

УДК 577.175.6

ПОИСК ПРОИЗВОДНЫХ ПРОГЕСТЕРОНА, СЕЛЕКТИВНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ЕГО МЕМБРАННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ*

© 2017 А.В. Поликарпова^{1**}, А.А. Маслакова¹, И.С. Левина²,
Л.Е. Куликова², Ю.В. Кузнецов², А.А. Гусева¹, Т.А. Щелкунова¹,
И.В. Заварзин², О.В. Смирнова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: kairo911@gmail.com

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского,
117913 Москва, Россия; электронная почта: li@ioc.ac.ru

Поступила в редакцию 13.07.16

После доработки 10.10.16

Поиск селективных агонистов и антагонистов мембранных рецепторов прогестерона (mPRs) является отправной точкой для изучения механизмов передачи сигнала через mPRs, отличных от ядерных рецепторов. По предварительным данным, специфичность средства этих рецепторов к лигандам существенно отличается от таковой классических ядерных рецепторов прогестерона (nPRs), что говорит о структурных различиях лиганд-связывающих карманов этих белков. В работе исследовали средство ряда производных прогестерона к mPRs в клетках линии ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, для которой характерно отсутствие экспрессии мРНК nPR при наличии высокой экспрессии мРНК mPRs. Полученные величины сравнивали со средством этих соединений к nPRs. Все исследуемые соединения показали практически полное отсутствие средства к nPRs, тогда как по отношению к mPRs избирательность лигандов была различной. Обнаружено, что наиболее селективными по отношению к mPRs оказались соединения с 19-гидроксигруппой и без 3-кетогруппы. Полученные результаты позволяют использовать данные соединения в качестве наиболее селективных аналогов прогестерона для изучения механизмов действия прогестина через mPRs.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембранные рецепторы прогестерона, аналоги прогестерона, линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, синтез.

Прогестерон (прегн-4-ен-3,20-дион), природный прогестин, является одним из основных половых гормонов. У самок прогестерон синтезируется желтым телом яичников, а во время беременности также плацентой, у самцов основным источником прогестерона являются семенники и кора надпочечников. У здоровых женщин концентрация прогестерона зависит от фазы менструального цикла. Следует отметить, что уровень прогестерона во время фолликулярной фазы у женщин аналогичен уровню прогестерона у мужчин и составляет 1–4 нмоль/л. В лютеиновую фазу, благодаря функционированию желтого тела, концентрация прогестерона в крови здоровых женщин повышается и достигает 30–80 нмоль/л [1]. Наиболее изученным меха-

низмом действия прогестерона является регуляция экспрессии генов-мишеней, осуществляемая через ядерные рецепторы. Хорошо известно, что прогестерон может оказывать эффекты, вызывая быструю стимуляцию инициированных на клеточной мембране сигнальных каскадов [2]. В настоящее время можно считать доказанным участие нескольких групп рецепторных белков в передаче гормонального сигнала (помимо nPRs). Это – принадлежащие к семейству рецепторов прогестинов и адипонектина (PAQR) мембранные рецепторы прогестерона пяти типов mPRs α , β , γ , δ , ϵ и компоненты мембранного рецептора прогестерона PGRMC 1 и 2 [3, 4]. mPRs локализованы на наружной плазматической мембране клеток [4]. Известно, что связывающие характеристики α , β и γ типов mPRs сходны по лигандной специфичности [3]. Эффекты прогестинов, опосредуемые mPRs, мало изучены из-за того, что большинство типов клеток содержат как мембранные, так и ядерные

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 16-231, 05.12.2016.

** Адресат для корреспонденции.

рецепторы. Однако есть данные, что в опухолевых клетках ряда тканей прогестерон именно через mPRs ингибирует пролиферацию, стимулирует апоптоз и негативно влияет на процесс канцерогенеза [5, 6]. Показано также, что прогестерон, действуя через разные типы рецепторов, может оказывать разнонаправленное действие на сократительную активность миоэпителия [7]. Поэтому актуальность создания селективных лигандов mPRs, имеющих агонистическую и антагонистическую активность, не вызывает сомнения. К настоящему времени пока не удалось обнаружить полных избирательных агонистов и антагонистов mPRs. Наиболее селективными из протестированных аналогов прогестерона считаются агонисты mPR α Org OD 02-0 (10-этенил-19-норпрогестерон) и Org OD 13-0 (19 α -метилпрогестерон) с индексами дискриминации mPR α /pPRs, составляющими 20 и 40 соответственно [8]. В нашей лаборатории было исследовано сродство ряда прегна-D'пентаранов к рекомбинантному mPR α . Обнаружено, что такие модификации, как замена метильной группы при C10 этильной или метоксигруппой, замена 3-кетогруппы на 3-O-метоксииминовую, а также введение 17 α -гидроксильной группы и дополнительной C6-C7 двойной связи повышают сродство полученных лигандов к mPR α и значительно снижают сродство к pPRs [9].

В продолжение этих исследований был предпринят синтез производных прогестерона (II–X, табл. 1), которые, вероятно, связываются преимущественно с mPRs. Так, синтезированы 3-O-метоксииминопроизводные прогестерона (II, III) и 17 α -гидроксипрогестерона (IV, V), а также аналоги прогестерона без 3-кетогруппы (IX, X), поскольку мы предполагаем, что способности взаимодействия лигандов с mPRs и pPR в области C3 молекулы стероида совершенно различны. По литературным данным, модификация в области C19 оказывала разнонаправленный эффект на сродство стероида к разным типам рецепторов [8, 9], поэтому в трех из новых изученных соединений (VIII–X) имелась 19-гидроксильная группа. Важную роль в связывании стероида с mPR α играет и замещение в 6-положении стероидного ядра. В данной работе были изучены также 2 соединения (VI и VII), имеющие в положении 6 стероидного ядра 6(E)-метоксииминогруппу.

Ранее было показано, что mPNC pPRs не экспрессируются в клетках линии ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека. Тогда как для клеток этой линии была характерна высокая экспрессия mPNC mPR α , mPR β и mPR γ и соответствующих белков [10]. Поэтому мы использовали клеточную линию ВхРС3 в ка-

честве объекта для определения связывающих характеристик mPRs и измерения сродства синтезированных производных прогестерона к его мембранному рецептору. Сравнение проводили с ядерными рецепторами pPRs из цитозольной фракции матки крысы, имеющими сходные с человеческими pPRs связывающие характеристики и аналогичное строение лиганд-связывающего кармана [11, 12]. В отсутствие лиганда pPR локализуется в цитоплазме в олигомерном комплексе с белком теплового шока, кошапероном и белком, относящимся к иммуофилинам [1]. Таким образом, именно цитозольная фракция наиболее богата pPRs.

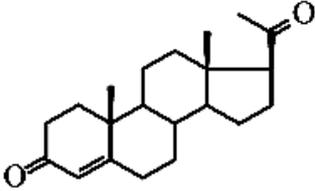
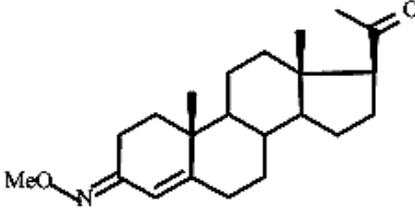
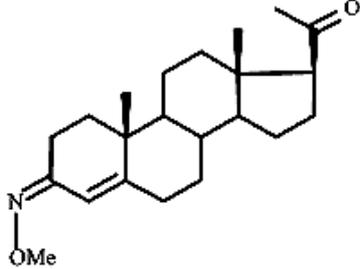
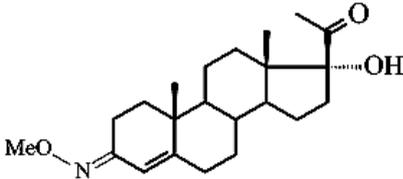
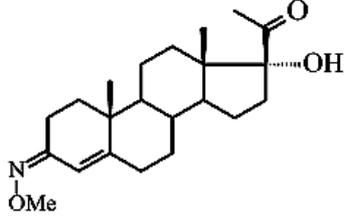
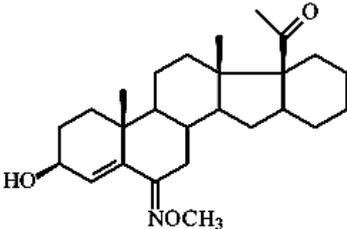
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

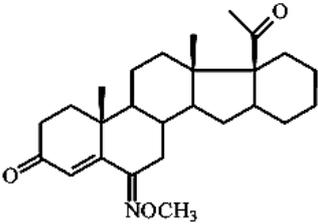
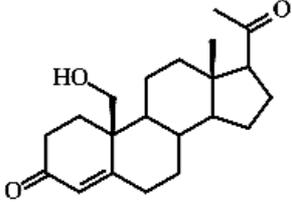
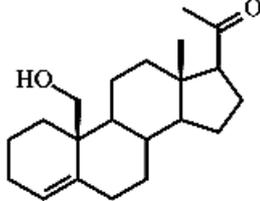
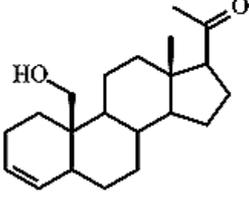
Реактивы. Питательные среды RPMI-1640 (с феноловым красным и без фенолового красного), 100x L-глутамин (L-Glu), 100x смесь антибиотиков и антимикотика, эмбриональная телячья сыворотка (FBS) и эмбриональная телячья сыворотка, обработанная покрытым декстраном углем (DFBS), были получены от «Gibco» (США), фосфатно-солевой раствор Дюльбекко (DPBS Ca²⁺/Mg²⁺) и раствор Версена приобретены у «ПанЭко» (Россия). [1,2-³H]прогестерон с удельной радиоактивностью 40 Ки/ммоль был синтезирован В.П. Шевченко в Институте молекулярной генетики РАН. Прогестерон, кортизол, тестостерон, эстрадиол, мифепристон (17 β -гидрокси-11 β -(4-диметиламино-фенил)-17 α -(1-пропинил) эстра-4,9-диен-3-он), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), дитио-треитол (DTT), ЭДТА, глицерин, Tris приобретены у «Sigma» (США), активированный уголь был получен от «Serva» (Германия), декстран-70 – от «Fluka» (Швейцария).

Синтез производных прогестерона. 3-O-Метоксииминопрогестероны II, III и 3-O-метоксиимино-17 α -гидроксипрогестероны IV, V синтезировали из прогестерона и 17 α -гидроксипрогестерона, соответственно, в три стадии путем селективной защиты 20-оксогруппы этиленкеталем, обработки полученного кетала солянокислым O-метилгидроксиламином и снятием защиты обработкой p-TsOH. Индивидуальные E- и Z-изомеры II, III и IV, V были выделены хроматографически. [13]. 6(E)-Метоксиимино-16 α ,17 α -циклогексанопрегн-4-ен-3 β -ол-20-он VI и 6(E)-метоксиимино-16 α , 17 α -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион VII получены согласно [14]. 19-Гидроксипрогестерон VIII получен согласно [15].

Новые 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он IX и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он X были получены

Таблица 1. Производные прогестерона, использованные в работе

№	Название	Химическая формула
1	2	3
I	Прогестерон	
II	(E)3-O-метоксииминопрогестерон	
III	(Z)3-O-метоксииминопрогестерон	
IV	(E)3-O-метоксиимино-17-гидроксипрогестерон	
V	(Z)3-O-метоксиимино-17-гидроксипрогестерон	
VI	6(E)-метоксиимино-16α,17α-циклогексанопрегн-4-ен-3β-ол-20-он	

1	2	3
VII	6(E)-метоксимино-16 α ,17 α -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион	
VIII	19-гидроксипрогестерон	
IX	19-гидроксипрегн-4-ен-20-он	
X	19-гидроксипрегн-3-ен-20-он	

после хроматографического разделения смеси этих изомерных олефинов, образованных при восстановительном раскрытии эпоксидного цикла 6 β ,19-эпоксипрегн-4-ен-3,20-диона XII (получен в три стадии из ацетата дегидропрегненолона АП [16] избытком активированной Zn-пыли в ледяной АсОН с одновременным элиминированием 3-кетогруппы) (рис. 1). Структуры этих стероидов доказаны совокупностью данных физико-химического анализа. Конфигурация протона Н-5 в соединении X была установлена с помощью экспериментов *ge*-1D NOESY. При этом облучение протона Н-5 (δ 2,51 м.д.) давало отклик на протоны при Н-19 (δ 3,51 и δ 3,80), а облучение протона Н-19 (δ 3,80) давало отклик на Н-5, что однозначно определяет конфигурацию Н-5 как β .

Экспериментальная химическая часть. Температуры плавления определены на микроанализе

на столике «Voetius». Спектры ПМР (δ м.д., CHCl_3 , 30°) регистрировали на спектрометрах «Bruker AM-300» (300,13 МГц для ^1H и 75,5 МГц для ^{13}C) и «Bruker AV-6» (600,13 МГц для ^1H и 150,9 МГц для ^{13}C). В качестве стандарта использовали сигнал остаточного CHCl_3 (δ_{H} 7,27 м.д. и δ_{C} 77,0 м.д.). Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 В) ионах. Диапазон сканирования масс – m/z 50 – 3000 Да, калибровка – внешняя («Electrospray Calibrant Solution», «Fluka»). Растворы веществ в MeOH вводили через шприц (скорость ввода 3 L/min). Газ-распылитель – азот (8 л/мин), температура интерфейса – 200°. Аналитическую ТСХ проводили на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ («Merck») в системах гексан–

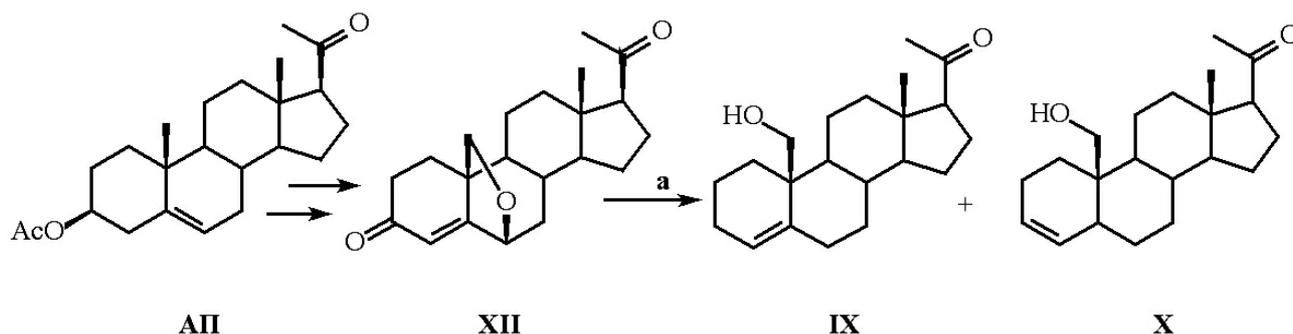


Рис. 1. Схема получения 19-гидроксипрегн-4-ен-20-она (IX) и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-она (X). Реагенты и условия: лед. AcOH, Zn-пыль, 90°, 20 мин

ацетон. Вещества обнаруживали 1%-ным раствором $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ в 10%-ном водном растворе H_2SO_4 с последующим прогревом. Для препаративного разделения использовали хроматографию на колонке с силикагелем Kieselgel 60 (0,063–0,200 мкм) («Merck») при соотношении вещество–сорбент 1 : 40. Ацетат 16-прегненолона **АП** – коммерческий реактив фирмы «Sigma». Растворители очищали по стандартным методикам.

Под обычной обработкой органических экстрактов имеется в виду их промывание до нейтральной реакции промывных вод, высушивание Na_2SO_4 и упаривание в вакууме. Выходы индивидуальных продуктов даны на перекристаллизованные образцы.

К раствору 0,52 г (1,58 ммоль) 6 β ,19-эпокси-прегн-4-ен-3,20-диона **XII** в 15 мл лед. CH_3COOH при перемешивании прибавили 2,48 г (38,0 ммоль) активированной Zn-пыли, нагрели при 90° в течение 20–25 мин и после охлаждения Zn-пыль отфильтровали, осадок промыли метанолом. Остаток после удаления растворителей растворили в хлороформе, выпавший осадок $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ отфильтровали и промыли хлороформом. Полученный после стандартной обработки объединенных фильтратов кристаллический остаток хроматографировали на колонке. При элюировании смесью гексан: ацетон (3→10% ацетона) получено последовательно: 1) 0,08 г (20%) 19-гидроксипрегн-4-ен-20-она **IX** с т.пл. 127–132° (эфир–гексан). Масс-спектр: найдено: m/z 317,2470 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 339,2289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Вычислено: $M = 316,2402$. Спектр ЯМР ^1H : 0,69 с (3 H, 18- CH_3), 2,15 с (3 H, 21- CH_3), 3,57 д и 3,85 д (по 1 H, 19- CH_2 , $J = 9$ Гц), 5,67 м (1 H, H-4). Спектр ЯМР ^{13}C : 13,61 (C-18), 62,82 (C-19), 124,62 (C-4), 138,36 (C-5) и 2) 0,05 г (10%) 19-гидроксипрегн-3-ен-20-она **X** с т.пл. 140–143° (эфир–гексан). Масс-спектр: найдено: m/z 317,2471 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 339,2288 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$; Вычислено: $M = 316,2402$. Спектр ЯМР ^1H : 0,60 с

(3 H, 18- CH_3), 2,09 с (3 H, 21- CH_3), 3,57 д и 3,90 д (по 1 H, 19- CH_2 , $J = 9$ Гц), 5,39 дд (1 H, H-4, $J = 10$ Гц и 2 Гц), 5,66 м (1 H, H-3). Спектр ЯМР ^{13}C : 13,42 (C-18), 35,70 (C-5), 65,92 (C-19), 126,51 (C-4), 132,46 (C-3).

Культивирование клеток. Клеточная линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC). После размораживания клетки культивировали в стандартных условиях (37°, 5% CO_2) в среде RPMI-1640 с феноловым красным, обогащенной 10%-ным FBS + 1x L-Glu + 1x смесь антибиотиков и антимикотика. После третьего пассажа клетки переводили в среду RPMI-1640 без фенолового красного, обогащенную 10%-ным DFBS + 1x L-Glu + 1x смесь антибиотиков и антимикотика. Через три пассажа клетки снимали раствором Версена, осаждали центрифугированием («Jouan CR 3i») при 500 g в течение 7 мин при комнатной температуре, осадок клеток ресуспендировали в DPBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и использовали для анализа связывания с [^3H]прогестероном.

Измерение и анализ связывания [^3H]прогестерона с целыми клетками линии ВхРС3. Суспензию клеток ВхРС3 в DPBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (100–120 тыс. клеток в 100 мкл) инкубировали при комнатной температуре (20–22°) в течение двух часов при постоянном перемешивании со 100 мкл смеси стероидов в буфере DPBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Смесь стероидов состояла из 10 мкл [^3H]прогестерона (конечная концентрация 3–5 нМ) и 90 мкл немеченого прогестерона (концентрации от 0 до 6320 нМ). После инкубации клетки осаждали при 500 g 7 мин при комнатной температуре. Осадок клеток отмывали в 700 мкл DPBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и центрифугировали снова при аналогичных условиях. К осадку клеток добавляли 250 мкл дистиллированной воды и переносили во флакон для счета. Радиоактивность измеряли в 6 мл диоксанового сцинтиллятора «Brag» на жидкостном сцинтилляционном счетчике RackBeta 1217

(«LKB WALLAC» Финляндия). Для каждой экспериментальной точки величину неспецифически связанного [³H]прогестерона, измеренного в присутствии избытка немеченого прогестерона (6320 нМ), вычитали из величины суммарного связывания [³H]прогестерона. Статистическая обработка, расчет величин K_d и V_{max} и построение графиков конкурентного ингибирования были выполнены с помощью программы GraphPad Prism 6 («GraphPad Software Inc», США). Величины относительной конкурентной активности производных прогестерона (ОКА) рассчитывали как отношение K_{d1}/K_{d2} , где K_{d1} — константа диссоциации для прогестерона, K_{d2} — константа диссоциации для исследуемого конкурента.

$$\text{ОКА} = \frac{K_d (\text{прогестерона})}{K_d (\text{исследуемого лиганда})} \times 100\%$$

ОКА прогестерона принимали за 100%. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение на основании трех и более экспериментов. Для сравнения сродства исследуемых аналогов к nPRs и mPRs использовали «индекс дискриминации», рассчитываемый как отношение $\text{ОКА}_{mPRs}/\text{ОКА}_{nPRs}$.

Измерение и анализ связывания [³H] прогестерона с цитозольной фракцией матки. Взрослых самок белых беспородных крыс (150–200 г) подвергали эвтаназии декапитацией. Матки от 3–4 животных со средней общей массой 2 г помещали на лед, измельчали и гомогенизировали с использованием стеклянного гомогенизатора в 10 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 10 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 30%-ный глицерин, 1 мМ DTT и 0,5 мМ PMSF при соотношении ткань/буфер 1 : 6. После центрифугирования при 14 000 g в течение 30 мин при 4° супернатант (цитозоль) с концентрацией белка 2–4 мг/мл собирали и немедленно использовали. Для измерения сродства цитозольную фракцию матки (100 мкл) инкубировали при 4° в течение 20 ч со 100 мкл смеси стероидов, содержащей 10 мкл [³H]прогестерона (конечная концентрация 3–5 нМ) и 90 мкл немеченого конкурента (конечные концентрации от 0 до 6320 нМ). Связанный белком и свободный [³H]прогестерон разделяли обработкой инкубационной смеси 2%-ной суспензией активированного угля, покрытого 0,4%-ным декстраном (100 мкл), в течение 5 мин при 4°, после чего уголь осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин. В аликвотах надосадочной фракции (200 мкл) измеряли содержание радиоактивности и проводили анализ аналогично описанному выше для клеток VxPC3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Радиолигандный анализ с использованием [³H]прогестерона показал наличие в клетках линии VxPC3 белка, специфически связывающего прогестерон. В виду того, что в клетках данной культуры была обнаружена достаточно высокая экспрессия мРНК глюкокортикоидных рецепторов ($384 \pm 23\%$ от уровня мРНК GAPDH [10]), для подтверждения того, что белок, связывающий прогестерон, представляет собой именно mPRs, а не рецепторы глюкокортикоидов или андрогенов, в качестве конкурирующих лигандов были использованы стероиды основных классов. На рис. 2 представлены кривые конкуренции между [³H]прогестероном и основными стероидами. В табл. 2 представлены относительные конкурентные активности (ОКА) немеченых тестостерона, эстрадиола, кортизола и антагониста nPRs мифепристона. Практически полное отсутствие сродства эстрадиола ($\text{ОКА} = 1,6 \pm 0,7\%$) и кортизола ($\text{ОКА} = 0,5 \pm 0,4\%$) к исследуемому белку говорит о том, что белок, специфически связывающий [³H]прогестерон представляет собой mPRs. Низкое сродство мифепристона ($\text{ОКА} = 5,1 \pm 1,3\%$) и умеренное сродство тестостерона ($\text{ОКА} = 10,2 \pm 1,7\%$) также характерно для mPRs и согласуется с литературными данными, полученными для клеток линии MDA-MB-231 с высокой экспрессией mPR α в результате трансфекции соответствующим геном [4]. По результатам 14 экспериментов равновесная константа диссоциации K_d прогестерона с mPRs составила $141,6 \pm 43,5$ нМ, а концент-

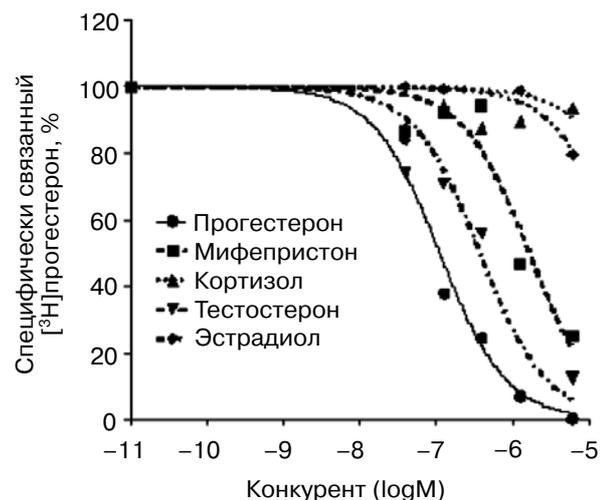


Рис. 2. Кривые конкурентного связывания стероидов основных классов с mPR в клетках линии VxPC3, выраженные в процентах от максимального специфического связывания [³H]прогестерона

Таблица 2. Относительная конкурентная активность (ОКА) стероидов основных классов к mPR в клетках линии VxPC3

Стероид	ОКА mPR, %*
Прогестерон	100
Мифепристон	5,1 ± 1,3 (3)
Тестостерон	10,2 ± 1,7 (3)
Эстрадиол	1,6 ± 0,7 (3)
Кортизол	0,5 ± 0,4 (3)

* Среднее значение ± стандартное отклонение (количество измерений).

рация связывающих участков V_{max} составила $6,1 \pm 3,9$ нМ. Сходные результаты были получены для рецептора mPR α , экспрессированного в клетках CHO, где K_d для прогестерона составила 122 ± 50 нМ [17]. В желтом теле крысы, содержащем гомолог mPR α , K_d для прогестерона составила 162 ± 20 нМ [18]. Кроме того, в проведенном ранее в нашей лаборатории исследовании человеческого mPR α , экспрессированного в пекарских дрожжах, K_d для прогестерона составляла 143 ± 43 нМ [9]. Таким образом, определенные нами связывающие характеристики соответствуют данным литературы для mPRs.

На рисунках 3 и 4 представлены результаты типичных экспериментов по вытеснению [3H]прогестерона из комплексов с mPRs клеток ли-

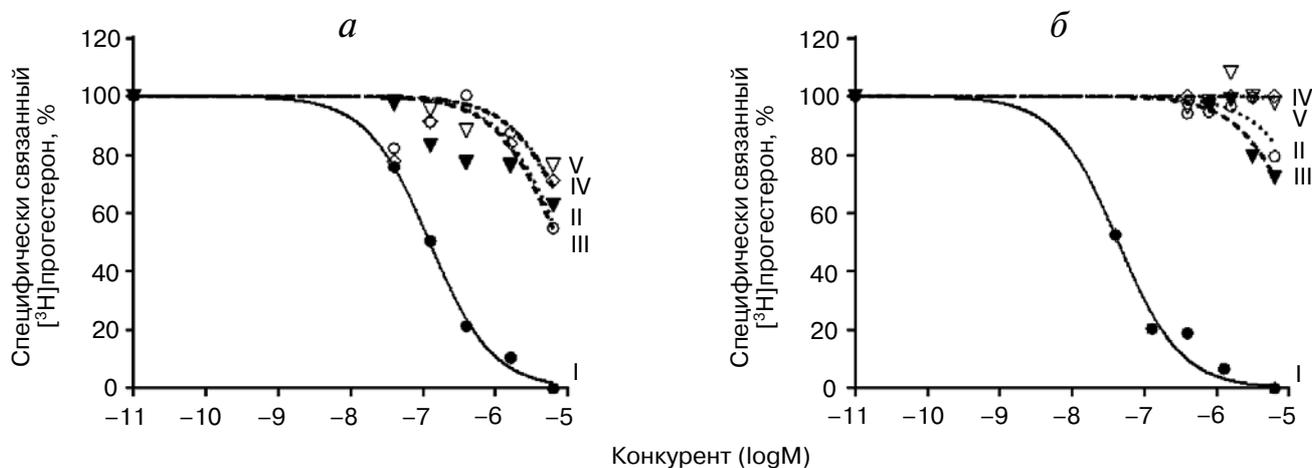


Рис. 3. Кривые конкурентного связывания лигандов. *a* – mPR в клетках линии VxPC3; *б* – pPR в цитозольной фракции матки крысы, выраженные в процентах от максимального специфического связывания [3H]прогестерона. Числа рядом с кривыми соответствуют номерам соединений в табл. 1

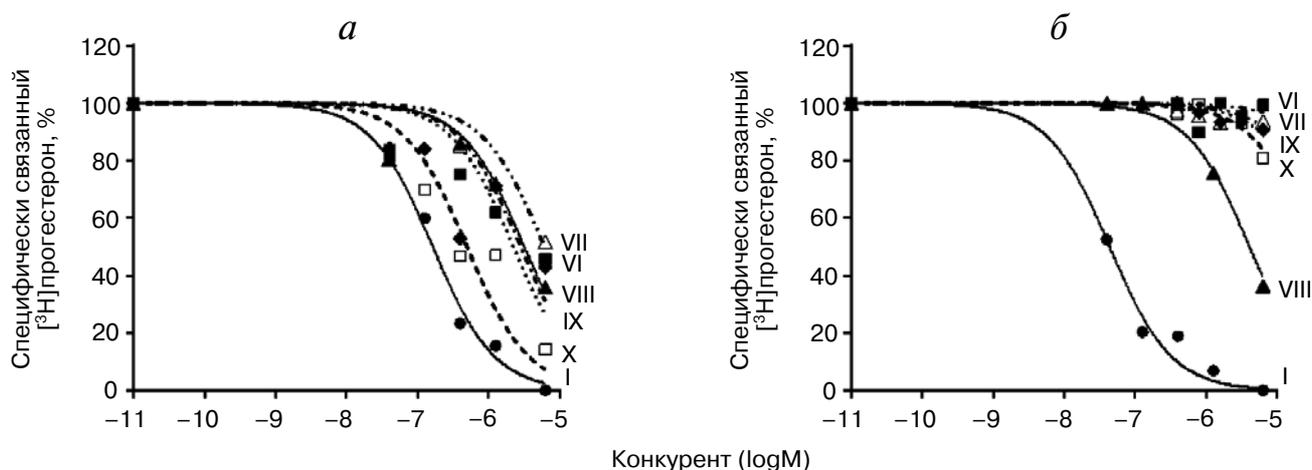


Рис. 4. Кривые конкурентного связывания лигандов. *a* – mPR в клетках линии VxPC3; *б* – pPR в цитозольной фракции матки крысы, выраженные в процентах от максимального специфического связывания [3H]прогестерона. Числа рядом с кривыми соответствуют номерам соединений в табл. 1

нии ВхРСЗ (*a*) и из комплексов с nPRs цитозольной фракции матки крысы (*b*) немеченым прогестероном и его аналогами. Объединенные количественные характеристики для каждого соединения представлены в табл. 3. Можно видеть, что все девять исследуемых соединений (II–X, табл. 1) предпочтительнее связываются с mPRs и обладают индексами дискриминации, превышающими таковой для прогестерона. Замена 3-кетогруппы 3-*O*-метоксииминовой (соединения II и III) приводит к снижению сродства полученных *E*- и *Z*-изомеров как к mPRs, так и к nPRs, обеспечивая индексы дискриминации mPRs/nPRs, равные 31 и 16 соответственно. Дополнительное введение 17 α -гидроксильной группы (соединения IV и V) еще больше снижало ОКА этих соединений по отношению к обоим типам рецепторов, однако индексы дискриминации mPRs/nPRs оставались неизменными (37 и 16 соответственно).

Сочетание 6-метоксииминогруппы и дополнительного 16 α ,17 α -карбоцикла (соединения VI и VII) снижает сродство полученных производных к обоим типам рецепторов, что можно видеть по ОКА этих соединений к mPRs и к nPRs. Однако, ввиду практически полного отсутствия связывания соединения VI с nPRs, этот аналог обладает наибольшим из полученных индексом дискриминации mPRs/nPRs, равным 117.

19-гидроксипрогестерон (соединение VIII) демонстрирует умеренно низкое сродство к обоим типам рецепторов и обладает наименьшим по сравнению с остальными производными индексом дискриминации mPR/nPR, равным 4. Одновременное с введением 19-гидроксильной группы удаление 3-кетогруппы (соединение IX) приводит к повышению сродства к mPRs и снижению сродства к nPRs, обеспечивая индекс дискриминации mPRs/nPRs 52. Сочетание вышеуказанных модификаций с изменением положения двойной связи в кольце А (соединение X) еще больше повышает сродство к mPRs, давая индекс дискриминации mPRs/nPRs, равный 80. Из протестированных производных соединение X (19-гидроксипрегн-3-ен-20-он) демонстрирует наиболее предпочтительное сочетание модификаций стероидной молекулы для дальнейшего повышения избирательности лиганда по отношению к mPRs.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для выявления аналогов прогестерона, наиболее селективных по отношению к его мембранным рецепторам, проводили сравнение сродства девяти синтезированных прогестинов (II–X,

Таблица 3. Относительная конкурентная активность (ОКА) исследуемых производных к ядерным и мембранным рецепторам прогестерона и предпочтительность связывания лигандов OKA_{mPR}/OKA_{nPR} (индекс дискриминации)

Соединение	ОКА nPR, %*	ОКА mPR, %*	Индекс дискриминации OKA_{mPR}/OKA_{nPR}
Прогестерон (I)	100 ($K_d = 30,7 \pm 7,9$ нМ (9))	100 ($K_d = 141,6 \pm 43,5$ нМ (14))	1
(E)3- <i>O</i> -метоксииминопрогестерон (II)	0,08 \pm 0,03 (5)	2,5 \pm 1,4 (4)	31
(Z) 3- <i>O</i> -метоксииминопрогестерон (III)	0,15 \pm 0,12 (4)	2,4 \pm 1,2 (4)	16
(E)3- <i>O</i> -метоксиимино-17 α -прогестерон (IV)	0,03 \pm 0,015 (4)	1,1 \pm 0,9 (4)	37
(Z)3- <i>O</i> -метоксиимино-17 α -прогестерон (V)	0,09 \pm 0,05 (5)	1,4 \pm 0,5 (4)	16
6(E)-метоксиимино-16 α ,17 α -циклогексанопрэгн-4-ен-3 β -ол-20-он (VI)	0,03 \pm 0,01 (3)	3,5 \pm 0,5 (4)	117
6(E)-метоксиимино-16 α ,17 α -циклогексанопрэгн-4-ен-3,20-дион (VII)	0,05 \pm 0,01 (3)	2,2 \pm 0,9 (3)	44
19-гидроксипрогестерон (VIII)	1,1 \pm 0,2 (3)	4,0 \pm 2,5 (3)	4
19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (IX)	0,2 \pm 0,16 (3)	10,3 \pm 6,6 (5)	52
19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (X)	0,3 \pm 0,2 (3)	23,9 \pm 14,3 (5)	80

* Среднее значение \pm стандартное отклонение (количество измерений).

табл. 1) к mPRs и nPRs, экспрессируемым в клетках линии аденокарциномы поджелудочной железы человека и в клетках матки крыс соответственно. Такое сравнение представляется целесообразным, так как nPRs матки крысы, имеет сходные с человеческими nPRs связывающие характеристики и аналогичное строение лигандсвязывающего кармана [11, 12]. В нашей работе величины K_d для взаимодействия прогестерона с nPRs и mPRs составили 30,7 и 141,6 нМ соответственно, т.е. сродство прогестерона к nPRs превышает таковое к mPRs приблизительно в 5 раз, что соответствует известным литературным данным [4]. Специфичность сродства изученных нами рецепторов в клетках линии VxPC3 в отношении кортизола, тестостерона, эстрадиола и мифепристона практически не отличалась от известной по литературным данным специфичности mPRs [4, 8]. Таким образом, выявляемое нами связывание обусловлено mPRs, принадлежащими к семейству рецепторов прогестинов и адипонектина человека (PAQR).

Для изучения механизмов действия прогестинов важно создание аналогов прогестерона, селективных в отношении mPRs. Δ^4 -3-кетогруппа является важной детерминантой взаимодействия лиганда с nPRs, формируя водородные связи с аминокислотными остатками лигандсвязывающего кармана рецептора [19]. Было показано, что увеличение размера заместителя при C3 пропорционально снижает сродство лиганда к nPRs [20]. По результатам проведенного нами исследования по влиянию различных заместителей на сродство полученных производных к nPRs и mPR α [9] было выдвинуто предположение о наличии полости около C3 в лигандсвязывающем кармане mPR α . Ожидалось, что (E)3-*O*-метоксииминопрогестерон (II) и (Z) 3-*O*-метоксииминопрогестерон (III), имеющие вместо 3-кетогруппы 3-*O*-метоксииминную группу, будут демонстрировать высокие индексы дискриминации mPRs/nPRs. Однако в нашей работе эти соединения показали низкое сродство к mPRs при практически полном отсутствии сродства к nPRs.

Наибольшим сродством к mPRs обладали соединения, не содержащие 3-кетогруппы: 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (IX) и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (X). Этот результат подтверждает гипотезу об имеющихся между двумя типами рецепторов различиях в лиганд-рецепторном взаимодействии. Очевидно, что наличие сети водородных связей в области C3 не является обязательным для взаимодействия лиганда с mPRs, в отличие от nPRs. Введение 17 α -гидрокси-группы, как и ожидалось, снизило сродство (E)3-*O*-метоксиимино-17 α -прогестерона (IV) и (Z)3-*O*-ме-

токсиимино-17 α -прогестерона (V) как к mPRs, так и к nPRs в сравнении с (E)3-*O*-метоксииминопрогестероном (II) и (Z) 3-*O*-метоксииминопрогестероном (III). Однако предположение о том, что эффект будет значительно более выражен в отношении nPRs [9], не подтвердилось. Таким образом, 17 α -гидроксигруппа не обеспечила увеличение индекса дискриминации.

Модификации стероидной молекулы при C19, как было показано ранее, существенно влияют на сродство ее к разным типам рецепторов. Было показано, что введение гидрофильного заместителя при C19 снижает сродство полученного лиганда как к nPRs [20], так и к mPRs [8]. Однако похоже, что этот эффект значительно менее выражен в случае взаимодействия 19-гидроксипрогестерона (VIII) с mPRs, поскольку введение 19-гидроксигруппы повышало индекс дискриминации mPRs/nPRs в 4 раза (табл. 3). Для дальнейшего повышения избирательности по отношению к mPRs можно использовать введение гидрофобного заместителя в область C19, так как 19-метилпрогестерон не обладал агонистической активностью к nPRs [8], а при изучении влияния 19-метила на сродство 16 α ,17 α -циклоалканов обнаружилось повышение индекса дискриминации mPR α /nPRs с 0,05 до 83,7 [9].

Было показано, что введение заместителя в 6 положение кольца B дает некоторую предпочтительность в связывании с mPR α : введение 6 α -метильной группы приводило к снижению сродства 16 α ,17 α -циклогексанопротестерона к nPRs и увеличивало индекс дискриминации mPR α /nPRs [9, 20]. Однако сама 16 α ,17 α -циклогексановая группа снижала сродство стероидов к mPRs и не оказывала существенного влияния на сродство к nPRs. Введение замещенной оксимной группы в положение C6 стероида приводит к изменению общей геометрии стероидного кольца, приводящей к практически полному подавлению связывания с nPRs, но не мешающей взаимодействию с mPRs (табл. 3). В наших экспериментах соединения (VI) и (VII) с 6(E)-метоксииминогруппой и дополнительным 16 α ,17 α -циклогексановым циклом D' практически не связывались с nPRs и давали высокий индекс дискриминации (117 и 44, соответственно). Подобные модификации могут послужить резервом для повышения избирательности производных прогестерона к mPRs.

Таким образом, несмотря на полученные ранее результаты с соединениями, имеющими дополнительный 16 α ,17 α -карбоцикл D' [9], мы обнаружили, что замена 3-кетогруппы на 3(E или Z)-*O*-метоксииминную в производных самого прогестерона, приводит к значительному

снижению сродства таких соединений к mPRs и поэтому не подходит для создания селективных лигандов этих рецепторов. Указанные расхождения, возможно, связаны с различиями в углеводном скелете использованных стероидов.

Введение дополнительной 17 α -гидроксильной группы в равной степени понижало сродство полученных лигандов как к mPRs, так и к pPRs, а, следовательно, тоже оказалось неэффективным для увеличения индекса дискриминации (табл. 3). Однако в настоящей работе мы нашли новые модификации стероидной молекулы прогестерона, позволяющие усилить ее сродство к изучаемому типу рецепторов. Удаление 3-кетогруппы (соединения IX и X), а также введение оксимной группы при C6 соединения (VI и VII) благоприятно влияет на предпочтительность связывания полученных производных с mPRs, по сравнению с pPRs. 3-дезоксо-соединения IX и X с индексами дискриминации 52 и 80 соответственно оказались более избирательными по отношению к mPRs, по сравнению с описанными ранее 10-этил-19-норпрогестероном и 19 α -метилпрогестероном, индексы дискриминации которых составляли 20 и 40 соответственно [8]. Следует отметить также, что в

отличие от упомянутых соединений [8], 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (IX) и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (X) практически не связываются с pPRs, а, следовательно, могут действовать исключительно через mPRs. И это особенно важно в тех случаях, когда предполагается разнонаправленное действие прогестинов, осуществляемое через разные типы рецепторов, как например, на пролиферацию и апоптоз клеток некоторых опухолевых тканей [5, 6]. Возможно также дальнейшее повышение избирательности лигандов, основанное на одновременном сочетании наиболее перспективных модификаций, а именно, удалении 3-кетогруппы, введении гидрофобного заместителя при C19 вместо 19-гидрокси-группы и оксимной группы при C6. По-прежнему не исключается положительное влияние введения двойной связи C6-C7, а также модификаций C18 на предпочтительное связывание производных прогестерона с mPRs по сравнению с pPRs.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами РФФИ (14-04-01021 и 14-04-31589).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смирнов А.Н. (2006) Элементы эндокринной регуляции, Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", Москва, стр. 338.
- Токмаков А.А., Фуками Я. (2009) Внегеномные механизмы действия прогестерона, *Цитология*, **51**, 403–416.
- Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237–2242.
- Thomas, P., Pang, Y., Dong, J., Groenen, P., Kelder, J., De Vlieg, J., Zhu, Y., and Tubbs, C. (2007) Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins, *Endocrinology*, **148**, 705–718.
- Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D.G. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 62–73.
- Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., Wang, J., Brat, D.J., and Stein, D.G. (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: *in vitro* and *in vivo* evidence, *Mol. Med.*, **17**, 1084–1094.
- Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E.W., Randeve, H.S., and Thomas, P. (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1519–1534.
- Kelder, J., Azevedo, R., Pang, Y., de Vlieg, J., Dong, J., and Thomas, P. (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclearprogesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists, *Steroids*, **75**, 314–322.
- Lisanova, O.V., Shchelkunova, T.A., Morozov, I.A., Rubtsov, P.M., Levina, I.S., Kulikova, L.E., and Smirnov, A.N. (2013) Approaches to the design of selective ligands for membrane progesterone receptor alpha, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 236–243.
- Goncharov, A.I., Maslakova, A.A., Polikarpova, A.V., Bulanova, E.A., Guseva, A.A., Morozov, I.A., Rubtsov, P.M., Smirnova, O.V., and Shchelkunova, T.A. (2017) Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation-related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **165**, 293–304.
- Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф., Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В. (2002) Видовые и тканевые особенности распределения белков, связывающих 16 α , 17 α -циклоалкановые производные прогестерона, *Биоорг. хим.*, **28**, 251–257.
- Федюшкина И.В., Скворцов В.С., Ромеро Рейес И.В., Левина И.С. (2013) Молекулярный докинг и 3D-QSAR производных 16 α -, 17 α -циклоалканопрогестеронов как лигандов рецепторов прогестерона, *Биомед. хим.*, **59**, 622–635.
- Золотцев В.А., Заварзин И.В., Ширинян В.З., Левина И.С. (2013) Синтез E- и Z-изомерных 3-O-метилоксимов прогестерона, *Изв. АН. Сер. Хим.*, **9**, 2086–2087.
- Семейкин А.В., Федотчева Т.А., Левина И.С., Куликова Л.Е., Заварзин И.В., Тихонов Д.А., Карева Е.Н.,

- Шимановский Н.Л. (2014) Синтез и цитостатическая активность ряда прегна-D⁷-пентаранов на культуре клеток HeLa, *Хим.-фарм. журн.*, **48**, 9–13.
15. Kirk, D.N., Rajagopalan, M.S., and Varley M.J. (1983) An improved route to 19-hydroxypregn-4-ene-3,20-dione and synthesis of its [19-²H₂] analogue, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 2225–2227.
 16. Bagli, J.F., Morand, P.F., and Gaudry, R. (1963) Synthetic studies on C-19 oxygenated pregnanes, *J. Org. Chem.*, **28**, 1207–1217.
 17. Ashley, R.L., Arreguin-Arevalo, J.A., and Nett, T.M. (2009) Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **7**, 42.
 18. Cai, Z., Stocco, C.O. (2005) Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum, *Endocrinology*, **146**, 5522–5532.
 19. Whilliams, S.P., and Sigler, P.B. (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor, *Nature*, **393**, 392–396.
 20. Levina, I.S., Pokrovskaya, E.V., Kulikova, L.E., Kamernitzky, A.V., Kachala, V.V., and Smirnov, A.N. (2008) 3- and 19-Oximes of 16 α ,17 α -cyclohexanoprogestosterone derivatives: synthesis and interactions with progesterone receptor and other proteins, *Steroids*, **73**, 815–827.

SELECTION OF PROGESTERONE DERIVATIVES SPECIFIC TO MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTORS

A. V. Polikarpova^{1*}, A. A. Maslakova¹, I. S. Levina²,
L. E. Kulikova², Y. V. Kuznetsov², A. A. Guseva¹,
T. A. Shchelkunova¹, I. V. Zavarzin², and O. V. Smirnova¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: kairo911@gmail.com

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy
of Sciences, 117913 Moscow, Russia; E-mail: li@ioc.ac.ru

Received July 13, 2017

Revision received October 10, 2016

The search for selective agonists and antagonists of membrane progesterone receptors (mPRs) is the starting point for the study of progesterone signal transduction mechanisms mediated by mPRs, which are distinct from nuclear progesterone receptors (nPRs). This suggests structural differences in the ligand-binding pocket of these proteins. In this study, several progesterone derivatives were assayed in terms of their affinity for mPRs of human pancreatic adenocarcinoma BxPC3 cells, which are characterized by the high expression of mPR mRNA and by the absence of expression of nPR mRNA. The determined values were compared with the affinity of these compounds for nPRs. All the tested compounds showed almost complete lack of affinity for nPRs, whereas they have various selectivity as ligands for mPRs. It was found that derivatives with an additional 19-hydroxy group and removed 3-keto group had the highest selectivity for mPRs. These results allow the use of these steroids as the most selective progesterone analogs for studying the mechanisms of progestin effects via mPRs.

Keywords: membrane progesterone receptors, progesterone analogs, human pancreatic adenocarcinoma BxPC3 cell line, synthesis