

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА В РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ ПРОГЕСТЕРОНА

УДК 616.831

<https://doi.org/10.7816/RCF17465-74>© М.А. Петросян¹, Д.А. Белинская², К.И. Таборская³, П.Д. Шабанов^{4, 5}¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург;² ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург;³ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России, Санкт-Петербург;⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Петросян М.А., Белинская Д.А., Таборская К.И., Шабанов П.Д. Метод молекулярного докинга в разработке новых аналогов прогестерона // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 65–74. <https://doi.org/10.7816/RCF17465-74>

Поступила: 17.10.2019

Одобрена: 14.11.2019

Принята: 18.12.2019

Целью работы стало проведение молекулярного докинга гестагенных препаратов и родственных им соединений к рецептору прогестерона человека изоформы А и оценка использования этого метода для поиска высокоактивных прогестинов. С помощью программы Autodock 4.2 был проведен молекулярный докинг прогестерона, а также родственных ему 13 соединений, в разных степенях проявляющие гестагенную/антигестагенную активность (мегестрола ацетат, Амол, бутират Амола, медроксипрогестерон-17-ацетат, левоноргестрел, 6 α -метил-16 α ,17 α -циклогексанопрогестерон, 16 α ,17 α -циклопентанопрогестерон, 16 α ,17 α -циклогексанопрогестерон, пролигестон, 16 α ,17 α -циклогекс-3'-енопрогестерон, идрогестерон, ифепристон, улипристала ацетат). Расчеты теоретических констант диссоциации комплексов лиганд–рецептор прогестерона показали,

что с помощью программы Autodock 4.2 на ранних этапах исследования можно оценивать вероятность активности того или иного соединения-кандидата, но делать это необходимо с осторожностью, принимая во внимание отсутствие связи констант диссоциации с гестагенной активностью аналогов прогестерона. Кроме того, метод позволяет выявить соединения, которые при взаимодействии с рецептором прогестерона меняют положение его аминокислотных остатков в лиганд-связывающем домене (возможно имеют другой механизм действия), а также вещества, которые не взаимодействуют с агонистической формой рецептора вследствие других причин.

◆ **Ключевые слова:** аналоги прогестерона; докинг; рецептор прогестерона; константа диссоциации; прогестерон; мифепристон; левоноргестрел.

METHOD OF MOLECULAR DOCKING IN THE DESIGN OF NEW PROGESTERONE ANALOGUES

© M.A. Petrosyan¹, D.A. Belinskaia², K.I. Taborskaia³, P.D. Shabanov^{4, 5}¹ Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia;² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, Saint Petersburg, Russia;³ State Research Test Institute of Military Medicine, Saint Petersburg, Russia;⁴ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;⁵ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Petrosyan MA, Belinskaia DA, Taborskaia KI, Shabanov PD. Method of molecular docking in the design of new progesterone analogues. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(4):65-74. <https://doi.org/10.7816/RCF17465-74>

Received: 17.10.2019

Revised: 14.11.2019

Accepted: 18.12.2019

The aim of this study is to carry out the molecular docking of gestagenic preparations and structurally related compounds to the isoform A of human progesterone receptor and to assess the applicability of this method for the active progestins search. Docking was done (using Autodock 4.2) of progesterone and 13 compounds with different gestagenic/antigestagenic activity (megestrol acetate; (3 β)-3-Hydroxy-6-methyl-20-oxopregna-4,6-dien-17-yl acetate (AMOL); Medroxyprogesterone-17-acetate;

Levonorgestrel; Dydrogesterone; RU-486; Ulipristal acetate; (3 α)-17-Acetoxy-6-methyl-20-oxopregna-4,6-dien-3-yl butyrate; 16 α ,17 α -Cyclohexanoprogesterone; 6 α -Methyl-16 α ,17 α -cyclohexanoprogesterone; Proligestone; 16 α ,17 α -Cyclopentanoprogesterone; 16 α ,17 α -Cyclohex-3'-enoprogesterone). Calculations of theoretical dissociation constants (Kd) of ligand-progesterone receptor complexes showed that it is possible to evaluate the probability of activity of a candidate compound using the Autodock 4.2

program, but it requires caution, taking into account the lack of the link between K_d and gestagen activity. In addition, the method allows to identify compounds that change the position of amino acid residues in the ligand-binding domain of PR-A after binding (that is possibly have a different mechanism of action), as well as substances that do

not interact with the agonistic form of the receptor due to other causes.

◆ **Keywords:** analogues of progesterone; docking; human progesterone receptor; dissociation constant; progesterone; mifepristone; levonorgestrel.

ВВЕДЕНИЕ

Аналоги прогестерона (гестагенные препараты) занимают ведущее место в профилактике и лечении многих гинекологических заболеваний, они незаменимы в акушерской практике, в программах экстракорпорального оплодотворения, онкогинекологии, а также в качестве компонентов комбинированных контрацептивных средств. Несмотря на их разнообразие, не многие проявляют высокую эффективность и вместе с тем безопасность. Выбор гестагена в акушерской практике ограничен лишь двумя препаратами. Доказательную базу эффективности в терапии эндометриоза имеет лишь один гестаген. В связи с этим поиск и разработка новых высокоактивных и безопасных аналогов прогестерона является, несомненно, актуальным.

Для выявления соединений, обладающих гестагенной активностью, разработано несколько надежных *in vivo* методов. Тест Клауберга–Макфейла позволяет оценить влияние новых соединений на дифференцировку эндометрия эстрогенизированных неполовозрелых самок кроликов (в классическом варианте) или крыс (при модификации теста). В тесте Клауберга–Макфейла определяется способность исследуемых соединений сохранять беременность у овариэктомизированных кроликов (при модификации теста — крыс) [4, 12]. Золотым стандартом является тест Клауберга–Макфейла. Все потенциальные кандидаты в класс гестагенных препаратов проходят тестирование именно этим методом. При отборе новых молекул учитывается степень влияния препарата на секреторную трансформацию эндометрия, отражающую гестагенную активность соединения. Метод является трудоемким, дорогостоящим и требует большого числа модельных животных. Это ограничивает проведение скрининговых исследований и препятствует быстрому выявлению молекул-лидеров. Разрабатываемая нами клеточная модель для тестирования гестагенов несомненно ускорит поиск эффективных соединений, однако не позволит оценить ориентацию лиганда в процессе связывания с рецептором прогестерона [6].

Использование на первичном этапе исследований компьютерных технологий не только сократит время и стоимость исследований, но и позволит определить направление синтеза молекулы с заданными фармакологическими свойствами. Подобные работы широко описаны в литературе, однако среди аналогов прогестерона они единичны и были проведены для представителей определенного ряда гестагенов — прегна- D' -пентанов [11, 13]. Авторы, используя различные

компьютерные методы, разработали математические модели для отбора новых стероидов с заданной аффинностью к рецептору прогестерона. При создании моделей предсказания ими были использованы значения относительной конкурентной активности, рассчитанные по соотношению констант диссоциации (K_d) для прогестерона и сравниваемого лиганда. Однако известно, что экспериментально полученные K_d не всегда совпадают с относительной биологической активностью (ОБА) стероида [3], которая является прямой характеристикой гестагенной активности соединения и рассчитывается по соотношению ED_{50} , соответствующей индексу Макфейла, равному 2, для прогестерона и его аналога. В данной работе теоретически рассчитанные значения K_d гестагенов сопоставляли и с экспериментально полученной K_d , и с ОБА, рассчитанной в тесте Клауберга–Макфейла. При формировании выборки гестагенов мы использовали соединения, имеющие значительные структурные различия и, как следствие, разную степень ОБА. Широкий диапазон анализируемых гестагенов позволит лучше оценить надежность предсказательной модели при оценке новых соединений.

Целью исследования явилось проведение молекулярного докинга ряда известных гестагенных препаратов и родственных им соединений к рецептору прогестерона человека и оценка возможности использования этого метода для поиска высокоактивных прогестинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа были выбраны 13 соединений прегнанового, норстероидного ряда, а также родственные им соединения, в разной степени проявляющие гестагенную/антигестагенную активность:

1) мегестрола ацетат (в отличие от прогестерона имеет дополнительную ацетокси группу у атома С17, двойную связь между атомами С6 и С7 и метильную группу у атома С6);

2) Амол (те же изменения в структуре по сравнению с прогестероном, что и у мегестрола ацетата, но вместо кетогруппы у атома С3 — гидроксигруппа);

3) бутират Амола (эфир Амола, имеющий у атома С3 эфирную связь с соответствующей алкильной группой);

4) медроксипрогестерон-17 ацетат (отличается от мегестрола ацетата отсутствием двойной связи между атомами С6 и С7, а, следовательно, имеет другую конформацию В-кольца);

5) 16 α , 17 α -циклогексанопрогестерон (по сравнению с прогестероном имеет еще одно шестичленное кольцо, относится к прегна-D'-пентаранам);

6) 16 α , 17 α -циклогекс-3-енопрогестерон (относится к прегна-D'-пентаранам, двойная связь в дополнительном шестичленном цикле);

7) 6 α -метил 16 α , 17 α -циклогексанопрогестерон (прегна-D'-пентаран);

8) 16 α , 17 α -циклопентанопрогестерон (по сравнению с прогестероном имеет еще одно пятичленное кольцо, относится к прегна-D'-пентаранам);

9) пролигестон (трехчленное кольцо с метильной группой у D-кольца);

10) левоноргестрел (производное 19-нортестостерона, дополнительная этильная группа у атома C17, содержит на одну меньше метильных групп у D-кольца; еще одна метильная группа у атома C18; имеет не активный стереоизомер с группой OH под плоскостью кольца);

11) дидрогестерон — структурно наиболее из всех близок к прогестерону, отличается тем, что атом водорода у атома C9 находится в бета-положении, а метильная группа у атома C10 занимает альфа-положение, что противоположно их положению в молекуле прогестерона (отсюда и другое название — «ретро»-прогестерон, или зеркальное отражение молекулы прогестерона);

12) мифепристон, или RU486, — синтетический C19 стероид с мощным антиглюкокортикоидным и антигестагенным действием; его относят к PRM (Progesterone Receptor Modulators) — модуляторам рецептора прогестерона [20]. Предполагается, что его антагонистичное действие происходит при связывании в лиганд-связывающем домене (ЛСД) и увеличении гибкости спирали H12, за счет чего увеличивается ее способность связываться с ко-репрессором. Кроме того, было показано, что белок JDP-2, связывающийся в неупорядоченном N-концевом участке рецептора прогестерона, может активировать частичную агонистическую активность RU486 и что для этого необходимо фосфорилирование Ser400 [23];

13) улипристала ацетат — производное 19-норпрогестерона; связывается с прогестероновыми рецепторами с аффинитетом, похожим на мифепристон, в отличие от которого имеет ослабленное глюкокортикоидное действие; задерживает фолликулогенез и нарушает созревание эндометрия; его относят к SPRM (Selective Progesterone Receptor Modulators) — селективным модуляторам рецептора прогестерона. Он имеет этаноильную группу у атома C17 на месте этильной группы мифепристона [21, 22].

Для прогнозирования значений K_d аналогов прогестерона и их положения в ЛСД рецептора прогестерона А (РП-А) использовали метод молекулярного докинга, который осуществили с помощью программы Autodock 4.2 (Научно-исследовательский институт Скриппса, www.scripps.edu). Данная

программа зарекомендовала себя во многих исследованиях, в том числе и при докинге лигандов к стероидным рецепторам [15]. Подготовку данных и анализ результатов проводили, используя различные программные обеспечения, находящееся в свободном доступе для академического использования.

Для подготовки к докингу структур лигандов и рецептора использовали программное обеспечение Hyperchem (<http://www.hyper.com/Products/tabid/354/Default.aspx>) и VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Структуры лигандов графически изображали на основе структуры прогестерона, полученного из файла с рентгеноструктурным анализом (PCA) (1A28) из базы данных Protein Data Bank (www.rcsb.org). Затем в Hyperchem добавляли интересные нас заместители, атомы водорода и проводили геометрическую оптимизацию исследуемых соединений с помощью алгоритма Полака–Рибьера. Для докинга использовали данные PCA А-цепи рецептора прогестерона человека (1A28). В программе VMD достраивали аминокислотные остатки в молекуле белка.

Способ проведения докинга — генетический алгоритм. Количество запусков генетического алгоритма — 50 раз. Максимальное число вычислений — 25 000 000. За центр трехмерной решетки принимали середину молекулы прогестерона из кристаллической структуры. В исследуемом центре связывания белка строили решетку аппроксимации размером 60 узлов в x-, y- и z-направлениях с шагом 0,375 Å. После проведения докинга производили процедуру рекластеризации для распределения 50 сгенерированных программой конформаций по группам (кластерам). Для этого задавался показатель $rms = 0,5 \text{ \AA}$, чтобы конформации в кластере были однотипными. После рекластеризации отбирали лучшие по энергии конформации для каждого кластера, сохраняли их координаты в файл с форматом pdb. В программе PyMOL 1.1r1 (<https://sourceforge.net/projects/pymol/>) сравнивали их со структурой прогестерона из файла с PCA и рассчитывали rms. В программе Molsoft ICM-Browser (http://www.molsoft.com/icm_browser.html) создавали изображения полученных результатов докинга. Для определения K_d отбирали кластер, обладающий наименьшей энергией и имеющий конформации наиболее схожие с PCA прогестерона ($rms < 2 \text{ \AA}$), затем рассчитывали медиану K_d по кластеру. Статистическая обработка данных проводилась в программе PAST (PAST.v3.11).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расчеты констант диссоциаций, полученных с помощью метода молекулярного докинга. Для исследования K_d интересующих нас гестагенов, был проведен контрольный докинг прогестерона, полученного из файла PCA-1A28, в ЛСД РП-А. Результат стыковки представлен на рис. 1.

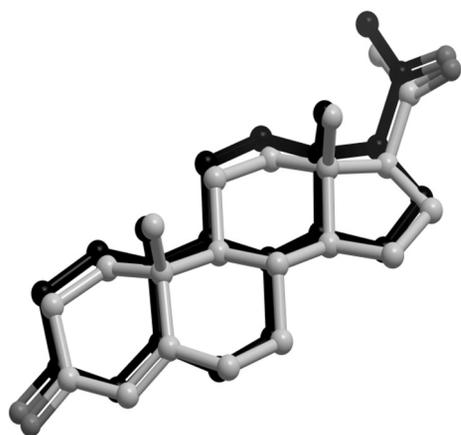


Рис. 1. Конформация структуры прогестерона ($K_d = 2,25$ нМ), полученной из файла pdb PCA, после стыковки в лиганд-связывающий домен рецептора прогестерона А (ЛСД РП-А) (P4 dock, серый цвет) и структуры прогестерона в ЛСД РП-А после PCA (1A28, черный цвет)

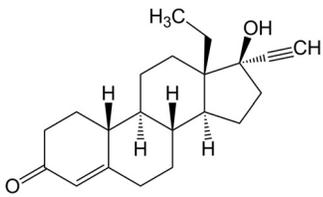
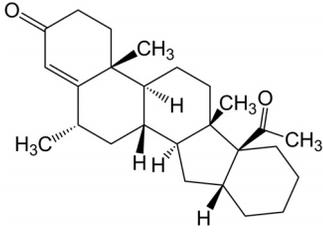
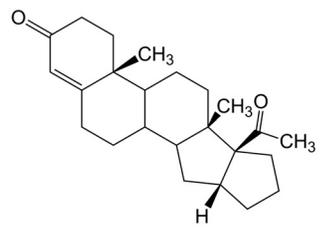
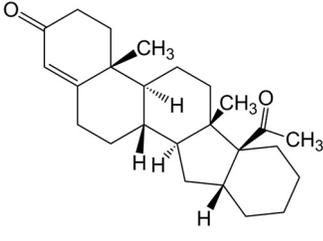
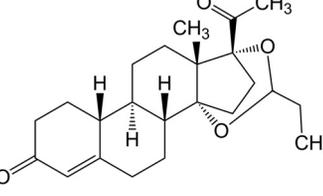
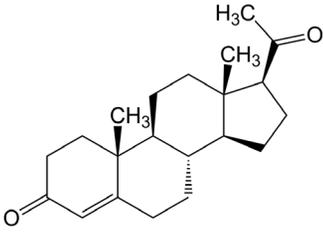
С помощью компьютерного моделирования были проведены расчеты теоретических K_d комплексов лиганд-рецептор для анализируемых аналогов прогестерона. Рассчитанные K_d , структуры и относительная биологическая активность (по данным литературы) гестагенных препаратов прегнанового, норстероидного ряда, а также родственные им соединения в разной степени проявляющие гестагенную/антигестагенную активность представлены в табл. 1.

Ранее было опубликовано краткое сообщение о высокой корреляции между ОБА и K_d , рассчитанной с помощью Autodock [7]. Однако при увеличении выборки исследованных соединений, а также использовании других критериев отбора конформаций для подсчета медиан K_d (в первую очередь схожесть конформации лиганда с положением прогестерона в кристалле, а не наименьшая энергия сгенерированного комплекса и многочисленность полученных кластеров) это утверждение не подтвердилось.

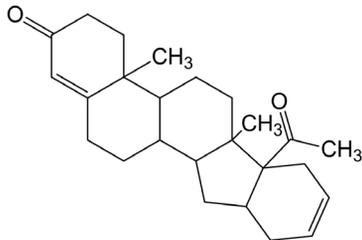
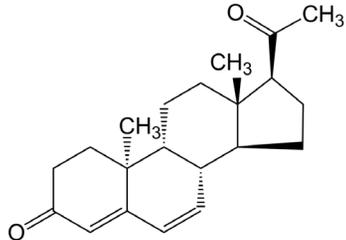
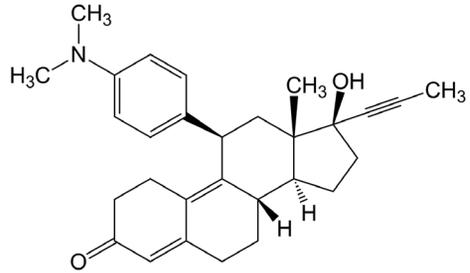
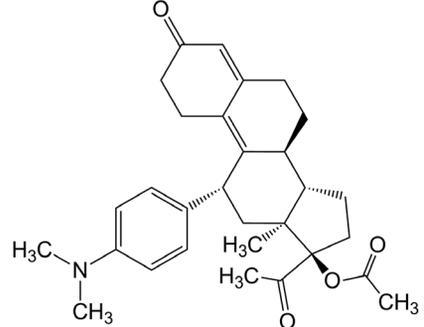
■ Таблица 1. Название, структура, относительная биологическая активность и константа диссоциации изученных соединений

Название соединения	Структура	Относительная биологическая активность	K_d (мин; макс)
Мегестрола ацетат		2700	1,5 нМ (1,4; 1,9)
Амол ((3β)-гидрокси-6-метил-20-оксипрегна-4,6-диен-17-илацетат)		337	1,6 нМ (1,4; 2,0)
(3α)-17-Ацетокси-6-метил-20-оксипрегна-4,6-диен-17-илбутират		11,2	18,6 мкМ (2,8; 1454,1)
Медроксипрогестерон-17-ацетат		10,4	1,2 нМ (1,1; 1,4)

■ Продолжение табл. 1

Название соединения	Структура	Относительная биологическая активность	K _d (мин; макс)
Левоноргестрел		5,2	33,1 нМ (32,5; 40,1)
(4 <i>aR</i> ,4 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>bS</i> ,10 <i>aR</i> ,11 <i>aS</i> ,11 <i>bR</i> ,13 <i>S</i>)-6b-Ацетил-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> ,13-триметил-3,4,4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ,5,6,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,7,8,9,10,10 <i>a</i> ,11,11 <i>a</i> ,11 <i>b</i> ,12,13-октадекагидро-2H-индено[2,1- <i>a</i>]фенантрин-2-он		4,7	2,3 нМ (2,17; 2,33)
(4 <i>aR</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>bS</i> ,9 <i>aR</i>)-6b-Ацетил-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> -диметил-4,4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ,5,6,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,7,8,9,9 <i>a</i> ,10,10 <i>a</i> ,10 <i>b</i> ,11,12-гексадекагидропенталено[2,1- <i>a</i>]фенантрин-2(3H)-он		Нет данных	1,3 нМ (0,9; 1,5)
(4 <i>aR</i> ,4 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>bS</i> ,10 <i>aR</i> ,11 <i>aS</i> ,11 <i>bR</i>)-6b-Ацетил-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> -диметил-3,4,4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ,5,6,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,7,8,9,10,10 <i>a</i> ,11,11 <i>a</i> ,11 <i>b</i> ,12,13-октадекагидро-2H-индено[2,1- <i>a</i>]фенантрин-2-он		2,4	1,8 нМ (1,6; 2,2)
Пролигестон		1,6	3,2 нМ (2,8; 3,8)
Прогестерон		1	2,5 нМ (2,4; 2,7)

■ Окончание табл. 1

Название соединения	Структура	Относительная биологическая активность	K_d (мин; макс)
6b-Ацетил-4a,6a-диметил-3,4,4a,4b,5,6,6a,6b,7,10,10a,11,11a,11b,12,13-гексадекагидро-2H-индено[2,1-a]фенантрен-2-он		0,5	1,7 нМ (1,4; 2,6)
Дидрогестерон		0,3	3,1 нМ (3,0; 3,3)
RU-486		PRM	119,7 нМ (113,7; 658,5)
Улипристала ацетат		SPRM	160 мкМ

Примечание. Относительные биологические активности соединений указаны по данным литературы [1, 3, 5, 8]; медианы (25 и 75 процентиля) K_d по кластеру, рассчитанные программой Autodock 4.2. PRM (Progesterone Receptor Modulators) — модулятор рецептора прогестерона; SPRM (Selective Progesterone Receptor Modulators) — селективный модулятор рецептора прогестерона.

Как видно из табл. 1, основываясь на теоретически рассчитанной K_d , можно предсказать, будет ли соединение активнее прогестерона только в 5 случаях из 8 (для 16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, 6 α -метил-16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, медроксипрогестерон-17-ацетата, Амола и мегестрола ацетата). Необходимо отметить, что последние три соединения по данным литературы имеют активность на порядки выше, чем прогестерон. Так, медроксипрогестерон-17-ацетат в 10, Амол в 337, а мегестрола ацетат в 2700 раз активнее прогестерона [1, 5].

Точность позиционирования лиганда влияет на правильность вычисления энергии связывания, поэтому при проведении докинга важно, чтобы най-

денный программой энергетический минимум системы белок–лиганд соответствовал положению лиганда в кристалле [10]. Не для всех соединений найденные конформации молекул совпали с конформацией прогестерона в ЛСД РП-А. Так, для структур левоноргестрела, улипристала ацетата, мифепристона и бутирата Амола наилучшие значения rms среди всех 50 конформаций, сгенерированных программой докинга, составили 2,2, 2,9, 6,0 и 4,24 соответственно. Поэтому нельзя утверждать, что полученные K_d рассчитаны верно. Однако понятно (и по их высоким K_d , и по отсутствию схожих с прогестероном конформаций), что эти соединения плохо стыкуются с рецептором прогестерона человека. Необходимо оговориться, что здесь и далее речь идет

о РП-А, структура которого получена из данных РСА, где он закристаллизован с прогестероном, а, следовательно, это его агонистическая конформация, с которой плохо стыкуется левоноргестрел, улипристала ацетат, мифепристон и бутират Амола. Неудачный докинг, а также высокие K_d можно объяснить тем, что соединение либо не является активным, либо является пролекарством, метаболит которого проявляет основное фармакологическое действие, либо вещество вызывает изменение ориентации аминокислотных остатков в ЛСД, связываясь с РП-А.

Считается, что важную роль в активации рецептора играет ориентация 12-й α -спирали. Конформационные изменения приводят к захлопыванию входа в лиганд-связывающее углубление, при этом происходит повышение стабильности, появление преграды для корепрессоров, пространство для коактиваторов, возможности взаимодействия со специальными белками, обеспечивающими инактивацию рецепторов (убиквитилиназы) [10, 24]. Доказательства важности спирали H12 в ответе агонист/антагонист является усечение С-конца РП, которое приводит к тому, что RU486 (мифепристон, являющийся антагонистом РП) действует как агонист. Кроме того, при связывании RU486 с РП С-конец рецептора подвергается протеолизу. Наконец, из моделирования RU486 в структуру РП, связанного с прогестероном, было сделано заключение, что замена 11 β RU486 является стерически несовместимой с агонистической конформацией спирали 12. Однако РСА (2W8Y) мифепристона показал, что он может связываться с агонистической конформацией, при этом изменяется положение только Met 909 и, как предполагают авторы, это является переходным состоянием, при котором повышается гибкость спирали H12, хоть она и не изменяет своего положения [19]. Левоноргестрел также, по данным РСА (3D90), изменяет положение Met909, однако в другую сторону от его положения с прогестероном (рис. 2) [18]. Таким образом, высокие K_d мифепристона и левоноргестрела объясняются отсутствием изменений в положении Met 909 в РСА РП-А (1A28), закристаллизованного с прогестероном.

Бутират Амола является эфиром Амола. Возможно, что неудачная стыковка данного соединения с РП-А является следствием метаболических изменений, которые он претерпевает в организме.

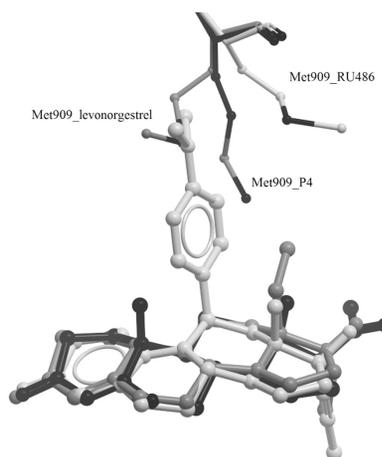


Рис. 2. Рентгеноструктурный анализ рецептора прогестерона в связи с прогестероном (1A28, черный цвет), левоноргестрелом (3D90, темно-серый цвет), RU486 (2W8Y, светло-серый цвет). Показано изменение положения одного аминокислотного остатка — Met909. Рисунок получен совмещением трех рентгеноструктурных анализов [18, 19, 24]

Это согласуется с высказанным ранее предположением, что эфиры Амола проявляют свое биологическое действие после гидролиза эфирной связи эстеразами [2]. В табл. 2 представлены значения K_d , полученные экспериментально [3] и с помощью метода молекулярного докинга.

Теоретически и экспериментально рассчитанные K_d численно не совпадают, однако близость значений и высокое сродство по сравнению с прогестероном для 16 α ,17 α -циклогекс-3-енопрогестерона, 16 α ,17 α -циклопентанопрогестерона и 16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, а также отсутствие корреляции с биологической активностью сохраняется в обоих случаях для данных соединений. Так, K_d 16 α ,17 α -циклогекс-3-енопрогестерона, имеющего биологическую активность в 2 раза ниже естественного лиганда, равняется 1,7 нМ против 2,5 нМ для прогестерона. Давно было замечено несоответствие между K_d , измеренными анализом кинетики конкурентного связывания рецептором прогестерона ^3H -меченного прогестерона и немеченного лиганда, и биологической активностью стероидных молекул [16]. А.В. Камерницкий и др. показали, что метод конкурентного связывания может приводить к получению ошибочных результатов в силу высокой гидрофобности прогестагенов,

Таблица 2. Константы диссоциации и относительные биологические активности аналогов прогестерона

Название соединений	Теоретически рассчитанная K_d , нМ**	Экспериментальная K_d , нМ*	ОБА
16 α ,17 α -Циклогекс-3-енопрогестерон	1,7 (1,4–2,6)	4,2 (\pm 1)	0,5
Прогестерон	2,5 (2,4–2,7)	7 (\pm 2,3)	1
16 α ,17 α -Циклогексанопрогестерон	1,8 (1,6–2,2)	5,1 (\pm 1,9)	2,36
6 α -Метил-16 α ,17 α -циклогексанопрогестерон	17,6 (10,9–18,3)	29,3 (\pm 9,2)	4,7
16 α ,17 α -Циклопентанопрогестерон	1,3 (0,9–1,5)	6,3 (\pm 3,4)	–

Примечание. *Получены методом молекулярного докинга при помощи программного пакета Avtodock 4.2. **Взяты из работы А.В. Камерницкого и др. [3]. ОБА — относительная биологическая активность.

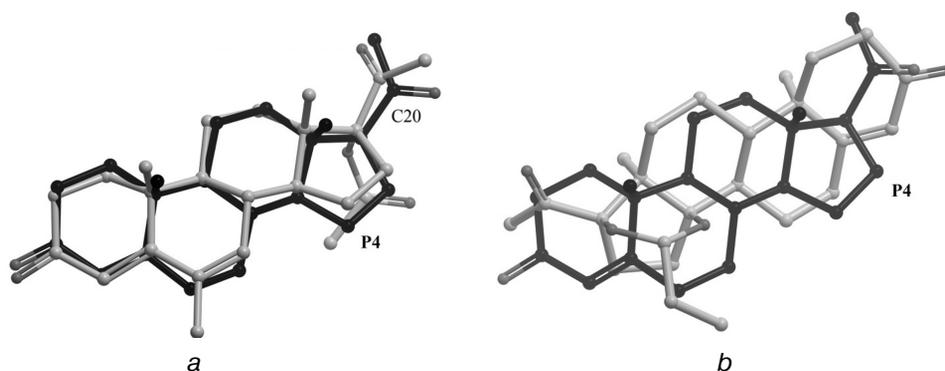


Рис. 3. *a* — два положения кетогруппы у атома C20 для мегестрола ацетата (серый цвет) и прогестерона (черный цвет); *b* — перевернутое на 180° положение молекулы пролигестона (серый цвет) относительно молекулы прогестерона в лиганд-связывающий домен рецептора прогестерона А

приводящей к их адсорбции на стекле [3]. В более ранних работах, где изучался широкий диапазон соединений, это не учитывалось, поэтому, чтобы сделать окончательные выводы о применимости программы докинга для расчета K_d аналогов прогестерона, необходимо провести подобные исследования на соединениях другого ряда.

Таким образом, с помощью программы Autodock 4.2 на ранних этапах исследования можно оценивать вероятность активности того или иного соединения-кандидата, но делать это необходимо с осторожностью, принимая во внимание отсутствие связи K_d с гестагенной активностью аналогов прогестерона.

Конформации прогестерона и ряда его аналогов в сайте связывания рецептора прогестерона, полученные с помощью программы Autodock 4.2. Особенный интерес представлял анализ предсказанных по результатам докинга ориентаций для разных соединений. Например, для мегестрола ацетата в первый кластер была выделена конформация, в которой изменена только ориентация кетогруппы у атома C20 (рис. 3, *a*). Для 16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, 6 α -метил-16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона и дидрогестерона она явилась наиболее энергетически выгодной. Для циклогекс-3-енопрогестерона была только такая позиция группировки. Так или иначе, эта конформация встречалась у всех соединений, где есть эта группа (рис. 3, *a*).

Перевернутое положение (рис. 3, *b*) встречалось у всех соединений, кроме прогестерона и дидрогестерона, а для пролигестона и левоноргестрела конформация с таким позиционированием явилась наиболее энергетически выгодной и стала основой для самого многочисленного кластера; для циклогекс-3-енопрогестерона она также стала основой для наиболее многочисленного кластера, хоть и не с самой низкой K_d (3-й кластер). Перевернутое на 180° положение является известной проблемой докинга псевдосимметричных молекул, к которым, по-видимому, нужно отнести и аналоги прогестерона [17]. Однако остается не ясным, почему для молекул прогестерона и дидрогестерона, наиболее компактных и сим-

метричных из всех исследованных нами молекул (без крупных заместителей) такой конформации нет ни в одном из кластеров. Возможно, перевернутое на 180° положение молекул в ЛСД связано с участием воды в образовании контактов между лигандом и аминокислотными остатками РП-А. Данную проблему можно будет решить в дальнейших исследованиях с использованием более совершенной программы докинга, где вода будет указана в явном виде.

Вполне закономерно, что окончательное положение молекул различных лигандов будет схоже с прогестероном. Однако наличие другого позиционирования соединений в ЛСД по результатам докинга, зачастую оказывающихся наиболее энергетически выгодными, возможно сможет помочь нам в понимании того, как и за счет чего происходит правильная ориентация лиганда в процессе связывания с рецептором.

ВЫВОДЫ

С помощью программы Autodock 4.2 был проведен молекулярный докинг прогестерона, а также 13 соединений родственных ему (мегестрола ацетата, Амола, бутирата Амола, медроксипрогестерон-17-ацетата, левоноргестрела, 6 α -метил-16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, 16 α ,17 α -циклопентанопрогестерона, 16 α ,17 α -циклогексанопрогестерона, пролигестона, 16 α ,17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона, дидрогестерона, мифепристона, улипристала ацетата) к ЛСД РП-А человека. Расчеты теоретических констант диссоциации комплексов лиганд — рецептор прогестерона показали, что степень связывания лиганда с рецептором можно использовать для расчета K_d , однако оценивать биологическую активность с помощью этого метода необходимо с осторожностью, особенно для аналогов прогестерона. Кроме того, метод позволяет выявить соединения, которые при взаимодействии с РП меняют положение его аминокислотных остатков в ЛСД (то есть, возможно, имеют другой механизм действия), а также вещества, которые не взаимодействуют с агонистической

формой рецептора вследствие других причин. Таким образом, метод молекулярного докинга, несомненно, является полезным для изучения соединений на первом этапе прескрининга эффективных гестагенных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00449), а также при частичной поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках фундаментального исследования по теме: «Разработка стратегий диагностики, терапии генитального эндометриоза и опухолей женского репродуктивного тракта» (регистрационный № АААА-А19-119030490009-6).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зейналов О.А., Андрияшина В.А., Скрябин К.Г. Новые высокоактивные гестагены прегнанового ряда // Российский химический журнал. – 2005. – Т. 49. – № 1. – С. 118–124. [Zeinalov OA, Andryushina VA, Skryabin KG. Novye vysokoaktivnyye gestageny pregnanovogo ryada. *Russian Chemical Journal*. 2005;49(1):118-124. (In Russ.)]
2. Зейналов О.А., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., и др. Синтез и биологическая активность синтетических производных 17 α -гидроксипрогестерона // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46. – № 4. – С. 7–10. [Zeinalov OA, Yaderets VV, Stytsenko TS, et al. Synthesis and biological activity of synthetic 17 α -hydroxyprogesterone derivatives. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2012;46(4):7-10. (In Russ.)]
3. Камерницкий А.В., Левина И.С. Прегна-D'-пентараны — прогестины и антипрогестины. II. Пути и механизмы осуществления стероидными гормонами отдельных биологических функций // Биоорганическая химия. – 2005. – Т. 31. – № 3. – С. 227–238. [Kamernitzky AV, Levina IS. Pregna-D'-pentaranes, progestins and antiprogestins: II. Pathways and realization mechanisms of separate biological functions of steroid hormones. *Bioorg Khim*. 2005;31(3):227-238. (In Russ.)]
4. Карева Е.Н. Современные комбинированные пероральные контрацептивные средства // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – № 1. – С. 30–37. [Kareva EN. Modern Combined Oral Contraceptive Pills. *Experimental and clinical pharmacology*. 2014;77(1):30-37. (In Russ.)]
5. Корхов В.В., Лесик Е.А., Петросян М.А. Исследование и поиск новых гестагенных препаратов для применения их в акушерстве и гинекологии // Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. 53. – № 2. – С. 16–20. [Korkhov VV, Lesik EA, Petrosyan MA. Investigation of new gestagenic preparations for administration in obstetrics and gynecology. *Journal of obstetrics and women's diseases*. 2004;53(2):16-20. (In Russ.)]
6. Петросян М.А., Мележникова Н.О., Домнина А.П., и др. Поиск новой клеточной модели для изучения фармакологической активности аналогов прогестерона // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 10. – С. 676–684. [Petrosyan MA, Melezhnikova NO, Domnina AP, et al. Search of a new cellular model for investigation of pharmacological activity of progesterone analogues. *Cell and Tissue Biology*. 2017;59(10):676-684. (In Russ.)]
7. Петросян М.А., Таборская К.И., Белинская Д.А. Методы компьютерного моделирования и прогнозирования в разработке новых аналогов прогестерона / Тезисы докладов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Москва, 10–13 апреля 2017. – М., 2017. – С. 105–106. [Petrosyan MA, Taborskaya KI, Belinskaya DA. Metody kompyuternogo modelirovaniya i prognozirovaniya v razrabotke novykh analogov progesterona. In: Proceedings of the 24th Russian National Congress "Chelovek i lekarstvo"; Moscow, 10–13 Apr 2017. Moscow; 2017. P. 105-106. (In Russ.)]
8. Сергеев П.В., Ржезников В.М., Корхов В.В., и др. Исследование гестагенной активности 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-она // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39. – № 7. – С. 20–22. [Sergeev PV, Rzheznikov VM, Korkhov VV, et al. Investigation of the gestagen activity of 17 α -acetoxy-3 β -butanoyloxy-6-methylpregna-4,6-dien-20-one. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2005;39(7):20-22. (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2005-39-7-20-22>.
9. Смирнов А.Н. Молекулярная биология прогестерона // Российский химический журнал. – 2005. – Т. 49. – № 1. – С. 64–74. [Smirnov AN. Molekulyarnaya biologiya progesterona. *Russian Chemical Journal*. 2005;49(1):64-74. (In Russ.)]
10. Сулимов А.В., Кутов Д.К., Каткова Е.В., Сулимов В.Б. Суперкомпьютерный квантовохимический квази-докинг / Труды Международной конференции «Суперкомпьютерные дни в России»; Москва, 26–27 сентября 2016. – С. 725–731. [Sulimov AV, Kutov DK, Katkova EV, Sulimov VB. Superkomp'yuternyy kvantovokhimicheskiy kvazi-doking. In: Proceedings of the International Conference "Superkomp'yuternyye dni v Rossii"; Moscow, 26–27 Sep 2016. Moscow; 2016. P. 725-731. (In Russ.)]
11. Федюшкина И.В., Скворцов В.С., Ромео Рейес И.В., Левина И.С. Молекулярный докинг и 3D-QSAR производных 16 α ,17 α -циклоалканопрогестерона как лигандов рецептора прогестерона // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59. – № 6. – С. 622–635. [Fedyushkina IV, Skvortsov VS, Romero Reyes IV, Levina IS. Molecular docking and 3D-QSAR on 16 α ,17 α -cycloalkanoprogesterone analogues as progesterone receptor ligands. *Biomed Khim*. 2013;59(6):622-635. (In Russ.)]
12. Шимановский Н.Л., Карева Е.Н., Семейкин А.В. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Мирнова. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 700–709. [Shimanovskiy NL, Kareva EN, Semeykin AV. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Part 1. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K; 2012. p. 700-709. (In Russ.)]
13. Щербakov А.М., Левина И.С., Куликова Л.Е., и др. Цитотоксическая активность и молекулярное моделирование прогестинов — прегна-D'-пентаранов // Биоме-

- дицинская химия. – 2016. – Т. 62. – № 3. – С. 290–294. [Scherbakov AM, Levina IS, Kulikova LE, et al. Cytotoxic activity and molecular modeling of progestins – pregna-D¹-pentarans. *Biomed Khim.* 2016;62(3):290-294. (In Russ.)]
14. Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR. In vitro antiprogesterone/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;88(3):277-288. [https://doi.org/ 10.1016/j.jsbmb.2003.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.12.004).
 15. Hasan TN, B LG, Masoodi TA, et al. Affinity of estrogens for human progesterone receptor A and B monomers and risk of breast cancer: a comparative molecular modeling study. *Adv Appl Bioinform Chem.* 2011;4:29-36. [https://doi.org/ 10.2147/AABC.S17371](https://doi.org/10.2147/AABC.S17371).
 16. Kasid A, Buckshee K, Hingorani V, Laumas KR. Interaction of progestins with steroid receptors in human uterus. *Biochem J.* 1978;176(2):531-539. [https://doi.org/ 10.1042/bj1760531](https://doi.org/10.1042/bj1760531).
 17. Liebeschuetz JW, Cole JC, Korb O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J Comput Aided Mol Des.* 2012;26(6):737-748. [https://doi.org/ 10.1007/s10822-012-9551-4](https://doi.org/10.1007/s10822-012-9551-4).
 18. Petit-Topin I, Turque N, Fagart J, et al. Met909 plays a key role in the activation of the progesterone receptor and also in the high potency of 13-ethyl progestins. *Mol Pharmacol.* 2009;75(6):1317-1324. [https://doi.org/ 10.1124/mol.108.054312](https://doi.org/10.1124/mol.108.054312).
 19. Raaijmakers HC, Versteegh JE, Uitdehaag JC. The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *J Biol Chem.* 2009;284(29):19572-19579. [https://doi.org/ 10.1074/jbc.M109.007872](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007872).
 20. Royer PA, Jones KP. Progestins for contraception: modern delivery systems and novel formulations. *Clin Obstet Gynecol.* 2014;57(4):644-658. [https://doi.org/ 10.1097/GRF.0000000000000072](https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000072).
 21. Stratton P, Hartog B, Hajizadeh N, et al. A single mid-follicular dose of CDB-2914, a new antiprogesterone, inhibits folliculogenesis and endometrial differentiation in normally cycling women. *Hum Reprod.* 2000;15(5):1092-1099. [https://doi.org/ 10.1093/humrep/15.5.1092](https://doi.org/10.1093/humrep/15.5.1092).
 22. Stratton P, Levens ED, Hartog B, et al. Endometrial effects of a single early luteal dose of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914. *Fertil Steril.* 2010;93(6):2035-2041. [https://doi.org/ 10.1016/j.fertnstert.2008.12.057](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.057).
 23. Wardell SE, Narayanan R, Weigel NL, Edwards DP. Partial agonist activity of the progesterone receptor antagonist RU486 mediated by an amino-terminal domain coactivator and phosphorylation of serine400. *Mol Endocrinol.* 2010;24(2):335-345. [https://doi.org/ 10.1210/me.2008-0081](https://doi.org/10.1210/me.2008-0081).
 24. Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature.* 1998;393(6683):392-396. [https://doi.org/ 10.1038/30775](https://doi.org/10.1038/30775).

♦ Информация об авторах

Мария Анатольевна Петросян — канд. мед наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы фармакологии. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. E-mail: mariya@labpharm.spb.ru.

Дарья Александровна Белинская — канд. мед наук, научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии сенсорных систем. ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург. E-mail: d_belinskaya@mail.

Ксения Игоревна Таборская — магистр, младший научный сотрудник. ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург. E-mail: kseniya.panshina@gmail.com.

Петр Дмитриевич Шабанов — д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Санкт-Петербург; профессор кафедры фундаментальной медицины и передовых технологий, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

♦ Information about the authors

Mariya A. Petrosyan — Cand. Med. Science, Leading Researcher, Head of the Pharmacology Group. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mariya@labpharm.spb.ru.

Daria A. Belinskaya — Cand. Med. Science, Researcher. Laboratory of Comparative Physiology of Sensory Systems. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. E-mail: d_belinskaya@mail.

Kseniia I. Taborskaia — Junior Researcher. State Scientific-research Taste Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: kseniya.panshina@gmail.com.

Petr D. Shabanov — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Department of Fundamental Medicine and Progressive Technologies, State University of Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.