекулярной динамики. $<Q_k>$ принимает значения от 0 до 1. При $<Q_k> = 1$ остаток к в рассматриваемой структуре сохраняет тот же самый паттерн взаимодействий, что и в референтной кристаллической структуре, а при $<Q_k> = 0$ остаток к полностью утрачивает исходные контакты в ходе симуляции. На рисунке 32 представлена тепловая карта, описывающая долю нативных контактов каждого из остатков спирали H12 для всех из систем.



Рисунок 32. Доля нативных контактов <Qk> для каждого из остатков спирали H12.

Видно, что большинство остатков в агонистическом комплексе TES-WT сохраняют значения <Q_k> близкие к единице, таким образом, в комплексе с тестостерон при динамики не происходят существенные изменения в паттерне контактов спирали H12. Тем не менее, в антагонистическом комплексе BIC-WT лишь остатки 893 и 894 имеют
относительно низкие значения <Q_k> близкие к 0,5, для остальной же части спирали доля нативных контактов остаётся высока. Схожая ситуация наблюдается и для комплекса 171E-WT, где лишь первые два остатка H12 имеют низкие значения <Q_k>. Для комплекса же 171Е-W741L распределение значений <Q_k> H12 сходно с таковым для агонистического комплекса TES-WT. В случае с комплексом 171Е-Т877А N-конец H12 сохраняет высокие значения <Q_k>. Однако остатки 897, 901 и 907 имеют низкие значения <Q_k>, вследствие деспирализации в ходе МД, что объясняет низкую среднюю длину спирали Н12 (7,5 остатков) в этом комплексе и повышенную подвижность спирали. В комплексе 171K-WT нативные контакты в значительной степени теряют лишь первые два остатка Н12, а остальные сохраняют высокие значения <Q_k>. Комплексы 171K-W741L и 171K-T877A имеют схожее распределение значений $\langle Q_k \rangle$ вдоль H12. Наиболее же низким $\langle Q_k \rangle$ в обоих комплексах обладают остатки 897, 901, 907. Аналогично 171Е-Т877А можно предположить, что именно эти остатки подвержены деспирализации в ходе МД. Наиболее же низким значением <Q_k> среди всех систем обладает N-конец спирали H12 в комплексах 172-WT и 172-Т877А. На основании чего можно предположить, что соединение 172 способно вызывать значительный сдвиг и/или деспирализацию N-конца спирали H12 в WT-AR и мутанте Т877А.

Таким образом, на основе данных полученных из анализа деспирализации H12, PCA и расчёта доли нативных контактов можно предположить, что все исследуемые соединения способны дестабилизировать H12, но именно соединение **172** будет вносить наибольшие возмущения в структуру H12, как в рецепторе дикого типа, так и в мутантах W741L и T877A и являться антагонистом различных форм AR.

3.1.5 Паттерны взаимодействия соединений 171E, 171К и 172 с андрогеновым рецептором

Выявление паттернов взаимодействий как известных активных, так и разрабатываемых новых соединений является одним из ключевых этапов конструирования лекарственных соединений. Подобный подход позволяет идентифицировать ключевые аминокислотные остатки, с которыми должно взаимодействовать потенциально активное соединение и выявить механизм действия уже известных активных соединений. В данной работе для выявления ключевых остатков, участвующих в связывании соединений **171E**, **171K** и **172**, а также тестостерона и бикалутамида применялась python-библиотека ProLIF [147]. Для анализа использовались последние 200 нс траекторий каждого из комплексов, а

в качестве значимых выбирались лишь те остатки, взаимодействие с которыми наблюдалось более 30% времени. Результаты данного анализа представлены на рис. 33-35.

Видно. что соединения 171E, 171K, 172, бикалутамид и тестостерон взаимодействуют с WT-рецептором преимущественно за счёт гидрофобных контактов. Стоит отметить, что H-связи с R752 и Q711, которые наблюдаются во всех кристаллических структурах стероидных лигандов с AR, утрачиваются, а наблюдаемые взаимодействия с Q711 носят гидрофобный характер. Подобная утрата Н-связи между стероидными лигандами и R752 наблюдалась ранее в ходе молекулярной динамики в одной из наших работ [155]. Однако соединение 171К образует вместо этого Н-связь с Y763, а соединение **172** формирует одну H-связь с Y763, а вторую с кислородом основной цепи F764. Тем не менее H-связи гидроксила при D-кольце стероидных лигандов и соответствующей ОН-группы бикалутамида сохраняются, однако в случае с TES и BIC Hсвязь формируется боковой цепью N705, а в случае **171E**, **171К** и **172** с гидроксилом T877. В-кольцо бикалутамида вступает в гидрофобные взаимодействия сразу с четырьмя остатками: М895, I898, I899 и V903, принадлежащим спирали H12. Таким образом, данные молекулярной динамики хорошо согласуются с предполагаемым механизмом действия бикалутамида, согласно которому он своим В-кольцом взаимодействует с Н12, чем вызывает её смещение. Из исследуемых соединений лишь соединение 171К вступает во взаимодействие с M895. Таким образом, соединения 171E, 171K и 172 в рецепторе WTтипа не взаимодействуют со спиралью Н12, а значит должны иметь отличный от бикалутамида механизм действия. Все исследуемые соединения имеют стабильные гидрофобные контакты с остатком V880, а также вступают в гидрофобные и л–л стэкинг взаимодействия с фенильным фрагментом F891. Соединения 171E и 172 также взаимодействуют с V889. Остатки V889 и F891 принадлежат петле L11-12. Можно предположить, что вероятное антагонистическое воздействие исследуемых соединений будет осуществляться за счёт взаимодействия с петлей L11-12, что, в свою очередь, приводит к сдвигу и дестабилизации спирали Н12.

В случае с мутантами W741L и T877A (рис. 34 и 35) паттерны взаимодействия исследуемых соединений в целом схожи с паттерном взаимодействий в WT-рецепторе. Однако, стоит отметить ряд различий. Так в мутанте W741L образуется дополнительная H-связь между D890 и гидроксилом изоксазольного фрагмента **171E**, а соединение **171K** перестаёт взаимодействовать с F891, однако вступает в гидрофобные контакты с V887 и S888, которые также принадлежат петле L11-12. В мутанте T877A соединение **171E** образуется описанную выше H-связь с D890. Стоит отметить, что все исследуемые

соединения вступали в дополнительное гидрофобное взаимодействие в P892, чего не наблюдалось ни в WT, ни в W741L-рецепторе. А комплекс 172-T877A оказался единственным из всех исследуемых в котором удалось наблюдать стабильную H-связь с R752.

Таким образом, можно заключить, что соединения **171E**, **171K** и **172** связываются с AR схожими образом, и преимущественно взаимодействуют с одинаковыми остатками. При этом паттерны взаимодействий исследуемых соединений принципиально не отличаются между WT-рецептором и мутантами W741L и T877A. Это даёт основания предполагать, что и воздействие этих соединений на различные формы AR будет схожим и, как следствие, если эти соединения будут являться антагонистами AR, то они окажутся резистентными к указанным мутациям.



Рисунок 33. Паттерны взаимодействия тестостерона (А), бикалутамида (Б), **171E** (В), **171К** (Г) и **172** (Д) с WT-AR.



Рисунок 33. Паттерны взаимодействия тестостерона (А), бикалутамида (Б), 171Е



(В), **171К** (Г) и **172** (Д) с WT-AR.



3.1.6 Расчёт свободных энергий связывания соединений 171E, 171К и 172 и разложение свободных энергий связывания по остаткам

Для расчёта энергий связывания соединений 171E, 171K и 172 как с WT-AR, так и с его мутантными формами, а также TES и BIC использовался метод MM-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 171Е (-35,7 ккал/моль), соединение 171К демонстрирует схожую аффинность (-32,9 ккал/моль), а энергия связывания соединения 172 заметно более низка (-28,6 ккал/моль) и близка к аффинностям TES (-27,8 ккал/моль) и BIC (-25,9 ккал/моль). Для мутанта W741L наиболее аффинным также оказывается соединение 171E (-38,1 ккал/моль), а наименее — 171К (-27,9 ккал/моль), соединение 172 обладает промежуточной аффинностью (-35,7 ккал/моль). В случае с Т877А-АR соединения 171Е, 171К и 172 обладают схожими энергиями связывания в -32,9, -31,5 и -32,9 ккал/моль, соответственно. Стоит отметить, что для всех соединений во всех комплексах наибольший вклад вносят Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (ΔE_{vdW}), а вклад электростатических взаимодействий (ΔE_{ele}) заметно ниже. Это хорошо согласуется с описанными выше данными по паттернам взаимодействий, согласно которым большинство взаимодействий между лигандами и AR являются гидрофобными. Тем не менее, заметно больший вклад электростатики среди исследуемых соединений наблюдается в комплексах 171E-W741L и 171Е-Т877А, это хорошо объясняется тем, что указанное соединение образует дополнительную стабильную Н-связь с остатком D890.

Таким образом, можно заключить, что соединения 171Е, 171К и 172 будут обладать либо схожими, либо более высокими аффиностями к андрогеновому рецептору в сравнении с бикалутамидом и тестостероном, что позволяет предположить их относительно высокую активность.

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

| Комплекс | ΔE_{ele} | ΔE_{vdW} | ΔE_{MM} | ΔG_p | ΔG _{np} | ΔG_{solv} | ΔΗ | -TΔS | 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- | -23.0 | -574 | -80.4 | 26.0 | -7.0 | 19.0 | -614 | 23.4 | -38.0 |
| W741L | 20,0 | 57,4 | 00,4 | 20,0 | 7,0 | 10,0 | 01,7 | 20,1 | 50,0 |
| 171K- | -11.1 | -54.0 | -65.1 | 22.0 | -6.6 | 15.4 | -49.7 | 21.8 | -27.9 |
| W741L | 11,1 | 51,0 | 00,1 | 22,0 | 0,0 | 10,1 | 10,7 | 21,0 | 27,0 |
| 172- | -12.4 | -57.6 | -70.0 | 18 1 | -7.0 | 11.0 | -58 9 | 23.2 | -35.7 |
| W741L | 12,1 | 07,0 | / 0,0 | 10,1 | ,,0 | 11,0 | 50,5 | 20,2 | |
| 171E- | -23.0 | -56.5 | -79.5 | 30.9 | -7.1 | 23.8 | -55.7 | 22.8 | -32.9 |
| T877A | 20,0 | 00,0 | , 0,0 | 50,5 | /,1 | 20,0 | | ,0 | 5-,5 |
| 171K- | -135 | -59.7 | -73.2 | 26.2 | -7 1 | 19.1 | -54 1 | 22.6 | -31.5 |
| T877A | 10,0 | | , 0,2 | 20,2 | ,,, | 10,1 | | -2,0 | 01,0 |
| 172- | -197 | -55.6 | -75.3 | 81 | -69 | 21.2 | -54 1 | 21.2 | -32.9 |
| T877A | 10,7 | 00,0 | , 0,0 | 0,1 | 0,0 | ~ , - | 5-1,1 | 21,2 | 02,0 |

ккал/моль.

Для того чтобы установить какие из остатков лиганд-связывающего кармана LBD вносят наибольший вклад в энергию связывания лигандов, было произведено разложение свободной энергии связывания по остаткам, результаты которого представлены на рисунке 36. В случае с WT-рецептором в связывание всех лигандов наиболее высокий вклад вносят остатки L704, N705, L707, M745, M749, F764, L783, T877. Отличительной чертой соединений **171E**, **171K** и **172** является то, что по сравнению с BIC и TES, остаток W741 вносит в связывание значительно меньший вклад. Также низок вклад W741 в связывание исследуемых соединений и в мутанте T877A, а при замене триптофана на лейцин вклад последнего падает лишь незначительно. Это хорошо согласуется с описанными выше данными по паттернам взаимодействия, где не удалось наблюдать стабильных контактов между остатком W741 и исследуемыми соединениями. Также, в случае с WT-рецептором,

отличительной чертой исследуемых соединений является высокий вклад в их связывание остатков L880 и V889, в то время как для TES и BIC вклад этих остатков невелик. Однако в W741L вклад V889 падает практически до нуля, а в T877A этот остаток не вносит вклада в связывание соединения **172**. Во всех комплексах исследуемых соединений, кроме комплекса 171K-W741L, высокий вклад в связывание вносит остаток F891. Остаток I899, имеющий относительно высокий вклад в связывание бикалутамида, имеет малый вклад в случае с соединениями **171E**, **171K** и **172**, что служит дополнительным подтверждением того, что исследуемые соединения не вступают в прямое взаимодействие со спиралью H12.



Рисунок 36. Разложение свободной энергии связывания лигандов по остаткам

На основе полученных в ходе молекулярной динамики видно, что кето-форма соединения **171** способна вызывать возмущения в структуре H12, как в рецепторе дикого типа, так и в исследуемых мутантах. Во всех комплексах с кето-формой соединения **171** (**171K**) H12 обретает значительную подвижность, смещается с исходных позиций и не возвращается на них даже к концу динамики, подвергаясь при этом значительной деспирализации. Соединение **171E** оказывает слабое действие на рецептор дикого типа. Он не вызывает значимой деспирализации H12 в комплексе 171E-WT, а согласно PCA, агонистическая конформация H12, наблюдается на протяжении большей части траектории

МД. В то же время 171Е может проявлять некоторое антагонистическое воздействие на мутантные формы AR: W741L и T877. Так в комплексах 171E-W741L и 171E-T877A наблюдается быстрое смещение спирали H12 с исходных позиций. Соединение **172** также вызвало возмущения в структуре и положении H12, как у рецептора дикого типа, таки и мутантов. При этом соединение **172** вызывает наиболее резкие переходы между различными положениями и конформациями H12. Также во всех комплексах соединения **172** H12 подверглась значительной деспирализации. Таким образом, можно предположить, что именно соединение **172** будет являться наиболее выраженным антагонистом LBD-AR, при этом оно окажется к резистентным по отношению к распространённым мутациям W741L и T877A, и, таким образом, будет проявлять антагонистическое воздействие и по отношению к указанным мутантам.

3.2 Исследование взаимодействия абиратерона, галетерона и их 3-кето-∆4производных со стероид-метаболизирующими цитохромами Р450

Одним из основных методов лечения рака простаты является подавление синтеза андрогенов. Молекулярной мишенью в данном случае служит фермент цитохром P450 17α-гидроксилаза, 17,20-лиаза (CYP17A1), катализирующий превращение прогестерона и прегненолона в соответствующие 17α-гидроксилированные метаболиты, которые затем метаболизируются до дегидроэпиандростерона и андростерона, соответственно. Последние являются предшественниками для синтеза тестостерона и дигидротестостерона в организме. Абиратерон широко применяется в клинической практике. Другим ингибитором CYP17A1, активно исследуемым в лабораториях и находящийся на клинических стадиях исследований, является галетерон. Эти соединения имеют в своей основе стероидный скелет, поэтому существует вероятность, что они так же способны взаимодействовать с другими цитохромами, вызывая побочные эффекты.

Уже после внедрения абиратерона в клиническую практику было показано, что он, а также галетерон, могут быть окислены в организме 3β-гидроксистероиддегидрогеназой (3β-HSD) до соответствующих 3-кето-Δ4-метаболитов (D4A и D4G) (Puc. 37). Образовавшиеся метаболиты оказались более эффективными ингибиторами CYP17A1. В связи с этим представлялось необходимым детальное изучение D4A и D4G с целью выявления их потенциальных фармакологических эффектов и потенциальных побочных эффектов. Для объяснения экспериментальных данных, полученных в лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ, и для эффективного направленной разработки новых ингибиторов необходимо представлять молекулярные механизмы взаимодействия

лигандов с мишенями. Поэтому было исследовано взаимодействие этих соединений на цитохромы Р450, участвующие в метаболизме стероидов, методом молекулярного докинга.



Рисунок 37. Превращение абиратерона и гелетерона в 3-кето- Δ 4-метаболиты.

3.2.1 Молекулярное моделирование взаимодействия D4A и D4G с СҮР17A1

Поскольку пространственные структуры комплексов цитохрома P450 17A1 с абиратероном и галетероном были известны, был проведен молекулярный докинг только их метаболитов, D4A и D4G в активный центр CYP17A1. Молекулярный докинг этих метаболитов в CYP17A1 позволил установить, что оба соединения могут разместиться в активном центре фермента, при этом атом азота при C17-заместителях был ориентированы в сторону железа гема и расположился на расстоянии 2.4 Å от иона железа (Табл. 4), что позволяет говорить об образовании между этими атомами координационной связи. Таким образом, по данным молекулярного докинга можно заключить, что указанные метаболиты абиратерона и галетерона будут являться ингибиторами типа II для СYP17A1.

Суперпозиционирование отдокированных D4A с абиратероном из его кристаллического комплекса с СҮР17А1, и D4G с галетероном из комплекса с СҮР17А1, показало, что абиратерон, D4A, галетерон и D4G расположились в активном центре СҮР17А1 аналогичным образом (Рис. 38).

Контрольный докинг абиратерона и галетерона в их кристаллические структуры позволил сопоставить величины оценочных функций для этих соединений. Значения оценочной функции составили -11,7 ккал/моль для абиратерона, -11,9 ккал/моль для D4A, - 12,8 ккал/моль для галетерона и -13,9 ккал/моль для D4G. Таким образом, по данным молекулярного докинга, галетерон и D4G имеют большее сродство к СҮР17A1, чем

абиратерон и D4A. Оценочная функция правильно предсказали более высокую аффинность 3-кето-Δ4-производных, чем исходных соединений.

Таблица 4. Взаимодействие абиратерона, галетерона и их производных D4A и D4G с CYP17A1.

| Лиганд | Гидрофобные взаимодействия | Н-связи | Аффинность Vina Autodock (ккал/моль) |
|------------|--|---------|---|
| Абиратерон | A113, F114, L209, A302, E305, T306, V366, I371 | N202 | -11.7 |
| D4A | A113, F114, I205, L209, A302, E305, T306, V366, I371 | N202 | -11.9 |
| Галетерон | A13, F114, I202, I206, L209, A302, E305, V306, A367, V483 | N202 | -12.8 |
| D4G | A113, F114, I202, I206, L209, A302, E305, V306, A367, V483 | N202 | -13.9 |



Рисунок 38. 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.

3.2.2 Исследование взаимодействия абиратерона и D4A с СҮР51А1

СҮР51А1 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 [93]. 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 СҮР51А1 способен одновременно связывать по две молекулы как абиратерона, так и D4A, при этом обе молекулы располагались в одинаковых конформациях и взаимодействовали с одними теми же остатками (Рис. 39). Первая молекула абиратерона или D4A располагалась в активном сайте таким образом, что метильная группа атома C19 оказывалась ближайшей к железу гема. Обе молекулы вступали в гидрофобный контакт с остатками Y131, L134, F139, Y145, F152, A311, I377 (Табл. 5). Докинг не смог выявить возможность образования H-связей между лигандами и белком. Аффинности абиратерона и D4A к CYP51A1, предсказанные оценочной функцией составили -11,1 ккал/моль и -11,7 ккал/моль, соответственно. Вторая молекула абиратерона или D4A расположилась во входе в активный центр фермента. Пиридиновые кольца обеих молекул вступили в π-стэкинг взаимодействия с гетероциклом H236. Предсказанные аффинности вторых молекул абиратерона и D4A составили -7,2 ккал/моль и -7,5 ккал/моль, соответственно.



Рисунок 39. Связывание молекул абиратерона (А) и D4A (Б) с CYP51A1. Белок показан серым, гем изображён пурпурным.

Гидрофобные Аффинность Лиганд π-стэкинг взаимодействия (ккал/моль) Tyr131, Leu134, Phe139, Абиратерон 1 -11,1 Tyr145, Phe152, Ala311, Ile377 Абиратерон 2 Ile75, Leu 240 His236 -7,2 Tyr131, Leu134, Phe139, D4A1 -11,7 Tyr145, Phe152, Ala311, Ile377 D4A 2 Ile75, Leu 240 His236 -7,5

Таблица 5. Взаимодействия между абиратероном или D4A с CYP51A1,

предсказанные молекулярным докингом.

Таким образом, сигмоидальное поведение зависимости спектральных изменений от концентрации лигандов, вероятнее всего обусловлено связыванием двух лигандов в активном центре CYP51A1.

3.2.3 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона и D4A с СҮР11А1

Цитохром P450 11A1 является первым ферментом каскада по синтезу стероидных гормонов (рис. 17).

В случае с СҮР11А1 докинг показал, что пиридиновые кольца, как абиратерона, так и D4A расположились практически параллельно гему, под небольшим углом к его плоскости. Для обоих лигандов расстояние между пиридиновым азотом и гемовым железом составило 2.4 Å. Суперпозиция абиратерона и D4A показала, что стероидные фрагменты обоих лигандов расположены одинаково (Рис. 40). Предсказанные значения аффинности были близки.



Рисунок 40. Суперпозиция абиратерона (зелёный) и D4A (голубой) в активном центре СУР11А1. Гем пурпурный.

Однако спектральные данные для СҮР11А1 показали, что абиратерон даёт спектр типа II, что соответствует образованию координационной связи между пиридиновым азотом абиратерона и железом гема [93]. В случае с D4A же спектральных изменений не наблюдалось. Таким образом, докинг не смог выявить значимых различий в связывании абиратерона и D4A с CYP11A1, что не согласуется с экспериментальными данными. Вероятно, докинг не может различить влияния таких тонких различий как замена гидроксильной группы на карбонильную и изменения геометрии А-кольца. Кроме того, параллельное плоскости гема положение пиридинового цикла представляется маловероятным. Можно предположить, что при связывании происходят конформационные перестройки ряда аминокислотных остатков в районе гема, что позволит этому кольцу Для расположиться перпендикулярно плоскости кофактора. оценки влияния конформационных перестроек в ферменте необходимо задействовать метод молекулярной динамики.

3.3.4 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона, галетерона и их производных с СҮР21А2

СҮР21А2 расположен на ветке синтеза глюко- и минералокортикоидов (рис. 18).

Молекулярный докинг показал, что молекулы абиратерона и D4A могли разместиться в активном центре CYP21A2, при этом азот пиридинового кольца был ориентирован в сторону железа гема. Расстояние между ними было достаточно для образования координационной связи. Основной вклад в связывание вносят гидрофобные взаимодействия с неполярными остатками фермента (Табл. 6), также наблюдается водородная связь между кислородом C3 гидроксильной и кето-группой лиганда и ω-азотом R234 (Рис. 41).

Суперпозиционирование D4A с прогестероном, взятым из кристаллической структуры показало, что оба лиганда связываются схожим образом: образуют множество гидрофобных контактов с белком и образуют водородные связи с R234 (Табл. 4). На основании полученных результатов было сделано заключение, что абиратерон и D4A являются ингибиторами СYP21A2 второго типа.

Докинг галетерона и D4G показал, что оба лиганда оказались ориентированы схожим образом относительно гема CYP21A2 (рис. 42). 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. Такое положение галетерона и D4G предполагает, что они должны быть ингибиторами первого типа.



Рисунок 41. А - Суперпозиция прогестерона (пурпурный - кристалл) и D4A (голубой результат докинга), связанные с СҮР21А2. Б - Суперпозиция абиратерона (голубой) и D4A (зелёный), связанных с СҮР21А2 по предсказаниям молекулярного докинга. Гем фиолетовый. Н-связи обозначены жёлтыми штрихами.

Таблица 6. Взаимодействия между галетероном или D4G с CYP21A2, предсказанные молекулярным докингом.

| | Н-св | ЯЗЬ | Расстояние С-Fe | | | |
|-------------|----------------------|-----|-----------------|---|--|--|
| Лиганд | Остаток Длина (Å) | | (Å) | Гидрофобные взаимодействия | | |
| Галетерон | R234 | 2,9 | 3,9 | V101, V198, L199, W202, V287, T296, V360, L364 | | |
| D4G | R234 | 2,5 | 3,9 | V101, V198, L199, W202, V287, I291, T296, V360, L364 | | |
| Прогестерон | R234 | 2,7 | 4,0 | V101, V198, L199, W202, I291, V360 | | |

Таким образом, проведенное молекулярное моделирование комплексов находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными, которые показали, что абиратерон и D4A являются ингибиторами CYP21A2 второго типа [96], а галетерон и D4G – первого[97].



Рисунок 42. А - Суперпозиция галетерона (голубой) с прогестероном (пурпурный) в активном центре СҮР21А2. Б - Суперпозиция D4A (зелёный) с прогестероном (пурпурный) в активном центре СҮР21А2. Гем фиолетовый, Н-связи обозначены жёлтым пунктиром.

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

Цитохромы P450 11B1 и 11B2 являются высокогомологичными белками. Различия в их структуре составляют всего несколько аминокислотных остатков, расположенных вне активных центров ферментов. Тем не менее, в организме они отвечают за разные функции и проводят разные стереоспецифичные реакции. СҮР11B1 является конечным ферментом в синтезе глюкокортикоидных гормонов, а СҮР11B2 – минералокортикоидных.

Для выявления вероятных поз связывания абиратерона, галетерона, D4A и D4G с CYP11B1 и CYP11B2 мы провели молекулярный докинг указанных соединений в активные центры обоих ферментов. 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. 43). Пиридиновые кольца абиратерона и D4A оказались ориентированы атомом азота в сторону железа гема, при этом расстояния между атомом азота и железом гема составило

2.7Å и 2.5Å соответственно, что может свидетельствовать об образовании между ними координационной связи. Таким образом, можно предполагать, что абиратерон и D4A будут являться ингибиторами CYP11B1 и вызывать при связывании с ним спектральные изменения типа II. Ориентация же бензимидазольных фрагментов галетерона и D4G препятствует образованию ими координационной связи с железом гема. Таким образом, на основании данных докинга можно предполагать, что галетерон и D4G будут являться лигандами типа I по отношению к CYP11B1.

По результатам докинга абиратерона, D4A, галетерона и D4G в CYP11B2 все молекулы показали схожий способ связывания: 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. 44). Подобное расположение отдокированных молекул соответствует субстратной ориентации лиганда. На основе полученных данных можно предположить, что абиратерон, D4A, галетерон и D4G будут являться субстратами CYP11B2 и вызывать в нём спектральные изменения типа I.



Рисунок 43. Расположение отдокированных абиратерона (A), D4A (Б), галетерона (В) и D4G (Γ) в активном центре CYP11B1.



Рисунок 44. Расположение абиратерона (А), D4A (Б), галетерона (В) и D4G (Г) в активном центре CYP11B2.

3.3.6 Молекулярный докинг абиратерона и D4A в активный центр СҮР19А1

СҮР19А1 или ароматаза является ключевым ферментом синтеза эстрогенов.

Для выявления возможности связывания абиратерона и D4A мы провели молекулярный докинг этих соединений в активный центр CYP19A1. Для докинга использовались структуры CYP19A1, как в комплексе с ингибитором (PDB ID: 4gl7), так и в комплексе с субстратом (PDB ID: 3s79). Но докинг не смог выявить достоверных поз связывания для указанных лигандов.

Однако, согласно экспериментальным данным D4A является ингибитором типа II для CYP19A1, при этом наблюдается кооперативное связывание ферментом молекул D4A. В тоже время для абиратерона подобных изменений наблюдать не удалось.

По-видимому, причина того, что докинг не смог выявить поз, соответствующих ингибиторной активности D4A, может быть связана с тем, что используемый в качестве мишени фермент был адаптирован к связыванию стероидного ингибитора с плоским кольцом А. Тогда как в D4A его геометрия отличается от плоского. 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 A стероидного скелета.

3.3.7 Молекулярное моделирование взаимодействия абиратерона с СҮРЗА4

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 СҮРЗА4 способны разместиться молекулы абиратерона. Первая молекула абиратерона сразу две расположилась таким образом, что азот пиридиового цикла оказался в непосредственной близости от железа гема, что позволяет предполагать возможность образования координационной связи между этими атомами и соответствует ингибиторам типа II (Рис. 45а). Гидроксильная группа А-кольца стероидного фрагмента абиратерона образовала водородную связь с ЕЗ74 (Табл. 6) в полярном кармане активного центра. Вторая молекула абиратерона расположилась дальше от гема. Стероидные ядра обеих молекул расположись в антипараллельной ориентации друг относительно друга. Причем положение молекул и паттерны образования водородных связей для обоих молекул были схожи с такими для кетоконазола из кристаллической структуры. (Рис. 45b). Таким образом, положительная кооперативность связывания абиратерона с СУРЗА4, вероятно, может быть объяснена возможностью связывания сразу двух молекул абиратерона в активном центре фермента.



Рисунок 45. Модель комплекса СҮРЗА4 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).

Таблица 5. Взаимодействия между молекулами абиратерона и СҮРЗА4, полученные в ходе молекулярного докинга.

| Лиганд Гидрофобные взаимодействия | | Н-связи | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|--|--|
| Абиратерон 1 | A305, E74, L482 | T309, R372, E374 | | |
| Абиратерон 2 | F57, F108, I120, L211, Phe213, F220 | S119 | | |

Таким образом, как на основе экспериментальных данных, так и на основе данных молекулярного докинга было установлено что 3-кето-∆4-метаболиты абиратерона и галетерона, подобно исходным соединениям, способны связываться с СҮР17А1, одной из ключевых мишеней при терапии рака простаты, и при этом являться его ингибиторами типа II. При этом D4A и D4G проявляют более высокую предсказанную аффинность к ферменту, что согласуется с экспериментальным данными.

По результатам моделирования удалось установить, что абиратерон, галетерон, D4A и D4G взаимодействуют и с другими СҮР, участвующими в стероидогенезе, при этом соединения, в зависимости от мишени и структуры лиганда, могут выступать, как субстратами, так и ингибиторами. Тем не менее, докинг в ряде случаев не смог воспроизвести экспериментальные данные. Вероятно, в подобных случаях для получения достоверных моделей необходимо применение метода молекулярной динамики.

3.3 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 транслокацией рецептора в ядро, необходимо дополнительное фосфорилирование остатка Thr-90 HSP90 [11]. Фосфорилирование осуществляется протеинкиназой PKA 1. Поэтому разработка соединений, способных связываться с HSP90 в области Thr-90 и препятствовать его фосфорилированию может стать новым перспективным направлением в терапии рака простаты.

Остаток Thr-90 расположен в кармане, состоящим из остатков I81, N83, T88, T90, E178, K185, и I187. Данный карман расположен преимущественно на внешнем слое βлиста за исключением остатка E178, который расположен на петле, соединяющих два антипараллельных бета-тяжа. Поверхность бороздки выстлана преимущественно гидрофобными остатками и гидрофобным фрагментами полярных и заряженных остатков. Сами же полярные и заряженные остатки расположены по краям бороздки. Таким

образом, поверхность бороздки преимущественно гидрофобной, является С гидрофильными остатками, расположенными по её краям. Такое пространственное остатков является типичным для интерфейсов белок-белковых расположение взаимодействий. Таким образом, можно предположить, что HSP90 именно через эту область взаимодействует с киназой, может служить мишенью для разработки ингибиторов фосфорилирования Thr-90 HSP90.

Для анализа устойчивости найденного кармана около сайта фосфорилирования HSP90 была проведена моделирование молекулярной динамики N-концевого домена HSP90 в свободном состоянии (PDB ID: 3T0H) и в комплексе с ингибитором гелданамицином (PDB ID: 1YET), находящимся в месте связывания АТФ. Длина траектория симуляции составляла 300 нс.

В процессе молекулярной динамики обе структуры N-концевого домена HSP90 оставались стабильными (Рис. 46). Значения RMSD для комплекса с гелданамицином возрастало до ~3Å в первые 90 нс динамики, после чего выходило на плато. RMSD для свободной формы достигал значения в ~1,4Å и выходил на плато в течении 30 нс. Однако график, описывающий участок траектории после выхода системы на плато, вел себя менее стабильно и показывал большие флуктуации значения RMSD (0,15 Å) по сравнению с лиганд-связанной формы белка (0,1 Å). Более низкие флуктуации значений RMSD у лиганд-связанной формы в сравнении со свободной формой указывают на то, что связывание лиганда способствует стабилизации общей структуры домена.



Рисунок 46. Значения RMSD для свободного (красный) и лиганд-связанной (чёрный) форм HSP90.

Поскольку наблюдали достаточно высокие значения RMSD, которые могли свидетельствовать об изменении в структуре белка, была рассмотрена конформационная стабильность сайта, обнаруженного в районе фосфорилируемого остатка. Для анализа были выбраны наиболее стабильные участки траектории молекулярной динамики в промежутке от 100 до 300 нс. Анализ изменения величин RMSD (Рис. 47) показал, что в обоих формах белка рассматриваемый сайт оставался стабилен. Однако у свободной формы HSP90 карман являлся более подвижным, что отражается в более высоком среднем значении RMSD (~1,54 Å против 1,27 Å) и в наличии большего числа пиков на графике по сравнению с лиганд-связанной формой. Для выявления вклада отдельных остатков в общую подвижность кармана HSP90 были рассчитаны их значения RMSF (Рис. 48). Остатки N83 и T88 в свободной форме оказались заметно более подвижными в сравнении с лиганд-связанной формой. Высокую подвижность для обеих форм в ходе динамики показал остаток E178 (RMSF 2,8-2,9Å). Для этого остатка наблюдали две основные конформации. В первой конформации Е178 образует солевой мостик с другим остатком кармана К185, а во второй - боковая цепь Е178 развёрнута на 180 градусов и обращена в сторону растворителя. Для выявления стабильности солевого мостика между Е178 и К185 были рассчитаны расстояния между центрами масс амино- и карбоксильных групп указанных остатков на участке траектории в 100-300 нс для обеих форм. Было обнаружено, что в лиганд-связанной форме солевой мостик сохраняется более продолжительными периодами, тогда как в свободной форме долгоживущая связь не формируется.



Рисунок 47. Значения RMSD для остатков предполагаемого сайта связывания для свободного (красный) и лиганд-связанных (чёрный) форм HSP90



Рисунок 48. Значения RMSF для остатков предполагаемого сайта связывания для свободной (красный) и лиганд-связанных (чёрный) форм HSP90.

Чтобы выяснить как связывание гелданамицина влияет на обнаруженные различия в конформационной подвижности исследуемого кармана HSP90 между свободной и лигандсвязанной формами была построена сеть взаимодействий остатков (RIN), для остатков, составляющих исследуемый карман, с остатками N51, S52, D54 A55, K58, D93, D95, I96, G97, M98, D102, D106, L107, K112, F138, V150 и T184, непосредственно взаимодействующими с геладнамицином [156] (Рис. 48). Для этого были найдены кратчайшие пути в RIN между указанными выше группами остатков. Для расчетов были использованы участки траектории МД 100-300 нс. Анализ сети показал, что взаимодействие между сайтами отличается для свободной и связанной форм белка. Так в апо-форме в передачу взаимодействия между сайтом связывания лиганда и окрестностью Thr90 вовлечено 3 остатка (L48, I91, V92), не входящих в эти сайты, в то время как для лиганд-связанной формы в передаче взаимодействия участвует уже 10 таких остатков (V148, A141, L188, V186, T149, I151, A161, T152, L103, W162). Таким образом, различается не только количество остатков, участвующих во взаимодействии между сайтами, но и маршруты внутри сети RIN по которым это взаимодействие осуществляется.

Тем не менее, можно заключить, что связывание ингибитора в АТФ-связывающем кармане мало влияет на структуру полости около фосфорилируемого Thr-90 HSP90, поэтому связывание лиганда не должно влиять на процесс фосфорилирования. Поэтому

«классические» ингибиторы HSP90 не могут быть использованы для предотвращения фосфорилирования Thr-90. Это требует разработки специальных ингибиторов, направленных на связывание с карманом, расположенным в непосредственной близости от Thr-90.

При поиске лигандов для новых мишеней в качестве основного критерия для первоначального отбора соединений в основном приходится использовать величины оценочных функций докинга. Однако точность их в настоящее время достаточно низкая, в результате чего значительная часть отобранных соединений при тестировании оказывается неактивной. Повысить эффективность селекции возможно, если мы будем иметь информацию о функциональных группах, которые могут связываться с разными участками в месте связывания.



Рисунок 49. Карта взаимодействий между аминокислотными остатками (RIN). Квадратами обозначены остатки, образующие сайт связывания гелданамицина, шестиугольниками — остатки образующие исследуемую полость, кругами — остатки через которые осуществляется взаимодействие между указанными выше сайтами. Зеленым выделены остатки и взаимодействия уникальные для апо-формы, красным – для лиганд-связанной формы. Поэтому 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 по этим отобранным молекулам строится фармакофорная модель. Эта модель используется для поиска лигандов в базах данных низкомолекулярных веществ. Полученная сфокусированная выборка докируется в место связывания с последующей оценкой эффективности связывания. Такая процедура создания сфокусированной библиотеки лигандов, кроме отбора соединений, имеющих в своем составе группы, которые с высокой вероятностью могут взаимодействовать с местом связывания, позволяет отказаться от докинга больших баз данных, что может существенно сократить временные затраты.

Для конструирования лигандов на основе трёхмерной структуры места связывания была использована программа AutoGrow4 [149].

Областью поиска, в которой осуществлялся *in silico* синтез соединений была выбрана полость на поверхности белка, в которой расположен остаток Thr-90. Область поиска представляла собой параллелепипед размером 20x16x18Å. В качестве исходной популяции для нулевого поколения была использована стандартная библиотека AutoGrow4, состоящая из ~6100 молекулярных фрагментов массой от 100 до 150 Да. В первом поколении операции мутации и кроссовера применялись по 500 раз, во втором и последующих по 2500 раз. Из каждого предыдущего поколения в следующее оператор элитизма отбирал по 500 соединений. Всего было произведено 10 независимых запусков Autogrow4, в каждом из которых было 10 поколений. В ходе первого запуска было сгенерировано 42656 молекул, в ходе второго - 43564, в ходе третьего — 43491, в ходе четвёртого — 42136, в ходе пятого — 42883, в ходе шестого - 42857, в ходе седьмого — 43184, в ходе восьмого — 42295, в ходе девятого — 42578, в ходе десятого — 43474. Таким образом, общее количество сгенерированных молекул составило 429118 штук.

Среднее и медианные значения аффинностей сгенерированных соединений, предсказанные оценочной функцией Vina Autodock, растут до шестого поколения в каждом из запусков, после чего выходят на плато и начинают колебаться в районе -5.3 ккал/моль для медианной и -5.4 ккал/моль для средней аффинностей (Рис. 50А и 50Б). Значения максимальной аффинности в большинстве случаев устойчиво растут вплоть до четвертого-пятого поколений, после чего выходят на плато (Рис. 50В). Таким образом,

можно заключить, что десяти поколений вполне достаточно для генерации соединений, обладающих максимальной предсказанной аффинностью к рассматриваемому белку.

Далее в каждом поколении каждого из запусков отбирались молекулы, обладавшие наибольшими значениями предсказанных аффинностей. Всего было отобрано 2042 молекулы для дальнейшего визуального анализа. Визуальный анализ показал, что значительная часть сгенерированных соединений (~30%) обладала двумя схожими фрагментами: ароматический или циклический алифатический фрагмент, к которому либо непосредственно, либо через один атом прикреплен атом азота. При этом фрагменты эти располагались таким образом, что этот атом азота оказывался в непосредственной близости от остатка Thr-90 и образовывал водородную связь с его гидроксильной группой (Рис. 51). 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



Рисунок 50. Значения предсказанных аффинностей сгененрированных лигандов: **А** - средние, **Б** — медианные, **В** — максимальные.

фармакофора. Далее молекулы 1 и 2 были вручную объединены в молекулу 3 (Рис. 52). После чего молекула 3 была вручную модифицирована в молекулы 4 - 18 (Рис. 52) путём замены и/или добавления атомов в её структуру, на основе фрагментов из других сгенерированных соединений. Для получения конформаций, которые могли бы быть использованы для генерации фармакофора, молекулы 3 - 18 были отдокированы в исследуемую бороздку программой Vina Autodock. Расположение отдокированных молекул 3 - 18 совпало с положением сгенерированных молекул 1 и 2. Также в набор соединений, использованных для создания фармакофора, были добавлены сгенерированные АutoGrow соединения 7, 8 и 9.



Рисунок 51. Молекулы **1** и **2** расположенные в бороздке на поверхности HSP90 в окрестностях остатка Thr-90.

Далее молекулы **1** — **18** были использованы для генерации фармакофоров при помощи веб-сервиса PharmaGist [150]. Всего на основе этих моделей было сгенерировано 4 исходные фармакофорные модели. Так на основе молекул **1** - **6** был сгенерирован фармакофор 1 (рис. 53а), содержащий следующие фармакфорные признаки: 6 доноров H-связи, 6 акцепторов водородной связи и 5 ароматических фрагментов. Фармакофор 2 основан на молекулах **7** - **11** (Рис. 53b) и содержит следующие фарамакофорные признаки: 6 ароматических колец, по 4 донора и акцептора H-связи и 1 гидрофобный фрагмент.

Фармакофор 3 был сгенерирован на основе соединений **12** - **14** и содержал 4 ароматических фрагмента, 1 гидрофобный фрагмент, а также 4 донора и 5 акцепторов H-связей (Рис. 53с). Последний фармакофор был сгенерирован на основе соединений **15** - **18** (рис. 53d) и содержал следующие признаки: 2 ароматических кольца, 5 доноров и 7 акцепторов H-связей.



Рисунок 52. Соединения, использованные для генерации фармакофора.

Однако, поиск по этим фармакофорным моделям не дал положительного результата. Для дальнейшего фармакофорного поиска по базе данных ZINC12 были использованы лишь некоторые фармакофорные признаки из каждого полученного фармакофора, которые отбирались вручную. Так на основе фармакофора 1 были созданы фармакофоры 1.1 и 1.2, каждый из которых содержал 1 донор Н-связи и 4 ароматических фрагмента. На основе фармакофора 2 был получен фармакофор 2.1, содержащий 4 ароматических фрагмента и 1 донор Н-связи. На основе фармакофора 3 было сгенерировано 3 вторичных фармакофора 3.1, 3.2 и 3.3. Так фарамакофор 3.1 содержал 1 донор Н-связи и 4 ароматических фрагмента, 3.2 - 3 ароматических фрагмента и 1 акцептор Н-связи, 3.3 - 4 ароматических фрагмента и 1 донор Н-связи. Из фармакофора 4 для создания вторичного фармакофора 4.1 были взяты следующие признаки: 3 ароматических фрагмента, 2 донора Н-связи и 2 акцептора Н-связи.



Рисунок 53. Фармакофорные модели. А — фармакофор 1 (соединения 1 -6), b — фармакофор 2 (соединения 7 - 11), с — фармакофор 3 (соединения 12 - 14), d — фармакофор 4 (соединения 15 - 18). Сиреневые сферы – ароматические фрагменты, серые сферы – донор Н-связи, желтые сферы – акцепторы Н-связи, зелёные сферы – гидрофобные фрагменты.

Полученные 7 вторичных фармакофоров были использованы для фармакофорного поиска по базе данных ZINC при помощи веб-сервиса ZINCPharmer (<u>http://zincpharmer.csb.pitt.edu/</u>) [152]. По итогам поиска, на основе фармакофора 1.1 удалось найти 99 соединений, фармакофора 1.2 — 29 соединений, фармакофора 2.1 — 30 соединений, фармакофора 3.1 — 66 соединений, фармакофора 3.2 — 6 соединений, фармакофора 3.3 — 297 соединений, фармакофора 4.1 — 267 соединений. Таким образом,

всего было найдено 803 соединения, соответствующих критериям использованных фармакофорных моделей.

Для первичной оценки возможности связывания соединений, найденных в ходе фармакофорного поиска, был осуществлен молекулярный докинг. Помимо этого, был произведен докинг 1685 молекул из базы данных iPPi-DB [157], содержащей соединения известные, как ингибиторы белок-белковых взаимодействий. Таким образом, общее число отдокированных молекул составило 2488 штук.

В виду небольшого числа отдокированных молекул анализ полученных поз осуществлялся преимущественно визуально. Критериями для отбора молекул для последующего анализа служили величины оценочной функции (отбирались лишь те соединения, чья предсказанная аффинность составляла менее -6,0 ккал/моль), возможность образования молекулами H-связей с остатком Thr-90, а также положение молекул в исследуемой бороздке (предпочтение отдавалось тем молекулам, которые занимали >50% площади полости). Всего таким образом было отобрано 26 соединений: 18 — из базы данных ZINC, 8 — из базы данных iPPi-DB.

Для оценки стабильности полученных комплексов они были подвергнуты молекулярной динамике на коротких траекториях в 30 нс. По результатам МД лишь 5 (соединения **19**, **20**, **21**, **22**, **23**) из 26 отобранных на предыдущем этапе соединений образовали стабильный комплекс с HSP90, остальные соединения уходили в раствор после 2-3 нс симуляции. При этом соединения **19**, **20** и **21** принадлежали базе данных ZINC, а соединения **22** и **23** — базе данных PPi-DB (Табл. 8). Все пять соединения обладают высокими молекулярными массами от 352 до 614 Да. Также все соединения, кроме соединения **20** (LogP=1.2) являются гидрофобными (значения LogP от 4.2 до 5.6). При этом количество доноров и акцепторов Н-связей у всех соединений соответствовал правилам Липински. Соединения **19**, **20** и **21** обладали общим структурным элементом, описанным выше: ароматическим фрагментом, с прикрепленной к нему аминогруппой. При этом аминогруппы всех трёх соединений на момент начала динамики оказывались расположены в небольшом углублении возле остатка Thr-90 и образовывали с ним Н-связь.

Далее было решено проверить стабильность связывания соединений 19, 20, 21, 22, 23 на более длинных траекториях в 300 нс. Так соединения 20, 22, 23 ушли в раствор после 30 нс дополнительной динамики. Соединения 19 (ZINC20530423) и 21 (ZINC11296605) оставались связанными с поверхностью белка на всем продолжении динамики. Значения RMSD лигандов достигают 9Å в первые 10 нс симуляции, что говорит о смещении

соединений в ходе динамики с позиций предсказанных докингом (Рис. 54Б). Значения RMSD основной цепи белка комплекса с соединением 19 выходит на плато в течении первых 10 нс и колеблется около 1,2Å-1,3Å на протяжении всей траектории (Рис. 54А). RMSD же атомов основной цепи комплекса с соединением 21 ведёт себя менее стабильно (Рис. 54А). Такое поведение графика RMSD может свидетельствовать о том, что при связывании соединения 21 основная цепь белка может принимать большее количество конформаций, чем при связывании соединения 19. Подтверждением тому может служить кластеризация структур, проведённая с применением метода GROMOS и рассчитанная на всей длине траектории с использованием отсечки в 1.25Å. Так для комплекса HSP90-21 было обнаружено 15 отдельных кластеров с населённостью в 69,7%, 11,4%, 9,9%, 2,7%, 2,4%, 2%, 0,6%, 0,33%, 0,3%, 0,27%, 0,17%, 0,07%, 0,03%, 0,03% и 0,03%. В то же время при использовании той же отсечки для комплекса HSP90-19 удалось обнаружить лишь 5 кластеров с населённостью в 97,3%, 1,47%, 0,73%, 0,13% и 0,07%. Таким образом для комплекса HSP90-19 на всём протяжении траектории доминирует единственная конформация, а для комплекса HSP90-21 три основные конформации, из которых доминирующей является конформация, соответствующая кластеру 1.



Рисунок 54. 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.

| Howen | | Мол | | Доно- | Акцепто- | Вращаю |
|---------------------------------|---------------------|---------|-------|---------|----------|--------|
| помер | Структурная формула | 1410/1. | LogP | ров | ров | щихся |
| соединения | | масса | | Н-связи | Н-связи | связей |
| 19 (ZINC2053042 3) | | 514.5 | 4.169 | 1 | 9 | 4 |
| 20 (ZINC3232301) | | 352.402 | 1.177 | 2 | 9 | 5 |
| 21 (ZINC1129660 5) | | 420.476 | 4.841 | 2 | 7 | 7 |
| 22 (PPI-1107) | | 613.9 | 4.8 | 4 | 5 | 7 |
| 23 (PPI-1583) | | 550.7 | 5.6 | 1 | 4 | 8 |

Таблица 8. Соединения, отобранные по итогам 30-нс молекулярной динамики.

Для получения репрезентативных структур комплексов была проведена кластеризация комплексов на последних 50 нс траекторий с использованием отсечки в 1,25Å. Для комплекса HSP90-**21** было обнаружена 4 отдельных кластера с населённостью в 80,64%, 14,37%, 4,79% и 0,2% соответственно. Для комплекса HSP90-**19** был обнаружен единственный кластер. В качестве репрезентативной структуры выбиралась центральная структура наиболее населённого кластера.

Сравнение репрезентативных структур каждого из комплексов со структурами, соответствующими начальному моменту динамики представлены на рисунке 55. Видно, что лиганды меняют своё положение относительно положения, предсказанного докингом. Если в начальный момент динамики лиганды расположены перпендикулярно β-тяжам белка, то в репрезентативных структурах они расположены параллельно им. При этом аминогруппа соединения **21** утрачивает способность формировать стабильную H-связь с Thr-90, однако остаётся в окрестностях остатка. В случае с соединением **19** аминогруппа экспонируется в растворитель. Такая значительная реориентация исследуемых соединений в предполагаемом сайте связывания хорошо согласуется с высокими значениями RMSD лигандов.

Для анализа Н-связей, образуемых между белком и лигандами использовались последние 50 нс траектории. Соединение 21 образует 15 мало стабильных Н-связей с остатками T90, N83, V222, E223, E178 и K224. Хотя соединение 21 и сохраняет H-связь с боковой цепью Thr90, эта связь обладает низкой стабильностью (занятость 7,20%). Наиболее стабильную Н-связь соединение 21 образует с кислородом основной цепи V222 (занятость 33,91%). Соединение 19 образует пять низкостабильных Н-связей с остатками N83, E223 и K224. Наиболее стабильными Н-связями оказываются связи между аминогруппой соединения 19 и атомами ОЕ1 и ОЕ2 боковой цепи Е223 (занятость 16,14% и 14,24%, соответственно). Таким образом, остаток Thr-90 не играет значимой роли в связывании исследуемых лигандов, а наличие множества нестабильных Н-связей может свидетельствовать как 0 высокой подвижности боковых цепей, образующих предполагаемый сайт связывания, так и о высокой подвижности самих лигандов в сайте связывания.

Для оценки сродства соединений **19** и **21** к HSP90 были рассчитаны энергии образования комплексов HSP90-**19** и HSP90-**21** при помощи метода MM-GBSA. Свободная энергия связывания для соединения **19** составляет –4,92 ккал/моль, а для соединения **21** – -5,44 ккал/моль (Табл. 9). Рассчитанные энергия связывания являются низкими, что говорит о низкой стабильности полученных комплексов. Энтропийный и энтальпийный вклады обладают схожими значениями у обоих систем, при этом именно энтропийный вклад в обоих комплексах ответственен за низкое сродство соединений **19** и **21** к HSP90.



Рисунок 55. А — комплекс HSP90 и соединения **19** в момент времени 0 нс, **В** репрезентативная структура комплекса HSP90 и соединения **19** из молекулярной динамики. **С** — комплекс HSP90 и соединения **21** в момент времени 0 нс, **D** репрезентативная структура комплекса HSP90 и соединения **21** из молекулярной динамики.

| Таблица 9. Свободные энергии связывания (ΔG _{bind}) соединении 19 и 21 с HSP90 и | |
|--|--|
| вклад в энергию различных членов. | |

| Комплекс | Вклад (ккал/моль) | | | | | | | |
|------------------|-------------------|------------------|--------------|-----------------|--------|-------|-------------------|--|
| | ΔE_{ele} | ΔE_{vdw} | ΔG_p | ΔG_{np} | ΔΗ | -ΤΔS | 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 | |

Энтальпийная составляющая свободных энергий связывания соединений **19** и **21** обеспечивается преимущественно за счёт ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий. Для выявленных остатков, вносящий наибольший вклад в связывание было проведено разложение энергии связывания по остаткам. На рис. 56 отмечены остатки, чей вклад в связывание ≤-1 ккал/моль. Для соединения **19** такими остатками являют N79, I81, N83, V92 и F221, а для соединения **21** I81, T90, V92 и F221. При этом в

обоих комплексах остатком, вносящим наибольший вклад в связывание исключительно за счёт ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, является I81. В связывание соединения **19** заметный вклад вносят полярные N79 и N83, при этом вклад в энергию взаимодействия вносят, как электростатические, так и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с преобладанием последних. Для соединения **21** единственным полярным остатком, чья энергия взаимодействия с лигандом ≤-1 ккал/моль является Thr90, примерно равный вклад в эту энергию вносят, как ван-дер-Ваальсовы, так и электростатические взаимодействия. Val92 и Phe221 взаимодействуют с соединением **21** через ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.



Рисунок 56. Разложению свободной энергии связывания лигандов по остаткам, вносящим вклад ≤-1ккал/моль для соединения **19** (А) и соединения **21** (Б).

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак простаты является одним из самых распространённых злокачественных новообразований среди мужчин старшего возраста в развитых странах. РПЖ по своей природе является гормон-зависимым, т.е. рост и пролиферация злокачественных клеток стимулируются тестостероном мужскими половыми гормонами, И дигидротестостероном. В связи с этим применятся два основных подхода к лечению РПЖ. Первый состоит в применении антагонистов андрогенового рецептора. Такие соединения связываются с AR и блокируют его взаимодействие с коактиваторами и препятствуют транспорту AR в ядро, что приводит к инактивации генов, необходимых для пролиферации раковых клеток. Во втором подходе непосредственно подавляется синтез тестостерона путём ингибирования фермента СУР17 такими препаратами как абиратерон.

При первом подходе молекулярной мишенью терапии является андрогеновый рецептор. На начальных этапах развития заболевания применяются такие его антагонисты как бикалутамид, гидроксифлутамид, энзалутамид и др. Однако, спустя непродолжительное время, неизбежно развивается нечувствительная к кастрации форма рака простаты. Причиной тому служит возникновение мутаций в лиганд-связывающем кармане AR (T877A, W741L/C, F876L и др.). При возникновении таких мутаций, антагонисты начинают действовать как агонисты и заболевание развивается с новой силой. В связи с эти особый интерес представляет разработка препаратов, резистентных к указанным мутациям. Но это требует знания детального механизма связывания антагонистов в лиганд-связывающем кармане и конформационных перестроек в нем в процессе связывания.

Поэтому мы детально исследовали механизм взаимодействия двух новых соединений: соединения **171** в его кето- (**171K**) и в енольной форме (**171E**) и соединения **172** с лиганд-связывающим доменом AR и их способность вызывать конформационные перестройки, как в домене в целом, так и в спирали H12 в частности, как в AR дикого типа, так и в двух его мутантных формах W741L и T877A. В качестве контроля было изучено взаимодействие тестостерона (агонист) и бикалутамида (антагонист) с WT-рецептором. Анализ поведения спирали H12 в комплексах с лигандами в ходе молекулярной динамики показал, что определённая подвижность спирали H12 наблюдается даже в комплексе с агонистом тестостероном (Рис. 25); дополнительно эта

спираль подвергается незначительной деспирализации (Рис. 27). Бикалутамид вызывает более выраженную подвижность H12, подвижность распространяется на всю длину спирали, но степень её спирализации при этом остаётся высокой (Рис. 25 и 27). Соединения **171K** и **172** придают спирали H12 более выраженную подвижность, чем бикалутамид или тестостерон, как в WT-рецепторе, так и в мутантах W741L и T877A (Рис. 24). Причём основная подвижность сосредоточена в области N-конца спирали. Так же во всех комплексах H12 подвергается значительной деспирализации под воздействием соединений **171K** и **172** (Рис. 27).

Анализ данных РСА показал, что в комплексе с тестостероном H12 подвергается лишь незначительному смещению с исходных позиций. При этом движения спирали оказываются медленными (Рис. 28А). В случае же с ВІС для этой спирали характерно интенсивное колебательное движение, что может объяснить антагонистическую активность BIC по отношению к AR. В случае с енольной формой соединения 171 спираль Н12 остаётся на исходных позициях на большей части траектории. Однако на непродолжительное время Н12 всё же подвергается смещению вдоль вектора РС2. Однако в комплексах **171E** с мутантами W741L и T877A в комплексе с этим вариантом молекулы наблюдается значительная подвижность H12 (Рис. 29А и Б). В комплексе же соединения 171К, как в WT-рецепторе, так и в мутантах для H12 конечные положения спирали Н12 отличны от исходных (Рис. 30). Под воздействием соединения 172, Н12 как в рецепторе дикого типа, так и в мутантах, обретает значительную подвижность, при этом конечные положения спирали отличны от исходных (Рис. 31). Это может указывать на хаотичное движение спирали H12, при котором ослаблены ее взаимодействия с основной глобулой LBD. Таким образом, можно предположить, что соединения **171** (в кето-форме) и 172 будут являться антагонистами WT-AR, W741L-AR и T877A-AR. При этом наиболее выраженные изменения в положении и конформации Н12 будут наблюдаться под воздействием соединения 172, что позволяет считать его наиболее эффективным антагонистом AR. Таким образом, на основании анализа поведения спирали H12 при молекулярной динамики можно заключить, что соединение 172 должно быть более эффективным антагонистом, чем соединение 171. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными (Табл. 2).

Можно предположить, что поведение H12 у AR отличается от классического механизма, описанного детально для эстрогенового рецептора. В последнем можно наблюдать значительные изменения положения этой спирали. По полученным нами
данным в AR значительных перестроек и положения этой спирали не происходит. Движение спирали происходит путем смещения из агонистической конформации в антагонистическую, которая сопровождается существенной деспирализацией Н12. Но в случае с антагонистами происходит более значительный сдвиг спирали, а деспирализация становится более выраженной. Тем не менее, Н12 остаётся достаточно близко расположена к лиганд-связывающему карману. Вероятно, подобных относительно небольших конформационных изменений Н12 достаточно для того, чтобы нарушить геометрию поверхностных сайтов AF2 и BF3 и воспрепятствовать рекрутингу на них коактиваторов. Следует отметить, что исследуемые нами соединения 171 и 172, в отличие от бикалутамида, не вступают в прямое взаимодействие с Н12. Вместо этого они взаимодействуют с петлей L11_12. Вероятно, механизм антагонизма заключается в том, что взаимодействие с петлей L11_12 вносит возмущения в структуру H12. Причиной меньшей подвижности спирали H12 в андрогеновом рецепторе, может служить то, что в доступных кристаллических структурах H12 у AR продолжается неструктурированным участком, несущим на себе короткую β-цепь (остатки 911-913), которая образует короткий β-тяж и формирует β-слой с основной глобулой белка (рис. 57). В то же время для ER в доступных кристаллических структурах H12 продолжается лишь коротким неструктурированным участком, который не может образовать никаких дополнительных связей с основной глобулой. Вероятно, именно дополнительные Н-связи в β-листе Сконцевого участка AR и придают спирали H12 более стабильное положение в сравнении с ER, в связи с чем её сдвиг в ходе классической МД не удаётся наблюдать даже в случае с известными антагонистами. К тому же спираль H12 у AR имеет длину в 16 остатков, а у ER лишь 10, что также может способствовать дополнительной стабилизации H12 у AR в агонистическом положении. Однако, в последовательности ER после H12 находится ещё примерно 40 остатков, которые отсутствуют в доступных кристаллических структурах.

Вторым методом лечения РПЖ является подавление синтеза мужских половых гормонов путём ингибирования фермента СҮР17А1. Одним из основных фармакологических агентов в данном случае является абиратерон. Ещё одним перспективным соединением является галетерон. Оба этих соединения содержат стероидное ядро в своём составе и потенциально способны взаимодействовать с другими ферментами стероидогенеза. Также было установлено, что абиратерон и галетерон способны окисляться до соответствующих 3-кето- Δ 4-метаболитов D4A и D4G.



Рисунок 57. Сравнение С-концевых участков ER (A) и AR (Б). Спираль H12 в обеих структурах выделена фолетовым. Дополнительный β-лист в AR выделен коричневым.

Молекулярный докинг этих производных показал, что, подобно абиратерону и галетерону, их 3-кето- Δ 4-метаболиты также способны связываться с СҮР17А1 как ингибиторы типа II. 3-кето- Δ 4-производные показали более высокую предсказанную аффинность к ферменту, чем исходные соединения, что согласовывалось с экспериментальными данными. Моделирование показало, что абиратерон, галетерон, D4A и D4G способны взаимодействовать и с другими цитохромами P450, вовлечёнными в стероидогенез, являясь, в зависимости от фермента и структур лигандов, как субстратами, так и ингибиторами.

В одних случаях данные докинга хорошо согласуются с экспериментальными данными, в других же они не способны объяснить эффекты, наблюдаемые в ходе экспериментов. Вероятно это связано с тем, что докинг, который использует представление мишени как жесткой структуры, не всегда может учесть конформационные перестройки в активном центре, происходящие при связывании лигандов. Так в результате докинга не удалось построить достоверных моделей комплексов с адоматазой. По-видимому, это было связано с тем, что в используемой для докинга структуры фермент был связан со стероидным ингибитором, у которого кольцо А было плоским. При связывании конформации остатков активного центра ароматазы адаптируются к такой плоской структуре. Тогда как в исследованных молекулах данное кольцо не является плоским. В случае цитохрома Р450 11А1 в ряде полученных комплексов ароматические заместители в 17 положении располагались параллельно кольцу гема. По-видимому, для получения моделей хорошо отражающих структуру комплексов в ряде случаев необходимо дополнительно использовать моделирование молекулярной динамикой как до, так и после докинга. Тем не менее, даже без метода молекулярной динамики, модели, полученные при докинге, позволяют объяснить многие эффекты, наблюдаемые в эксперименте. Так они позволили связать наблюдаемый в экспериментах сигмоидальный характер зависимости связывания лигандов от их концентрации для цитохромов P450 51 и 3A4 с одновременным связыванием двух молекул ингибиторов в активных центрах ферментов. Для цитохрома Р450 21А1 удалось объяснить различия в механизмах связывания для абиратерона и галетерона, несмотря на их высокую схожесть в строении. Было показано, что абиратерон и его производное способны связаться в активном центре таким образом, что атом азота пиридина располагается около иона железа гема, в результате чего они демонстрируют второй тип ингибирования. Тогда как для галетерона и его метаболита такое расположение невозможно из-за более объемного заместителя. В результате эти соединения располагаются таким образом, что рядом с гемом находиться атом углерода, что приводит к ингибированию первого типа. Такое различное расположение абиратерона и D4A, и галетерона и D4G а активном центре цитохрома P450 21A1 позволяет предположить, что галетерон может быть более предпочтительным препаратом для лечения рака простаты, поскольку он должен незначительно влиять на работу этого цитохрома, и, соответственно, обладать меньшими побочными эффектами.

Несмотря на успехи в разработке ингибиторов цитохрома P450 и антагонистов AR для эффективного лечения рака простаты необходимо разрабатывать новые соединения с другим механизмом действия. Одним из новых подходов является поиск ингибиторов белок-белковых взаимодействий. Так для AR известен ряд соединений, которые связываются с поверхностными сайтами AF2 и BF3, чем препятствуют рекрутингу коактиваторов и инактивируют рецептор [56,158].

Однако более перспективным может стать поиск принципиально новых мишеней. В 2019 году было показано, что для диссоциации комплекса AR и HSP90 и последующей транслокацией рецептора в ядро, необходимо дополнительное фосфорилирование остатка Thr-90 шаперона HSP90 [11]. Поэтому разработка соединений, способных связываться с HSP90 в области Thr90 и препятствовать его фосфорилированию, может стать перспективным направлением в терапии рака простаты.

Тем не менее при поиске лигандов для ранее неизвестных сайтов возникает ряд сложностей. Одна из них состоит в необходимости производить докинг больших баз данных химических соединений против потенциальных сайтов связывания что требует значительных вычислительных ресурсов и временных затрат. Данная ситуация осложняется и тем, что точность оценочных функций докинга остаётся достаточно низкой, что приводит к большому числу ложно положительных и ложно отрицательных результатов при скрининге. Повысить эффективность подобного скрининга можно, если заранее знать какие функциональные группы будут более предпочтительно связываться с определёнными участками белка внутри сайта связывания. Поэтому в работе был апробирован оригинальный алгоритм поиска соединений. способных связываться с заданным участком белка для которого ранее не были описаны лиганды. Он заключается в том, что на первом этапе происходит генерация новых молекул с помощью программы конструирования лигандов de novo. Далее сгенерированные молекулы отбираются на основе их аффинности и геометрического соответствия предполагаемому сайту связывания. После на основе отобранных молекул строится фармакофорная модель, которая используются для поиска лигандов по базе данных низкомолекулярных веществ. Полученная таким образом сфокусированная выборка используется для докинга молекул в потенциальное место связывания с последующей оценкой посредством значений оценочной функции и визуального анализа. Создание подобной библиотеки, состоящей из соединений, несущих необходимые для связывания функциональные группы, позволяет отказаться от докинга больших несфокусированных баз данных. В результате

такого подхода, а также последующих расчётов МД, были отобраны два соединения (ZINC20530423 и ZINC1126605), которые потенциально могут связываться с HSP90 и блокировать его фосфорилирование по остатку Thr-90.

Таким образом, в работе были исследованы механизмы действия и селективность новых и известных соединений, их способных действовать на основные мишени для лекарств, используемых для лечения рака простаты, а также проведен поиск ингибиторов для новой мишени.

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, галетрона, D4A и D4G со стероид-метаболизирующими СҮР 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 СҮР51A1 и СҮРЗA4 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- МД молекулярная динамика
- ПСА (PSA) простатический сывороточный антиген
- РПЖ рак предстательной железы или рак простаты
- АВІ абиратерон
- AF1 сайт активации функции 1 (activation function 1)
- AF2 сайт активации функции 2 (activation function 2)
- AR андрогеновый рецептор
- BF3 сайт связывающий функции 3 (binding function 3)
- BIC бикалутамид
- CRPC рак простаты, нечувствительный к кастрации (castration resistant prostate cancer)
- СҮР ферменты семейства цитохром Р450
- D4A 3-кето-Δ4-метаболит абиратерона
- D4G 3-кето-Δ4-метаболит галетерона
- DBD (DBD-AR) ДНК-связывающий домен андрогенового рецептора
- **DHT** -дигидротестестерон
- ER эстрогеновый рецептор
- GAL галетерон
- GR глюкокортикоидный рецептор
- HSP белок теплового шока
- LBD (LBD-AR) лиганд-связывающий домен андрогенового рецептора
- LBP (LBP-AR) лиганд связывающий карман андрогенового рецептора
- MR минералокортикоидный рецептор
- NTD (NTD-AR) N-концевой домен андрогенового рецепторам
- PR прогестероновый рецептор
- Q_k доля нативных контактов остатка k
- RIN сеть взаимодействия остатков (residue interaction network)
- RMSD среднеквадратичное отклонение атомных позиций
- RMSF среднеквадратичная флуктуация
- SNP однонуклеотидный полиморфизм
- РСА метод главных компонент
- Т тестостерон

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Hankey B.F. et al. Cancer Surveillance Series: Interpreting Trends in Prostate Cancer Part I: Evidence of the Effects of Screening in Recent Prostate Cancer Incidence, Mortality, and Survival Rates // JNCI J. Natl. Cancer Inst. 1999. Vol. 91, № 12. P. 1017–1024.
- 2. Vasaitis T.S., Bruno R.D., Njar V.C.O. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 125, № 1–2. P. 23–31.
- 3. Hara T. et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. // Cancer Res. 2003. Vol. 63, № 1. P. 149–153.
- 4. Tan M.E. et al. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery // Acta Pharmacol. Sin. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 36, № 1. P. 3–23.
- 5. Balbas M.D. et al. Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. // Elife. 2013. Vol. 2. P. e00499.
- Malikova J. et al. CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2 // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2017. Vol. 174. P. 192–200.
- de Bono J.S. et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer // N. Engl. J. Med. 2011. Vol. 364, № 21. P. 1995–2005.
- Ryan C.J. et al. Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy // N. Engl. J. Med. 2013. Vol. 368, № 2. P. 138–148.
- 9. Li Z. et al. Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer // Nature. 2015. Vol. 523, № 7560. P. 347–351.
- Alyamani M. et al. Steroidogenic Metabolism of Galeterone Reveals a Diversity of Biochemical Activities // Cell Chem. Biol. 2017. Vol. 24, № 7. P. 825-832.e6.
- 11. Dagar M. et al. Phosphorylation of HSP90 by protein kinase A is essential for the nuclear translocation of androgen receptor // J. Biol. Chem. 2019. Vol. 294, № 22. P. 8699–8710.
- 12. Miller D.C. et al. Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base. // Cancer. 2003. Vol. 98, № 6. P. 1169–1178.
- Catalona W.J. et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. // J. Urol. 1994. Vol. 151, № 5. P. 1283–1290.
- Suzuki H. et al. Alternative Nonsteroidal Antiandrogen Therapy for Advanced Prostate Cancer That Relapsed After Initial Maximum Androgen Blockade // J. Urol. 2008. Vol. 180, № 3. P. 921–927.

- 15. Bussemakers M.J. et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. // Cancer Res. 1999. Vol. 59, № 23. P. 5975–5979.
- 16. Attard G. et al. Prostate cancer // Lancet. 2016. Vol. 387, № 10013. P. 70–82.
- Ewing C.M. et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. // N. Engl. J. Med. 2012. Vol. 366, № 2. P. 141–149.
- Eeles R. et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. // Nat. Rev. Urol. 2014. Vol. 11, № 1. P. 18–31.
- Thompson D., Easton D., Breast Cancer Linkage Consortium. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. // Am. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 68, № 2. P. 410–419.
- Kote-Jarai Z. et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. // Br. J. Cancer. 2011. Vol. 105, № 8. P. 1230–1234.
- 21. Filson C.P., Marks L.S., Litwin M.S. Expectant management for men with early stage prostate cancer. // CA. Cancer J. Clin. Vol. 65, № 4. P. 265–282.
- Mangelsdorf D.J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. // Cell. 1995.
 Vol. 83, № 6. P. 835–839.
- 23. Feldman B.J., Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. // Nat. Rev. Cancer. 2001. Vol. 1, № 1. P. 34–45.
- 24. Gelmann E.P. Molecular biology of the androgen receptor // J. Clin. Oncol. 2002. Vol. 20, № 13. P. 3001–3015.
- McEwan I.J. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. // Endocr. Relat. Cancer. 2004. Vol. 11, № 2. P. 281–293.
- 26. Hsing A.W. et al. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. // Cancer Res. 2000. Vol. 60, № 18. P. 5111–5116.
- 27. Werner R. et al. The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. Vol. 91, № 9. P. 3515–3520.
- 28. Choong C.S. et al. Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. // Mol. Endocrinol. 1996. Vol. 10, № 12. P. 1527–1535.
- 29. Reid J. et al. Conformational analysis of the androgen receptor amino-terminal domain involved in transactivation. Influence of structure-stabilizing solutes and protein-protein interactions. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 22. P. 20079–20086.

- Lavery D.N., McEwan I.J. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. // Biochem. J. 2005. Vol. 391, № Pt 3. P. 449– 464.
- 31. Shaffer P.L. et al. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. Vol. 101, № 14. P. 4758–4763.
- 32. Zhou Z.X. et al. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, № 18. P. 13115–13123.
- 33. Marte B. Passage through the nuclear pore. // Nat. Cell Biol. 2001. Vol. 3, № 6. P. E135.
- 34. Ni L. et al. Androgen induces a switch from cytoplasmic retention to nuclear import of the androgen receptor. // Mol. Cell. Biol. 2013. Vol. 33, № 24. P. 4766–4778.
- Clinckemalie L. et al. The hinge region in androgen receptor control. // Mol. Cell. Endocrinol. 2012. Vol. 358, № 1. P. 1–8.
- 36. Matias P.M. et al. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor: Implications for pathogenic gene mutations // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 34. P. 26164–26171.
- 37. Tyagi R.K. et al. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. // Mol. Endocrinol. 2000. Vol. 14, № 8. P. 1162–1174.
- 38. Heery D.M. et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. // Nature. 1997. Vol. 387, № 6634. P. 733–736.
- Estébanez-Perpiñá E. et al. The molecular mechanisms of coactivator utilization in liganddependent transactivation by the androgen receptor. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 9. P. 8060–8068.
- 40. Slagsvold T. et al. Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors. // Mol. Endocrinol. 2000. Vol. 14, № 10. P. 1603–1617.
- 41. Estébanez-Perpiñá E. et al. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 41. P. 16074–16079.
- Ris-Stalpers C. et al. Threonine on amino acid position 868 in the human androgen receptor is essential for androgen binding specificity and functional activity. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 196, № 1. P. 173–180.
- Matias P.M. et al. Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (AR(ccr)) derived from an androgen-independent prostate cancer. // J. Med. Chem. 2002. Vol. 45, № 7. P. 1439–1446.

- 44. Culig Z. et al. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. // Mol. Endocrinol. 1993. Vol. 7, № 12. P. 1541–1550.
- 45. Bohl C.E. et al. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. Vol. 102, № 17. P. 6201–6206.
- 46. Quayle S.N. et al. Androgen receptor decoy molecules block the growth of prostate cancer. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 4. P. 1331–1336.
- 47. Brand L.J. et al. EPI-001 is a selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulator with inhibitory effects on androgen receptor expression and activity in prostate cancer. // Oncotarget. 2015. Vol. 6, № 6. P. 3811–3824.
- 48. Nickols N.G., Dervan P.B. Suppression of androgen receptor-mediated gene expression by a sequence-specific DNA-binding polyamide. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 25. P. 10418–10423.
- 49. Chenoweth D.M. et al. Cyclic pyrrole-imidazole polyamides targeted to the androgen response element. // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 20. P. 7182–7188.
- Cherian M.T., Wilson E.M., Shapiro D.J. A competitive inhibitor that reduces recruitment of androgen receptor to androgen-responsive genes. // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, № 28. P. 23368–23380.
- Biron E., Bédard F. Recent progress in the development of protein-protein interaction inhibitors targeting androgen receptor-coactivator binding in prostate cancer // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 161. P. 36–44.
- Gunther J.R., Parent A.A., Katzenellenbogen J.A. Alternative inhibition of androgen receptor signaling: peptidomimetic pyrimidines as direct androgen receptor/coactivator disruptors. // ACS Chem. Biol. 2009. Vol. 4, № 6. P. 435–440.
- 53. Rodriguez A.L. et al. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47, № 3. P. 600–611.
- 54. Caboni L. et al. "True" antiandrogens-selective non-ligand-binding pocket disruptors of androgen receptor-coactivator interactions: Novel tools for prostate cancer // J. Med. Chem. 2012. Vol. 55, № 4. P. 1635–1644.
- 55. Liu Y. et al. Structural based screening of antiandrogen targeting activation function-2 binding site // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9, № NOV. P. 1–10.
- 56. Munuganti R.S.N. et al. Targeting the binding function 3 (BF3) site of the androgen receptor through virtual screening. 2. development of 2-((2-phenoxyethyl) thio)-1H-benzimidazole derivatives. // J. Med. Chem. 2013. Vol. 56, № 3. P. 1136–1148.

- 57. Hu X. et al. Advances in the computational development of androgen receptor antagonists // Drug Discov. Today. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 25, № 8. P. 1453–1461.
- 58. Bastos D.A., Antonarakis E.S. Galeterone for the treatment of advanced prostate cancer: the evidence to date. // Drug Des. Devel. Ther. 2016. Vol. 10. P. 2289–2297.
- 59. Singh S.M., Gauthier S., Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structureactivity relationships. // Curr. Med. Chem. 2000. Vol. 7, № 2. P. 211–247.
- 60. Shiau A.K. et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. // Cell. 1998. Vol. 95, № 7. P. 927–937.
- 61. Kauppi B. et al. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 25. P. 22748–22754.
- 62. Xu H.E. et al. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. // Nature. 2002. Vol. 415, № 6873. P. 813–817.
- 63. Osguthorpe D.J., Hagler A.T. Mechanism of androgen receptor antagonism by bicalutamide in the treatment of prostate cancer // Biochemistry. 2011. Vol. 50, № 19. P. 4105–4113.
- 64. Liu H. et al. Interaction mechanism exploration of R-bicalutamide/S-1 with WT/W741L AR using molecular dynamics simulations // Mol. Biosyst. 2015. Vol. 11, № 12. P. 3347–3354.
- 65. Liu H.H. et al. Molecular mechanism of R-bicalutamide switching from androgen receptor antagonist to agonist induced by amino acid mutations using molecular dynamics simulations and free energy calculation // J. Comput. Aided. Mol. Des. Springer International Publishing, 2016. Vol. 30, № 12. P. 1189–1200.
- 66. Liu H.-L. et al. A Molecular Modeling Study of the Hydroxyflutamide Resistance Mechanism Induced by Androgen Receptor Mutations // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18, № 9. P. 1823.
- 67. Liu N. et al. Molecular Dynamics Simulations Revealed the Regulation of Ligands to the Interactions between Androgen Receptor and Its Coactivator // J. Chem. Inf. Model. 2018. Vol. 58, № 8. P. 1652–1661.
- 68. Duan M. et al. Structural Diversity of Ligand-Binding Androgen Receptors Revealed by Microsecond Long Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling // J. Chem. Theory Comput. 2016. Vol. 12, № 9. P. 4611–4619.
- 69. Azhagiya Singam E.R. et al. Structural Dynamics of Agonist and Antagonist Binding to the Androgen Receptor // J. Phys. Chem. B. 2019. Vol. 123, № 36. P. 7657–7666.
- Jin Y. et al. Communication between the Ligand-Binding Pocket and the Activation Function-2 Domain of Androgen Receptor Revealed by Molecular Dynamics Simulations // J. Chem. Inf. Model. 2019. Vol. 59, № 2. P. 842–857.

- Sakkiah S. et al. Structural Changes Due to Antagonist Binding in Ligand Binding Pocket of Androgen Receptor Elucidated Through Molecular Dynamics Simulations // Front.
 Pharmacol. 2018. Vol. 9, № MAY. P. 1–13.
- 72. Gim H.J. et al. Conformational dynamics of androgen receptors bound to agonists and antagonists // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–15.
- Kocak A., Yildiz M. Molecular dynamics simulations reveal the plausible agonism/antagonism mechanism by steroids on androgen receptor mutations // J. Mol. Graph. Model. 2022. Vol. 111. P. 108081.
- 74. Danielson P.B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. // Curr. Drug Metab. 2002. Vol. 3, № 6. P. 561–597.
- 75. Manikandan P., Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. // Curr. Drug Targets. 2018. Vol. 19, № 1. P. 38–54.
- 76. Jeffery C.J. Moonlighting proteins. // Trends Biochem. Sci. 1999. Vol. 24, № 1. P. 8–11.
- Zhao B., Waterman M.R. Moonlighting cytochrome P450 monooxygenases. // IUBMB Life.
 2011. Vol. 63, № 7. P. 473–477.
- 78. Estrada D.F., Laurence J.S., Scott E.E. Substrate-modulated cytochrome P450 17A1 and cytochrome b5 interactions revealed by NMR. // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 23. P. 17008–17018.
- 79. OMURA T., SATO R. A new cytochrome in liver microsomes. // J. Biol. Chem. 1962. Vol. 237. P. 1375–1376.
- 80. Gay S.C., Roberts A.G., Halpert J.R. Structural features of cytochromes P450 and ligands that affect drug metabolism as revealed by X-ray crystallography and NMR. // Future Med. Chem. 2010. Vol. 2, № 9. P. 1451–1468.
- Buengerich F.P., Waterman M.R., Egli M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. // Trends Pharmacol. Sci. 2016. Vol. 37, № 8. P. 625–640.
- 82. Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J. Crystal structure of substrate-free Pseudomonas putida cytochrome P-450. // Biochemistry. 1986. Vol. 25, № 18. P. 5314–5322.
- 83. Tripathi S., Li H., Poulos T.L. Structural basis for effector control and redox partner recognition in cytochrome P450. // Science. 2013. Vol. 340, № 6137. P. 1227–1230.
- 84. Sansen S. et al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 19. P. 14348–14355.
- 85. Ekroos M., Sjögren T., Sjogren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 37. P. 13682–13687.

- 86. Porubsky P.R., Battaile K.P., Scott E.E. Human cytochrome P450 2E1 structures with fatty acid analogs reveal a previously unobserved binding mode. // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, N

 29. P. 22282–22290.
- Schoch G.A. et al. Determinants of cytochrome P450 2C8 substrate binding: structures of complexes with montelukast, troglitazone, felodipine, and 9-cis-retinoic acid. // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 25. P. 17227–17237.
- 88. Zhao B. et al. Binding of two flaviolin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of Streptomyces coelicolor A3(2) cytochrome P450 158A2. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 12. P. 11599–11607.
- 89. Wang A. et al. Contributions of ionic interactions and protein dynamics to cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) substrate and inhibitor binding. // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, № 8. P. 5092–5104.
- 90. Zhao B. et al. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, № 13. P. 10613–10622.
- 91. Denisov I.G., Frank D.J., Sligar S.G. Cooperative properties of cytochromes P450 // Pharmacol. Ther. 2009. Vol. 124, № 2. P. 151–167.
- 92. Lepesheva G.I., Waterman M.R. Structural basis for conservation in the CYP51 family // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2011. Vol. 1814, № 1. P. 88–93.
- Masamrekh R.A. et al. The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking // Steroids. 2020. Vol. 162. P. 108693.
- 94. Churchill P.F., Kimura T. Topological studies of cytochromes P-450scc and P-45011 beta in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. Effects of controlled tryptic digestion. // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254, № 20. P. 10443–10448.
- Friedlander T.W., Ryan C.J. Adrenal Androgen Synthesis Inhibitor Therapies in Castration-Resistant Prostate Cancer // Drug Management of Prostate Cancer. New York, NY: Springer New York, 2010. P. 91–100.
- 96. Masamrekh R. et al. Estimation of the inhibiting impact of abiraterone D4A metabolite on human steroid 21-monooxygenase (CYP21A2) // Steroids. 2020. Vol. 154. P. 108528.
- 97. Masamrekh R.A. et al. Interactions of galeterone and its 3-keto-Δ4 metabolite (D4G) with one of the key enzymes of corticosteroid biosynthesis steroid 21-monooxygenase (CYP21A2). // Fundam. Clin. Pharmacol. 2021. Vol. 35, № 2. P. 423–431.
- 98. Zöllner A. et al. Purification and functional characterization of human 11beta hydroxylase expressed in Escherichia coli. // FEBS J. 2008. Vol. 275, № 4. P. 799–810.

- 99. Lifton R.P. et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. // Nat. Genet. 1992. Vol. 2, № 1. P. 66–74.
- 100. WHITE P.C., CURNOW K.M., PASCOE L. Disorders of Steroid 11β-Hydroxylase Isozymes* // Endocr. Rev. 1994. Vol. 15, № 4. P. 421–438.
- 101. Strushkevich N. et al. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition. // Mol. Endocrinol. 2013. Vol. 27, № 2. P. 315–324.
- Brixius-Anderko S., Scott E.E. Structure of human cortisol-producing cytochrome P450
 11B1 bound to the breast cancer drug fadrozole provides insights for drug design. // J. Biol. Chem. 2019. Vol. 294, № 2. P. 453–460.
- 103. Nelson A.W. et al. Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe? // Endocr. Relat. Cancer. 2014. Vol. 21, № 4. P. T219-34.
- 104. Carruba G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. // J. Cell. Biochem. 2007. Vol. 102, № 4. P. 899–911.
- 105. Zanger U.M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 138, № 1. P. 103–141.
- Guengerich F.P. Human Cytochrome P450 Enzymes // Cytochrome P450. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 523–785.
- 107. Joulia M.-L. et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship of Enzalutamide and Its Active Metabolite N-Desmethyl Enzalutamide in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. // Clin. Genitourin. Cancer. 2020. Vol. 18, № 2. P. 155–160.
- 108. Masamrekh R.A. et al. In vitro interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug–drug interactions // Fundam. Clin. Pharmacol. 2020. Vol. 34, № 1. P. 120–130.
- Li J., Soroka J., Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. Elsevier B.V., 2012. Vol. 1823, № 3. P. 624–635.
- Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J. The HSP90 chaperone machinery // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. Vol. 18, № 6. P. 345–360.
- Krukenberg K.A. et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90 // Q. Rev. Biophys. 2011. Vol. 44, № 2. P. 229–255.
- 112. Mickler M. et al. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. Vol. 16, № 3. P. 281–286.
- 113. Scroggins B.T., Neckers L. Post-translational modification of heat-shock protein 90: impact on chaperone function. // Expert Opin. Drug Discov. 2007. Vol. 2, № 10. P. 1403–1414.

- Pick E. et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. // Cancer Res. 2007. Vol. 67, № 7. P. 2932–2937.
- 115. Chiosis G., Neckers L. Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. // ACS Chem. Biol. 2006. Vol. 1, № 5. P. 279–284.
- 116. Х.-Д. Хёльтье, В. Зипииль Д.Р.Г.Ф. Молекулряное моделирование: теория и практика.
 2nd ed. Москва: Бином, 2013. 319 р.
- 117. Dias R., de Azevedo Jr. W. Molecular Docking Algorithms // Curr. Drug Targets. 2008. Vol. 9, № 12. P. 1040–1047.
- 118. Sethi A. et al. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications // Drug Discovery and Development New Advances. IntechOpen, 2020.
- 119. Halperin I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions // Proteins Struct. Funct. Genet. 2002. Vol. 47, № 4. P. 409–443.
- 120. Bentham Science Publisher B.S.P. Scoring Functions for Protein-Ligand Docking // Curr. Protein Pept. Sci. 2006. Vol. 7, № 5. P. 407–420.
- 121. Li J., Fu A., Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking // Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. 2019. Vol. 11, № 2. P. 320–328.
- 122. Andrew L.R. Molecular Modelling. Priciples and Applications. 2nd ed. Harlow: Prentice Hall, 2001. 773 p.
- Computational Many-Particle Physics / ed. Fehske H., Schneider R., Weiße A. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Vol. 739.
- 124. Understanding Molecular Simulation. Elsevier, 2002.
- 125. Limongelli V. Ligand binding free energy and kinetics calculation in 2020 // WIREs Comput. Mol. Sci. 2020. Vol. 10, № 4.
- 126. Limongelli V., Bonomi M., Parrinello M. Funnel metadynamics as accurate binding freeenergy method // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. Vol. 110, № 16. P. 6358–6363.
- 127. Torrie G.M., Valleau J.P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling // J. Comput. Phys. 1977. Vol. 23, № 2. P. 187–199.
- Perez D. et al. Chapter 4 Accelerated Molecular Dynamics Methods: Introduction and Recent Developments. 2009. P. 79–98.
- 129. Mey A.S.J.S. et al. Best Practices for Alchemical Free Energy Calculations [Article v1.0] // Living J. Comput. Mol. Sci. 2020. Vol. 2, № 1.
- 130. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities // Expert Opin. Drug Discov. 2015. Vol. 10, № 5. P. 449–461.

- 131. No Title [Electronic resource]. URL: http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial3/.
- 132. Berman H.M. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28, № 1. P. 235–242.
- 133. Pereira de Jésus-Tran K. et al. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity // Protein Sci. 2006. Vol. 15, № 5. P. 987–999.
- Devore N.M., Scott E.E. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001 // Nature. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 482, № 7383. P. 116–119.
- 135. Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.-W. Structural Basis of Human CYP51 Inhibition by Antifungal Azoles // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 397, № 4. P. 1067–1078.
- 136. Strushkevich N. et al. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. Vol. 108, № 25. P. 10139–10143.
- 137. Ghosh D. et al. Novel Aromatase Inhibitors by Structure-Guided Design // J. Med. Chem.
 2012. Vol. 55, № 19. P. 8464–8476.
- Li J. et al. Structure insights into mechanisms of ATP hydrolysis and the activation of human heat-shock protein 90 // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2012. Vol. 44, № 4. P. 300– 306.
- Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // Journal of Computational Chemistry. 2009. P. NA-NA.
- 140. Adasme M.F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA // Nucleic Acids Res. 2021. Vol. 49, № W1. P. W530–W534.
- 141. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // Comput. Phys. Commun. 1995. Vol. 91, № 1–3. P. 43–56.
- 142. Lindorff-Larsen K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. // Proteins. 2010. Vol. 78, № 8. P. 1950–1958.
- 143. Wang J. et al. Development and testing of a general amber force field. // J. Comput. Chem. 2004. Vol. 25, № 9. P. 1157–1174.
- 144. Berendsen H.J.C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath // J. Chem. Phys. 1984. Vol. 81, № 8. P. 3684–3690.
- 145. Parrinello M., Rahman A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study // Phys. Rev. Lett. 1980. Vol. 45, № 14. P. 1196–1199.

- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. 1996. Vol. 14, № 1. P. 33–38.
- Bouysset C., Fiorucci S. ProLIF: a library to encode molecular interactions as fingerprints // J. Cheminform. 2021. Vol. 13, № 1. P. 72.
- 148. Best R.B., Hummer G., Eaton W.A. Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110, № 44. P. 17874–17879.
- 149. Spiegel J.O., Durrant J.D. AutoGrow4: an open-source genetic algorithm for de novo drug design and lead optimization // J. Cheminform. 2020. Vol. 12, № 1. P. 25.
- 150. Schneidman-Duhovny D. et al. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36, № Web Server. P. W223–W228.
- 151. Irwin J.J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology // J. Chem. Inf. Model. 2012. Vol. 52, № 7. P. 1757–1768.
- 152. Koes D.R., Camacho C.J. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, № W1. P. W409–W414.
- 153. Piovesan D., Minervini G., Tosatto S.C.E. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44, № W1. P. W367–W374.
- 154. Goenawan I.H., Bryan K., Lynn D.J. DyNet: visualization and analysis of dynamic molecular interaction networks // Bioinformatics. 2016. Vol. 32, № 17. P. 2713–2715.
- 155. Latysheva A.S. et al. New steroidal oxazolines, benzoxazoles and benzimidazoles related to abiraterone and galeterone // Steroids. 2020. Vol. 153.
- 156. Stebbins C.E. et al. Crystal Structure of an Hsp90–Geldanamycin Complex: Targeting of a Protein Chaperone by an Antitumor Agent // Cell. 1997. Vol. 89, № 2. P. 239–250.
- 157. Torchet R. et al. The iPPI-DB initiative: a community-centered database of protein–protein interaction modulators // Bioinformatics / ed. Robinson P. 2021. Vol. 37, № 1. P. 89–96.

158. Axerio-Cilies P. et al. Inhibitors of androgen receptor activation function-2 (AF2) site identified through virtual screening // J. Med. Chem. 2011. Vol. 54, № 18. P. 6197–6205.

БЛАГОДАРНОСТИ

 Автор выражает глубокую благодарность за помощь при выполнении диссертационной работы научному руководителю, д.б.н., заведующему лаборатории структурной биоинформатики ИБМХ, профессору кафедры биоинформатики МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Веселовскому Александру Владимировичу, а также к.б.н., старшему научному сотруднику лаборатории структурной биоинформатики и старшему научному сотруднику Института трансляционной медицины МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Щербинину Дмитрию Сергеевичу.

• Автор выражает искреннюю благодарность академику Национальной академии наук Беларуси, заведующему лабораторией химии стероидов ИБХ НАН республики Беларусь д.х.н. Хрипачу Владимиру Александровичу, а также д.х.н., главному научному сотруднику лаборатории химии стероидов, Жабинскому Владимиру Николаевичу за проведение органического синтеза.

 Автор выражает глубокую благодарность к.б.н., старшему научному сотруднику лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ Мехтиеву Арифу Раминовичу за проведение биологических исследований.

 Автор выражает искреннюю благодарность начальнику лаборатории феромонов АО «Щёлково Агрохим» к.х.н. Стулову Сергею Владимировичу за проведение органического синтеза.

• Автор выражает глубокую благодарность доценту кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, старшему научному сотруднику лаборатории биоэлектрохимии, к.б.н. Кузикову Алексею Владимировичу и доценту кафедры биохимии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, к.б.н. Масамрех Рами Ахмаду.

• Автор выражает искреннюю благодарность за сотрудничество д.б.н., главному научному сотруднику ИБМХ, сотруднику лаборатории синтеза физиологически активных соединений Мишарину Александру Юрьевичу, а также заведующему лабораторией синтеза физиологически активных соединений, к.х.н. Золотцеву Владимиру Александровичу и м.н.с. Латышевой Александре Степановне.

• Автор выражает благодарность Российскому Фонду Фундаментальных Исследований и Российскому Научному Фонду за финансовую поддержку работы (грант РФФИ № 19-34-90057, грант РФФИ № 19-315-70003, грант РФФИ № 20-515-00021 и грант РНФ № 17-75-20250)

• Отдельную благодарность автор выражает своей семье, которая поддерживала его на протяжении выполнения диссертационной работы.