

©Коллектив авторов

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АБИРАТЕРОНА И ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА D4A С ЦИТОХРОМОМ P450 2C9 (CYP2C9)

Р.А. Масамрех<sup>1,2</sup>, А.В. Кузиков<sup>1,2</sup>, Т.А. Филиппова<sup>1,2</sup>, К.А. Щербаков<sup>1</sup>, А.В. Веселовский<sup>1,2</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8; \*эл. почта: v\_shumyantseva@mail.ru

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

В работе исследовано взаимодействие противоопухолевого препарата абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A, перспективного для использования в качестве агента для лечения рака предстательной железы, с цитохромом P450 2C9 (CYP2C9). Методом абсорбционной спектроскопии показано, что оба исследуемых соединения вызывают спектральные изменения CYP2C9, свидетельствующие о взаимодействии атома азота пиридинового кольца лиганда с ионом железа гема активного центра фермента, но при этом возможно взаимодействие лигандов с ферментом, опосредованное водой, связанной с ионом железа гема. На основании спектральных изменений были определены значения констант диссоциации ( $K_S$ ) комплексов абиратерона и D4A с CYP2C9, которые составили  $1,73 \pm 0,14$  мкМ и  $3,95 \pm 0,16$  мкМ соответственно. Оба соединения ингибировали O-деметилазную активность CYP2C9 по отношению к субстрату этого фермента напроксену. При концентрации напроксена 100 мкМ значения концентраций абиратерона, D4A и сульфafenазола, ингибирующих активность CYP2C9 на 50% ( $IC_{50}$ ), были определены как 13,9 мкМ, 40 мкМ и 41 мкМ соответственно. Полученные данные могут быть использованы для прогноза межлекарственных взаимодействий на уровне CYP2C9 при использовании абиратерона или D4A в качестве противоопухолевого агента для лечения рака предстательной железы в комплексной фармакотерапии.

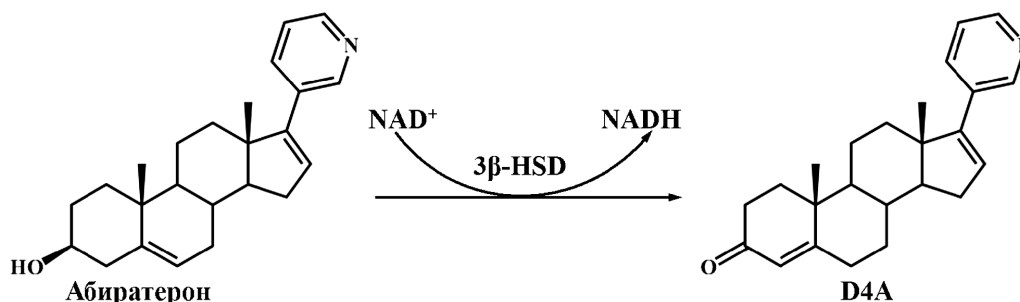
**Ключевые слова:** абиратерон; D4A; напроксен; CYP2C9; межлекарственные взаимодействия

**DOI:** 10.18097/PBMC20226803201

### ВВЕДЕНИЕ

Эффективной стратегией фармакотерапии рака предстательной железы является снижение уровня андрогенов за счёт использования ингибиторов  $17\alpha$ -гидроксилазы,  $17,20$ -лиазы (цитохрома P450 17A1, CYP17A1) — ключевого фермента биосинтеза андрогенов — в сочетании с применением антагонистов андрогеновых рецепторов, экспрессируемых опухолевыми клетками, с целью блокирования их взаимодействия с андрогенами [1]. CYP17A1 катализирует реакцию  $17\alpha$ -гидроксилирования прегненолона и прогестерона с образованием соответствующих производных (являющихся предшественниками как половых, так и глюкокортикоидных гормонов) и последующую  $17,20$ -лиазную реакцию, приводящую к образованию андрогенов — дегидроэпиандростерона и андростендиона [2]. Абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3 $\beta$ -ол),

являющийся ингибитором CYP17A1, широко применяется в клинической практике для лечения рака предстательной железы. Одним из основных свойств абиратерона, обуславливающих его побочные эффекты, является его неселективность в отношении  $17,20$ -лиазной реакции, приводящей к образованию андрогенов, и подавление  $17\alpha$ -гидроксилазной активности CYP17A1, что приводит к торможению биосинтеза глюкокортикоидов и возрастанию уровня минералокортикоидов [3]. Эта проблема является одной из основных причин для поиска новых эффективных и более селективных ингибиторов CYP17A1, перспективных в качестве лекарственных соединений для лечения рака предстательной железы. В организме абиратерон под действием  $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы ( $3\beta$ -HSD) подвергается окислению по гидроксильной группе в третьем положении стероидного фрагмента с образованием более активного 3-кето- $\Delta^4$ -производного абиратерона (D4A) [1, 4] (рис. 1).



**Рисунок 1.** Метаболизм абиратерона, осуществляемый при участии  $3\beta$ -HSD.

Как было показано, данный метаболит ингибирует ключевые ферменты биосинтеза андрогенов (CYP17A1, 3 $\beta$ -HSD, стероид-5 $\alpha$ -редуктазу (SRD5A)), а также проявляет более высокую, чем абиратерон, антагонистическую активность по отношению к рецептору андрогенов, сравнимую по эффективности с известным антагонистом рецептора андрогенов энзалутамидом [1]. D4A продемонстрировал большую, по сравнению с абиратероном, противоопухолевую активность на ксенографтах у мышей [1]. Таким образом, D4A проявляет большую фармакологическую активность по сравнению с абиратероном, оказывая влияние на несколько молекулярных мишеней противоопухолевой терапии, и представляет интерес для его дальнейших исследований в качестве потенциального фармакологического агента для лечения рака предстательной железы. D4A под действием SRD5A и стероид-5 $\beta$ -редуктазы (SRD5B) восстанавливается до соответствующих производных абиратерона (5 $\alpha$ -абиратерон и 5 $\beta$ -абиратерон), которые могут подвергаться дальнейшему восстановлению под действием 3 $\alpha$ -гидроксистероиддегидрогеназы (3 $\alpha$ -HSD) и 3 $\beta$ -HSD [4]. 5 $\alpha$ -восстановленные производные абиратерона оказывают агонистический эффект на андрогеновые рецепторы, в отличие от практически неактивных 5 $\beta$ -восстановленных производных абиратерона. Использование ингибиторов SRD5A совместно с абиратероном в комплексной терапии у пациентов приводит к накоплению в организме D4A, усиливая тем самым фармакологический эффект абиратерона [4, 5]. Предполагается, что дальнейшая разработка ингибиторов SRD5B позволит снизить уровень инактивации D4A и увеличить его фармакологический потенциал. Использование D4A в качестве лекарственного препарата и фармакологическая модуляция метаболизма с целью его накопления требуют дальнейших исследований его взаимодействия с другими молекулярными мишенями, в том числе и с ферментами суперсемейства цитохрома P450, участвующими в метаболизме лекарственных препаратов, с целью прогноза возможных межлекарственных взаимодействий.

Полипрагматизация (одновременный приём нескольких лекарственных препаратов) является актуальной проблемой у пациентов с раком предстательной железы [6]. Известно, что абиратерон может вступать в межлекарственные взаимодействия за счёт ингибирования CYP2C8, CYP2D6 и CYP3A4, участвующих в метаболизме некоторых анальгетиков, антидепрессантов, бета-адреноблокаторов, статинов, антидиабетических препаратов, антибиотиков [7, 8]. Также имеются основания полагать, что абиратерон способен вступать в межлекарственные взаимодействия с опиоидными анальгетиками, бета-адреноблокаторами и антиаритмическими препаратами за счёт взаимодействия с метаболизирующими эти препараты ферментами, в частности с CYP2D6 [6]. Кроме того, абиратерон ингибирует ряд стероид-метаболизирующих изоформ цитохрома P450 (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2 [9] и CYP21A2 [10]). Взаимодействия D4A с цитохромами P450

были исследованы в основном для прогноза возможных побочных эффектов. Так, показано, что абиратерон и D4A схожим образом ингибируют стероид 21-гидроксилазу (CYP21A2), катализирующую 21-гидроксилазную реакцию по отношению к прогестерону и 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерону с образованием кортикостероидов — дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола соответственно [10, 11]. Несмотря на схожие значения констант ингибирования абиратерона и D4A по отношению к CYP21A2, усиление одного из основных побочных эффектов фармакотерапии рака предстательной железы, обусловленного нарушением метаболизма кортикостероидов, вряд ли можно объяснить только ингибированием CYP21A2 D4A [12]. Выявлены взаимодействия D4A с активными центрами CYP51A1 и CYP19A1, что указывает на возможные изменения метаболизма холестерина и эстрогенов под действием этого метаболита абиратерона [13]. В отличие от абиратерона, субстрат-ингибиторный потенциал D4A по отношению к основным цитохромам P450, участвующим в метаболизме лекарственных препаратов, остаётся малоизученным.

Цитохром P450 2C9 (CYP2C9) — один из наиболее высокоэкспрессируемых ферментов суперсемейства цитохрома P450, который участвует в I фазе метаболизма более 15% лекарственных препаратов, включая нестероидные противовоспалительные, гипогликемические, противосудорожные, антикоагулянты, антигипертензивные препараты и диуретики [14]. CYP2C9 метаболизирует лекарственные препараты с узким терапевтическим индексом; таким образом, от экспрессии и активности этого фермента у пациентов зависит эффективность и безопасность большого количества лекарств [15]. Абиратерон является умеренным ингибитором CYP2C9 [16]; исследование взаимодействия D4A с данным ферментом с целью прогноза межлекарственного взаимодействия ранее не проводилось.

Целью настоящей работы было выявление возможного взаимодействия D4A с CYP2C9 и сравнение ингибирующих свойств абиратерона и D4A по отношению к этому ферменту.

## МЕТОДИКА

### *Реактивы и материалы*

В работе были использованы следующие реактивы: ацетилацетон, гидроортофосфат калия 3-водный, дигидрофосфат калия, дидодецилдиметиламмония бромид, изопропанол, (S)-напроксен, сульфafenазол, хлорид натрия, D4A (“Sigma-Aldrich”, США), абиратерон (“Chemleader Biomedical Co., Ltd.”, Китай), ацетат аммония (“PanReac AppliChem”, Испания), уксусная кислота (“Компонент-Реактив”, Россия). Рекомбинантный CYP2C9 (263 мкМ) в 600 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% глицерина (по объёму), 0,3% CHAPS (по объёму) и 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола, был получен и охарактеризован в Институте биоорганической

химии НАН Беларуси по методике, описанной ранее [17]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с монооксидом углерода, используя для расчёта коэффициент поглощения  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [18].

#### Спектральный анализ

Спектральные исследования были выполнены с использованием двулучевого спектрофотометра UV-1900 (“Shimadzu”, Япония) с программным обеспечением UVProbe версия 2.70. Раствор рекомбинантного CYP2C9 был разведён 100 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 20% глицерина (по объёму), до концентрации CYP2C9 5 мкМ. Полученный раствор фермента был внесён в 100 мкл кварцевые кюветы (опытная и контрольная), и базовая линия была зарегистрирована в диапазоне длин волн 350–500 нм. Затем аликвоты с соответствующей концентрацией абиратерона, D4A или сульфафеназола в метаноле были внесены в экспериментальную кювету, а соответствующие объёмы растворителя (метанола) были внесены в контрольную кювету с последующей регистрацией дифференциального спектра. Конечная концентрация метанола в экспериментальной и контрольной кюветах не превышала 2% (по объёму). Поскольку зависимости разности поглощений ( $\Delta A$ ) между максимумом ( $A_{\max}$ ) и минимумом ( $A_{\min}$ ) в дифференциальном абсорбционном спектре CYP2C9 от концентрации всех исследуемых лигандов имели сигмовидный характер, для их аппроксимации с помощью программного обеспечения Origin 8.1 мы использовали уравнение Хилла (1):

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max} [L]^n}{K_S^n + [L]^n} \quad (1),$$

где  $\Delta A$  — разность поглощений между максимумом ( $A_{\max}$ ) и минимумом ( $A_{\min}$ ) в дифференциальном спектре CYP2C9,  $[L]$  — концентрация лиганда,  $M$ ,  $n$  — коэффициент Хилла,  $K_S$  — спектральная константа диссоциации,  $M$ .

#### Молекулярный докинг

Комплекс CYP2C9 с ингибитором 4-[4-хлоро-2-(1*H*-пиразол-4-ил)феноксид]-3-циано-*N*-1,3-тиазол-2-илбензолсульфонамидом (PubChem CID: 46840813) был использован в качестве мишени для молекулярного докинга (PDB ID: 5k7k, разрешение 2,30 Å) [19]. Все небелковые атомы, кроме железа и атомов гема, были удалены из комплекса. Структуры абиратерона и сульфафеназола были загружены из базы данных PubChem, структура D4A была получена путём модификации абиратерона в пакете SYBYL. Атомные заряды были рассчитаны с применением метода Гастайгера-Хюккеля. Расчёты производили при помощи Vina Autodock [20]. В работе был использован метод гибкого докинга, позволяющего определить аминокислотные остатки с подвижными боковыми цепями. В качестве подвижных были определены следующие аминокислотные остатки:

F100, E104, R108, V113, F114, N204, I205, I207, L208, L233, E299, T301, L362, S365, L366, F476. В качестве подвижных выбирали те остатки, хотя бы один атом которых располагался в пределах 4 Å от лиганда 4-[4-хлоро-2-(1*H*-пиразол-4-ил)феноксид]-3-циано-*N*-1,3-тиазол-2-илбензолсульфонамида в кристаллической структуре его комплекса с CYP2C9. Область поиска решений докинга была ограничена пространством  $24 \text{ Å} \times 24 \text{ Å} \times 24 \text{ Å}$ , отцентрированным по координатам 25,043 Å, 29,697 Å, 2,961 Å, что позволило захватить все остатки, образующие активный центр фермента. Значение exhaustiveness (полнота поиска), использованное при расчётах, было равно 30, значение energy\_range (диапазон величин энергии) составило 20 ккал/моль, а параметр num\_modes (количество поз) был равен 20. Считаем, что такая комбинация параметров докинга позволяет достаточно исчерпывающе описать возможные позы связывания лигандов. Комплексы белка с лигандами, полученные в ходе докинга, были подвержены минимизации энергии. Анализ взаимодействий белка с лигандами осуществлялся при помощи сервера PLIP [21] и пакета Rymol.

#### Приготовление ферментных электродов

В работе были использованы печатные электроды с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (Ag/AgCl), полученные от “КолорЭлектроникс” (Россия). Для иммобилизации фермента поверхности рабочих графитовых электродов были модифицированы 1 мкл 0,1 М дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ) в хлороформе. Далее на модифицированную поверхность электродов наносили по 0,5 мкл раствора рекомбинантного CYP2C9. Электроды с иммобилизованным CYP2C9 оставляли во влажной камере при 4°C на 12 ч до использования.

#### Анализ активности фермента

Активность CYP2C9 была исследована с помощью ранее разработанной электрохимической системы на основе рекомбинантного фермента, иммобилизованного на модифицированных ДДАБ электродах [22, 23]. В данной системе электрод выступает в качестве донора электронов для восстановления иона железа гема фермента и инициации каталитической реакции. О-деметилазную активность CYP2C9, иммобилизованную на модифицированных электродах, по отношению к (*S*)-напроксену определяли по образованию формальдегида как одного из продуктов ферментативной реакции. Ферментные электроды были прединкубированы в течение 5 мин при 30°C в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% изопропанола (по объёму) и различные концентрации абиратерона, D4A или сульфафеназола (от 0 мкМ до 50 мкМ). Далее электроды переносили в ячейку, заполненную 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% изопропанола (по объёму), 100 мкМ напроксена и различные концентрации абиратерона или D4A

(от 0 мкМ до 50 мкМ). Фермент-зависимую электрокаталитическую реакцию проводили в течение 60 мин при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. После окончания электрокаталитической реакции реакционную смесь инкубировали с равным объемом реактива Нэша, состоящего из 4 М ацетата аммония, 100 мМ уксусной кислоты и 40 мМ ацетилацетона, в течение 30 мин при температуре 37°C. Концентрацию формальдегида определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм, используя коэффициент поглощения  $4 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [24]. Активность фермента выражали в количестве формальдегида, произведенного за одну минуту одним моль электроактивного CYP2C9. Количество электроактивного фермента определяли по методике, описанной ранее [23]. В качестве контрольного эксперимента была проведена электрокаталитическая реакция с электродом, модифицированным ДДАБ и иммобилизованным CYP2C9, в ячейке, заполненной 300 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50 мМ NaCl, 1% изопропанола (по объёму), но не содержащего напроксен, в течение 60 мин при потенциале рабочего электрода -0,6 В (отн. Ag/AgCl) и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. После окончания электрокаталитической реакции и инкубации с реактивом Нэша спектрофотометрически не зафиксировано образование продуктов, поглощающих при 412 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

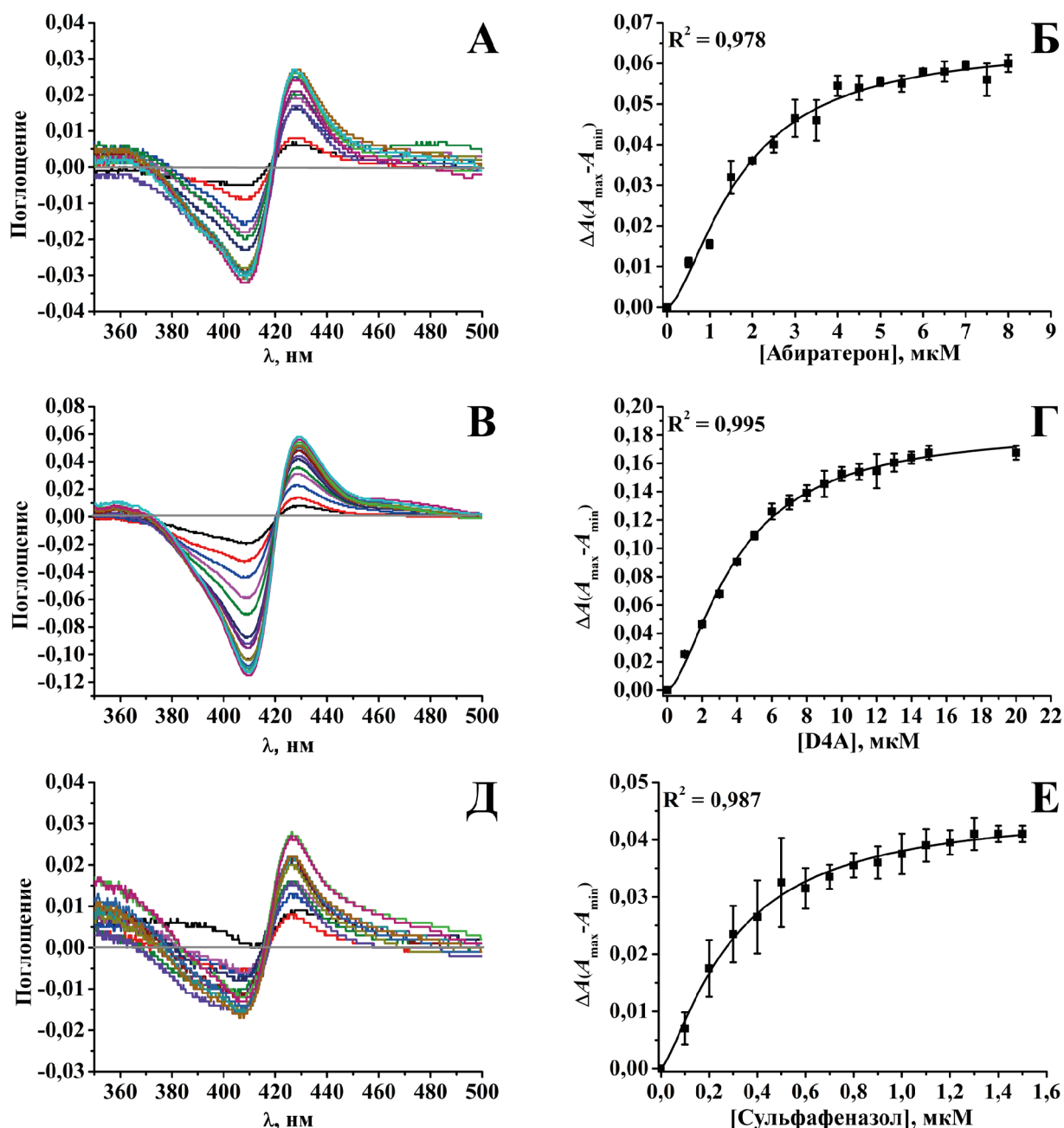
Взаимодействия абиратерона и D4A с активным центром CYP2C9 были исследованы нами методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии. При взаимодействии лигандов I типа с активным центром цитохрома P450 происходит переход иона железа гема фермента из низкоспинового состояния в высокоспиновое, что можно зарегистрировать по возникновению максимума поглощения при длине волны около 390 нм и минимуму при длине волны около 420 нм в дифференциальном абсорбционном спектре цитохрома P450; лиганды II типа образуют координационную связь с ионом железа гема, при этом дифференциальный спектр цитохрома P450 характеризуется максимумом поглощения при длине волны около 425-440 нм и минимумом около 415 нм или меньше, а ион железа гема находится в низкоспиновом состоянии [25]. Соединения, проявляющие субстратные свойства по отношению к цитохрому P450, как правило, являются лигандами I типа, а соединения с ингибиторными свойствами — II типа.

Дифференциальный спектр поглощения CYP2C9 при титровании абиратероном характеризовался появлением максимума при 428 нм и минимума при 408 нм, что указывает на взаимодействие атома азота пиридинового радикала лиганда с ионом железа гема фермента (рис. 2А). Таким образом, абиратерон является лигандом II типа CYP2C9.

Зависимость разности поглощений ( $\Delta A$ ) между максимумом ( $A_{\max}$ ) и минимумом ( $A_{\min}$ ) в дифференциальном абсорбционном спектре CYP2C9 от концентрации абиратерона имела сигмоидный характер и аппроксимировалась уравнением Хилла (1) со значением  $R^2=0,978$  (рис. 2Б). Значения  $n$ ,  $\Delta A_{\max}$  и  $K_S$  были определены как  $1,56 \pm 0,18$  мкМ,  $0,065 \pm 0,003$  мкМ и  $1,73 \pm 0,14$  мкМ соответственно. Данный характер зависимости может указывать либо на взаимодействие более чем одной молекулы лиганда с активным центром, либо на процесс олигомеризации молекул CYP2C9 [26]. Ранее мы показали, что абиратерон является лигандом II типа цитохрома P450 3A4 (CYP3A4), при этом, как и в случае с CYP2C9, зависимость  $\Delta A$  от концентрации абиратерона имела сигмоидный характер [8].

D4A вызывал схожие с абиратероном изменения дифференциального спектра поглощения CYP2C9, а следовательно, демонстрировал схожий характер взаимодействия атома азота пиридинового радикала лиганда с ионом железа гема фермента. Максимум поглощения в дифференциальном спектре CYP2C9 при титровании D4A был зарегистрирован при 427 нм, а минимум при 409 нм (рис. 2В). Зависимость  $\Delta A$  от концентрации D4A, как и в случае титрования абиратероном, имела сигмоидный характер и также удовлетворительно аппроксимировалась уравнением Хилла ( $R^2=0,995$ ) (рис. 2Г). Значения  $n$ ,  $\Delta A_{\max}$  и  $K_S$  были определены как  $1,58 \pm 0,09$  мкМ,  $0,185 \pm 0,004$  мкМ и  $3,95 \pm 0,16$  мкМ соответственно. Таким образом, значение  $K_S$  комплекса CYP2C9 с D4A более чем в два раза превышает аналогичный параметр для комплекса CYP2C9 с абиратероном, что свидетельствует о более низком сродстве D4A к активному центру CYP2C9 по сравнению с абиратероном.

Методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии мы также исследовали взаимодействие с активным центром CYP2C9 конкурентного ингибитора этого фермента сульфаназола [27] и сравнили полученные параметры взаимодействия с аналогичными параметрами для абиратерона и D4A. Сульфаназол индуцировал спектральные изменения CYP2C9, проявляющиеся в возникновении максимума поглощения в дифференциальном спектре при длине волны 424 нм и минимума в области 389-406 нм, что характерно для взаимодействия с активным центром лигандов II типа (рис. 2Д). Как и в случае взаимодействия абиратерона и D4A с активным центром фермента, зависимость  $\Delta A$  от концентрации сульфаназола имела сигмоидный характер. Несмотря на то, что определяемое значение  $K_S$  было намного меньше общей концентрации фермента в инкубационной смеси, аппроксимация была произведена уравнением Хилла ( $n$  было определено как  $1,36 \pm 0,12$ ), а не уравнением Моррисона для сильного связывания лиганда с ферментом (рис. 2Е). Значения  $\Delta A_{\max}$  и  $K_S$  были определены как  $0,045 \pm 0,002$  мкМ и  $0,30 \pm 0,02$  мкМ соответственно. Значение  $K_S$  для комплекса CYP2C9 с сульфаназолом почти в 6 раз меньше, чем для комплекса фермента с абиратероном, и примерно в 13 раз ниже,



**Рисунок 2.** Дифференциальные спектры поглощения CYP2C9 при титровании абиратероном (А), D4A (В) и сульфафеназолом (Д). Зависимости разности поглощений ( $\Delta A$ ) между максимумом ( $A_{\max}$ ) и минимумом ( $A_{\min}$ ) в дифференциальных абсорбционных спектрах CYP2C9 от концентрации абиратерона (Б), D4A (Г) и сульфафеназола (Е). Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения из не менее трёх экспериментов.

чем для комплекса с D4A, что указывает на большее сродство сульфафеназола к активному центру CYP2C9 по сравнению с абиратероном и D4A. Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация сульфафеназола, при которой разность поглощений между максимумом и минимумом в дифференциальном абсорбционном спектре CYP2C9 выходит на постоянное значение, примерно в 3 раза меньше, чем начальная концентрация фермента, внесённого в систему (5 мкМ). По-видимому, это может быть связано с особенностями взаимодействия сульфафеназола с активным центром CYP2C9. Можно предположить кооперативное

влияние молекул CYP2C9 и изменение сродства к сульфафеназолу по мере увеличения его концентрации. Мы также сравнили параметр эффективности, выражаемый как  $\Delta A_{\max}/K_S$ . В случае абиратерона и D4A значения оказались схожими (0,038 и 0,047 соответственно), тогда как для сульфафеназола этот параметр составил 0,15, что указывает на более эффективное взаимодействие CYP2C9 с сульфафеназолом по сравнению с абиратероном и D4A.

Сравнение спектральных характеристик CYP2C9 при взаимодействии с абиратероном, D4A и сульфафеназолом представлено в таблице 1.

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АБИРАТЕРОНА И D4A С CYP2C9

Таблица 1. Спектральные характеристики CYP2C9 при взаимодействии с абиратероном и D4A

| Лиганд        | Спектральный тип лиганда | $n$             | $\Delta A_{\max}$ | $K_S$ , мкМ     | $\Delta A_{\max}/K_S$ |
|---------------|--------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Абиратерон    | II                       | $1,56 \pm 0,18$ | $0,065 \pm 0,003$ | $1,73 \pm 0,14$ | 0,038                 |
| D4A           | II                       | $1,58 \pm 0,09$ | $0,185 \pm 0,004$ | $3,95 \pm 0,16$ | 0,047                 |
| Сульфafenазол | II                       | $1,36 \pm 0,12$ | $0,045 \pm 0,002$ | $0,30 \pm 0,02$ | 0,150                 |

Примечание. Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения из не менее трёх экспериментов.

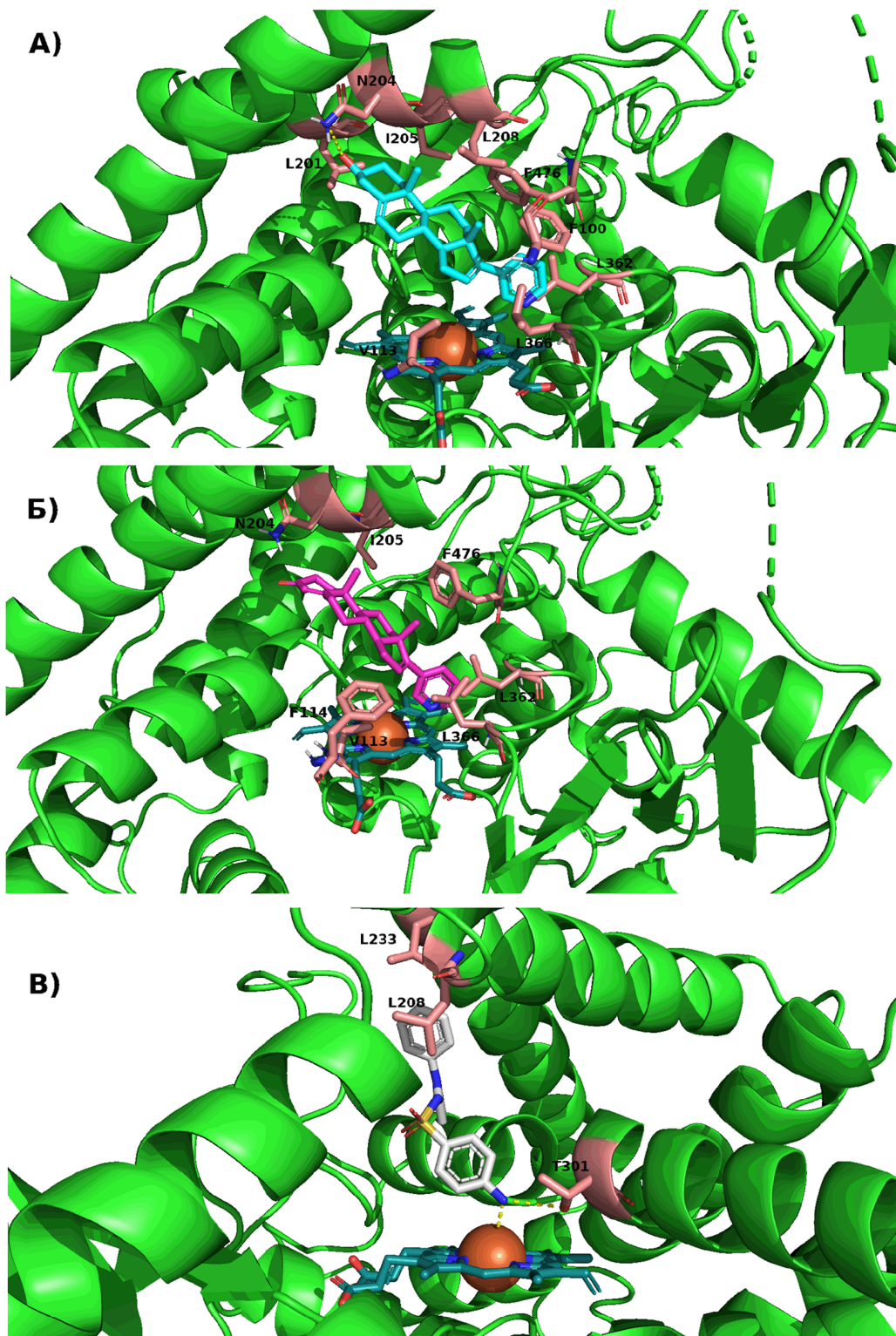


Рисунок 3. Положения абиратерона (А), D4A (Б) и сульфafenазола (В) в активном центре CYP2C9, предсказанные молекулярным докинггом. Абиратерон – голубой, D4A – пурпурный, сульфafenазол – серый. Жёлтым пунктиром показаны координационная и водородные связи.

Методом молекулярного докинга были получены модели взаимодействия абиратерона и D4A с активным центром CYP2C9. Абиратерон и D4A расположились схожим образом: их пиридиновые циклы находились в гидрофобном кармане, образованном остатками F100, L362, L366 и F476 (рис. 3). При этом атомы азота абиратерона и D4A оказались расположенными в стороне от иона железа гема на расстоянии в 6,7 Å и 5,8 Å соответственно (табл. 2). При таком расположении лигандов в активном центре CYP2C9 образование координационной связи между их атомами азота пиридиновых циклов и ионом железа гема фермента представляется затруднительным. Абиратерон образует водородную связь с боковой цепью N204, однако геометрия этой связи говорит об её низкой стабильности (угол между донором и акцептором около 120°). Наличие двойной связи между C4 и C5 атомами стероидного фрагмента D4A, а также замена гидроксильной группы в C3 положении на кето-группу приводит к иной ориентации атома кислорода D4A и невозможности образования подобной водородной связи. Таким образом, данные молекулярного докинга для абиратерона и D4A расходятся с экспериментальными данными, которые демонстрируют, что атомы азота обоих лигандов

образуют координационные связи с ионом железа гема. Тем не менее, положения, предсказанные докингом, нельзя назвать полностью недостоверными, так как абиратерон и D4A расположились таким образом, что атомы азота их гетероциклических фрагментов оказались ориентированными в сторону гема. Однако расстояния между атомами азота и железа оказались слишком велики для образования координационной связи. Подобное расхождение с экспериментальными данными может быть объяснено при сравнении трёхмерных структур CYP2C9 и CYP17A1 в комплексе с абиратероном, где последний образует координационную связь с ионом железа гема CYP17A1. Так, в I-спирали CYP17A1 наблюдается искажение её структуры в районе остатков G301, A302 и G303, которое и позволяет разместиться стероидному фрагменту абиратерона характерным образом и ориентировать азот пиридинового цикла в сторону иона железа гема. Однако в CYP2C9 в области, соответствующей I-спирали (G296, A297, G298), подобного искажения не наблюдается (рис. 4), из-за чего абиратерон и D4A не смогли расположить гетероциклические фрагменты в непосредственной близости от иона железа гема. Вероятно, что в реальных условиях

Таблица 2. Параметры связывания абиратерона, D4A и сульфafenазола с CYP2C9, полученные методом молекулярного докинга

| Лиганд        | Расстояние между атомом азота и ионом железа гема | Гидрофобные взаимодействия                     | Водородные связи       |                                       |                                 | Аффинность SF*, ккал/моль |
|---------------|---|--|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|               |   |  | Аминокислотный остаток | Расстояние между донором и акцептором | Угол между донором и акцептором |                           |
| Абиратерон    | 6,7 Å   | F100, V113, L201, I205, L208, L362, L366, F476 | N204                   | 3,57 Å                                | 124°                            | -8,9                      |
| D4A           | 5,8 Å   | N204, I205, F114, L362, L366, F476             | —                      | —                                     | —                               | -9,3                      |
| Сульфafenазол | 3,6 Å   | L208, L233                                     | T301                   | 3,21 Å                                | 106°                            | -8,6                      |

Примечание. \* SF – оценочная функция. Значения аффинности предсказаны оценочной функцией Vina AutoDock.

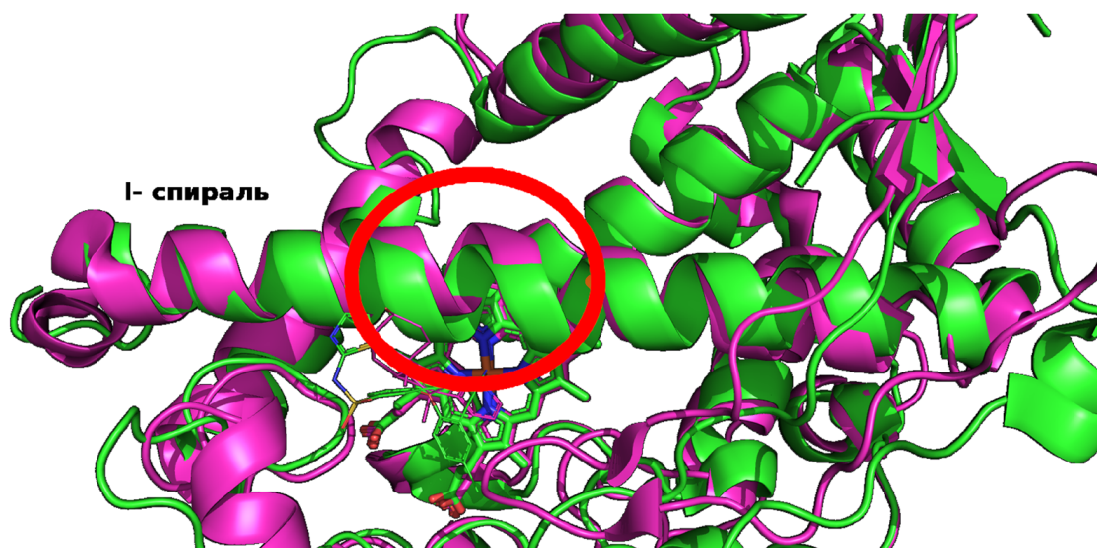
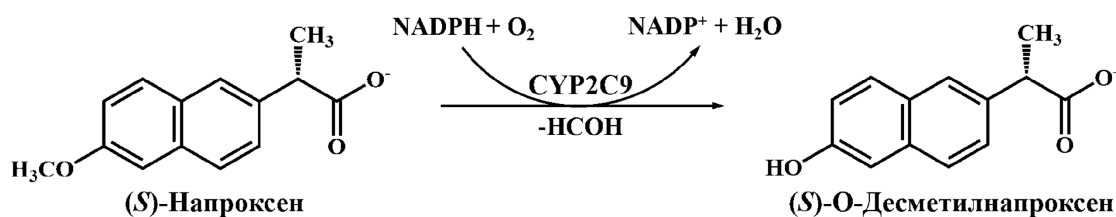


Рисунок 4. Сравнение конформаций I-спирали CYP2C9 (зелёный) и CYP17A1 (пурпурный). Красным кругом выделена область искажения.



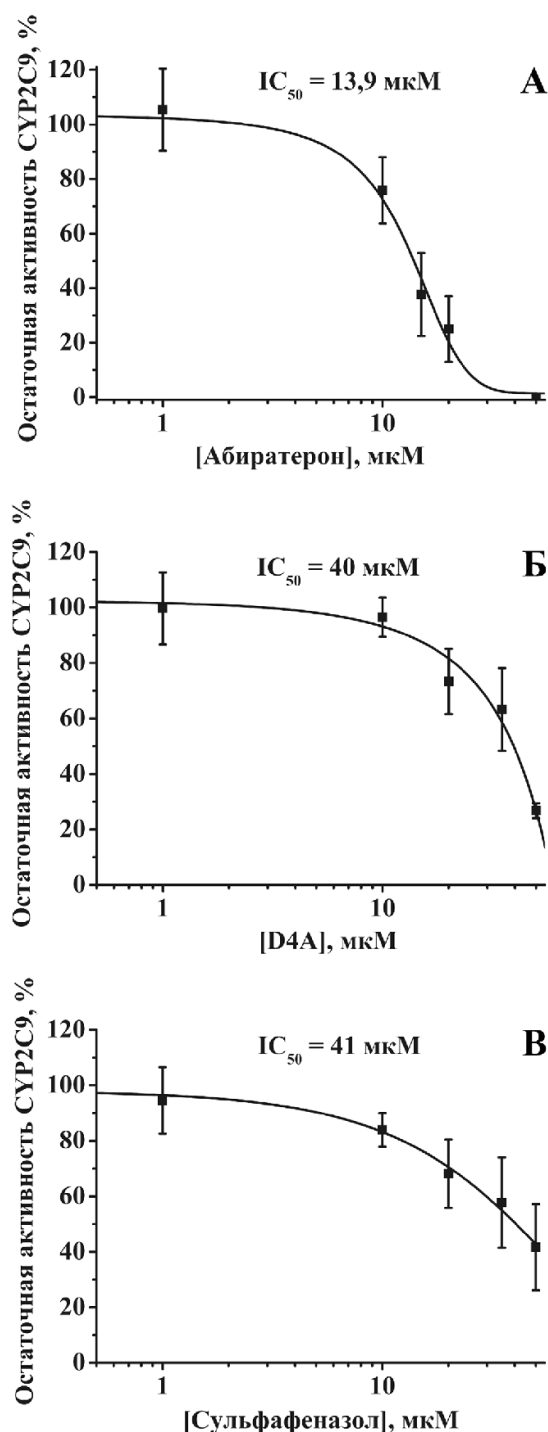
**Рисунок 5.** Метаболизм напроксена, осуществляемый при участии CYP2C9.

при связывании CYP2C9 стероидных лигандов фермент в области G296, A297, G298 будет изменять свою структуру, однако молекулярный докинг не способен имитировать столь масштабные конформационные изменения белка, что и может приводить к неточностям в предсказании положений связывания.

Для сравнения также был выполнен молекулярный докинг для комплекса сульфafenазола с CYP2C9. Докинг не смог найти для сульфafenазола положения, при котором азот его пиразольного цикла располагался бы в непосредственной близости от иона железа гема и был бы способен образовывать координационную связь. Однако удалось наблюдать другое положение, при котором аминогруппа сульфafenазола ориентирована в сторону иона железа гема, а расстояние между азотом и железом при этом составляет 3,6 Å. Подтверждением этому может служить структура кроличьего CYP2C5 в комплексе с диметильным производным сульфafenазола (PDB ID: 1n6b). В данном комплексе метильная группа при бензольном фрагменте этого производного, соответствующая аминогруппе сульфafenазола, ориентирована в сторону иона железа гема. Также сульфafenазол образовал водородную связь с боковой цепью T301 и вступил в небольшое число гидрофобных контактов с аминокислотными остатками активного центра. Это может объяснять визуальные различия дифференциальных спектров поглощения CYP2C9 при титровании абиратероном, D4A и сульфafenазолом, несмотря на то, что все исследуемые нами соединения являются лигандами II типа.

На основании характера спектральных изменений CYP2C9, индуцируемых абиратероном и D4A, и данных молекулярного докинга мы предположили ингибиторные свойства этих соединений по отношению к ферменту. Для сравнения ингибиторной активности абиратерона и D4A в качестве субстрата CYP2C9 мы использовали нестероидный противовоспалительный препарат напроксен, подвергающийся О-деметилированию с образованием в качестве продуктов реакции О-десметилнапроксена и формальдегида в соответствии со схемой реакции, представленной на рисунке 5.

Для сравнения в качестве стандартного ингибитора CYP2C9 был выбран сульфafenазол, ингибирующий О-деметилазную активность фермента по отношению к напроксену [28]. Все три исследуемых лиганда ингибировали активность CYP2C9. Из зависимостей, представленных на рисунке 6, были определены значения концентраций



**Рисунок 6.** Зависимости остаточной О-деметилазной активности CYP2C9 по отношению к 100 мкМ напроксена в присутствии различных концентраций абиратерона (А), D4A (Б) или сульфafenазола (В).

абиратерона, D4A и сульфafenазола, при которых активность CYP2C9 уменьшалась на 50% (IC<sub>50</sub>): 13,9 мкМ, 40 мкМ и 41 мкМ. Ранее было показано, что активность CYP2C9 в микросомальной системе по отношению к 150 мкМ (*S*)-напроксена в присутствии 25 мкМ сульфafenазола уменьшалась на 47% [28]. Значение IC<sub>50</sub> абиратерона по отношению к О-деметилованию напроксена при участии CYP2C9 оказалось примерно в 3 раза ниже по сравнению с IC<sub>50</sub> для сульфafenазола и D4A.

Суммируя полученные экспериментальные данные, можно сказать, что сродство сульфafenазола к активному центру CYP2C9 значительно выше, чем для абиратерона и D4A. При этом ингибирующая активность абиратерона существенно выше по сравнению с сульфafenазолом и D4A. Большая ингибирующая активность абиратерона, по сравнению с D4A, может объясняться большим сродством абиратерона к активному центру CYP2C9. Кроме того, абиратерон, по данным молекулярного докинга, способен образовывать водородную связь с остатком аспарагина в 204 положении белка и вступать в большее число гидрофобных взаимодействий с аминокислотными остатками активного центра CYP2C9 по сравнению с D4A. Таким образом, абиратерон и, вероятно, в меньшей степени D4A могут проявлять модулирующее действие по отношению к CYP2C9, что следует учитывать при прогнозе межлекарственных взаимодействий на уровне данного фермента при комплексной фармакотерапии, назначаемой пациентам с раком предстательной железы, особенно в случае назначения препаратов с низким терапевтическим индексом, таких как *S*-варфарин, толбутамид и фенитоин [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку CYP2C9 участвует в метаболизме большого числа лекарственных препаратов, велика вероятность возникновения межлекарственных взаимодействий, в основе которых лежит изменение активности этого фермента. В работе методом абсорбционной спектроскопии исследовано взаимодействие противоопухолевого препарата абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A — перспективного агента для лечения рака предстательной железы — с активным центром CYP2C9. Методом молекулярного докинга получены вероятные модели взаимодействия абиратерона и D4A с CYP2C9. Кинетический анализ CYP2C9 показал, что абиратерон и D4A ингибируют активность фермента. С помощью полученных данных могут быть спрогнозированы межлекарственные взаимодействия при совместном приеме абиратерона или D4A и лекарственных препаратов, метаболизируемых CYP2C9.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20250).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Li Z., Bishop A.C., Alyamani M., Garcia J.A., Dreicer R., Bunch D., Liu J., Upadhyay S.K., Auchus R.J., Sharifi N. (2015) Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer. *Nature*, **523**, 347-351. DOI: 10.1038/nature14406
2. Yoshimoto F.K., Auchus R.J. (2015) The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **151**, 52-65. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.026
3. Attard G., Reid A.H., Auchus R.J., Hughes B.A., Cassidy A.M., Thompson E., Oommen N.B., Folkard E., Dowsett M., Arlt W., de Bono J.S. (2012) Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **97**(2), 507-516. DOI: 10.1210/jc.2011-2189
4. Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Abazeed M., Upadhyay S.K., Balk S.P., Taplin M.E., Auchus R.J., Sharifi N. (2016) Redirecting abiraterone metabolism to finetune prostate cancer anti-androgen therapy. *Nature*, **533**(7604), 547-551. DOI: 10.1038/nature17954
5. Salvador J.A., Pinto R.M., Silvestre S.M. (2013) Steroidal 5 $\alpha$ -reductase and 17 $\alpha$ hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **137**, 199-222. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.04.006
6. Bonnet C., Boudou-Rouquette P., Azoulay-Rutman E., Huillard O., Golmard J.-L., Carton E., Noé G., Vidal M., Orvoen G., Wakilian A.C., Villeminey C., Blanchet B., Alexandre J., Goldwasser F., Thomas-Schoemann A. (2017) Potential drug-drug interactions with abiraterone in metastatic castration-resistant prostate cancer patients: A prevalence study in France. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **79**, 1051-1055. DOI: 10.1007/s00280-017-3291-z
7. del Re M., Fogli S., Derosa L., Massari F., de Souza P., Crucitta S., Bracarda S., Santini D., Danesi R. (2017) The role of drug-drug interactions in prostate cancer treatment: Focus on abiraterone acetate/prednisone and enzalutamide. *Cancer Treat. Rev.*, **55**, 71-82. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.03.001
8. Masamreh R.A., Kuzikov A.V., Haurychenka Y.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Filimonov D.A., Dmitriev A.V., Zavialova M.G., Gilep A.A., Shkel T.V., Strushkevich N.V., Usanov S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2020) *In vitro* interactions of abiraterone, erythromycin, and CYP3A4: implications for drug-drug interactions. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **34**(1), 120-130. DOI: 10.1111/fcp.12497
9. Friedlander T.W., Ryan C.J. (2010) Adrenal androgen synthesis inhibitor therapies in castration-resistant prostate cancer. In: *Drug Management of Prostate Cancer* (Figg W., Chau C., Small E., eds.), Springer, New York, NY, pp. 91-100. DOI: 10.1007/978-1-60327-829-4\_8

10. Malikova J., Brixius-Anderko S., Udhane S.S., Parween S., Dick B., Bernhardt R., Pandey A.V. (2017) CYP17A1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **174**, 192-200. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.007
11. Masamrek R., Filippova T., Haurychenka Y., Shcherbakov K., Veselovsky A., Strushkevich N., Shkel T., Gilep A., Usanov S., Shumyantseva V., Kuzikov A. (2020) Estimation of the inhibiting impact of abiraterone D4A metabolite on human steroid 21-monooxygenase (CYP21A2). *Steroids*, **154**, 108528. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.108528
12. Garrido M., Peng H.M., Yoshimoto F.K., Upadhyay S.K., Bratoeff E., Auchus R.J. (2014) A-ring modified steroidal azoles retaining similar potent and slowly reversible CYP17A1 inhibition as abiraterone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **143**, 1-10. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.01.013
13. Masamrek R.A., Filippova T.A., Haurychenka Y.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V. (2020) The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking. *Steroids*, **162**, 108693. DOI: 10.1016/j.steroids.2020.108693
14. Louet M., Labbé C.M., Fagnen C., Aono C.M., Homem-de-Mello P., Villoutreix B.O., Miteva M.A. (2018) Insights into molecular mechanisms of drug metabolism dysfunction of human CYP2C9\*30. *PLoS One*, **13**(5), e0197249. DOI: 10.1371/journal.pone.0197249
15. Daly A.K., Rettie A.E., Fowler D.M., Miners J.O. (2017) Pharmacogenomics of CYP2C9: functional and clinical considerations. *J. Pers. Med.*, **8**(1), 1. DOI: 10.3390/jpm8010001
16. Hoy S.M. (2013) Abiraterone acetate: A review of its use in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drugs*, **73**(18), 2077-2091. DOI: 10.1007/s40265-013-0150-z
17. Haidukevich I.V., Sushko T.A., Tumilovich A.M., Grabovec I.P., Usanov S.A., Gilep A.A. (2018) Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: An *in vitro* study. *Toxicol. In Vitro*, **50**, 249-256. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.04.002
18. Omura T., Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385.
19. Swain N.A., Batchelor D., Beaudoin S., Bechle B.M., Bradley P.A., Brown A.D., Brown B., Butcher K.J., Butt R.P., Chapman M.L., Denton S., Ellis D., Galan S.R.G., Gaulier S.M., Greener B.S., de Groot M.J., Glossop M.S., Gurrell I.K., Hannam J., Johnson M.S., Lin Z., Markworth C.J., Marron B.E., Millan D.S., Nakagawa S., Pike A., Printzenhoff D., Rawson D.J., Ransley S.J., Reister S.M., Sasaki K., Storer R.I., Stupple P.A., West C.W. (2017) Discovery of clinical candidate 4-[2-(5-Amino-1H-pyrazol-4-yl)-4-chlorophenoxy]-5-chloro-2-fluoro-N-1,3-thiazol-4-ylbenzenesulfonamide (PF-05089771): Design and optimization of diaryl ether aryl sulfonamides as selective inhibitors of NaV1.7. *J. Med. Chem.*, **60**(16), 7029-7042. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00598
20. Trott O., Olson A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334
21. Adasme M.F., Linnemann K.L., Bolz S.N., Kaiser F., Salentin S., Haupt V.J., Schroeder M. (2021) PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.*, **49**(W1), W530-W534. DOI: 10.1093/nar/gkab294
22. Kuzikov A.V., Filippova T.A., Masamrek R.A., Shumyantseva V.V. (2022) Electrochemical determination of (S)-7-hydroxywarfarin for analysis of CYP2C9 catalytic activity. *J. Electroanalytical Chemistry*, **904**, 115937. DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115937
23. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., Shikh E.V., Makhova A.A., Kisel M.S., Haidukevich I.V., Gilep A.A. (2022) Human cytochrome P450 2C9 and its polymorphic modifications: Electroanalysis, catalytic properties, and approaches to the regulation of enzymatic activity. *Processes*, **10**(2), 383. DOI: 10.3390/pr10020383
24. Nash T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**(3), 416-421. DOI: 10.1042/bj0550416
25. Luthra A., Denisov I.G., Sligar S.G. (2011) Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **507**(1), 26-35. DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.008
26. Denisov I.G., Frank D.J., Sligar S.G. (2009) Cooperative properties of cytochromes P450. *Pharmacol. Ther.*, **124**(2), 151-167. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.011
27. Bourrié M., Meunier V., Berger Y., Fabre G. (1996) Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**(1), 321-332.
28. Miners J.O., Coulter S., Tukey R.H., Veronese M.E., Birkett D.J. (1996) Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen. *Biochem. Pharmacol.*, **51**(8), 1003-1008. DOI: 10.1016/0006-2952(96)85085-4
29. van Booven D., Marsh S., McLeod H., Carrillo M.W., Sangkuhl K., Klein T.E., Altman R.B. (2010) Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet. Genomics*, **20**(4), 277-281. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283349e84

Поступила в редакцию: 04. 04. 2022.  
После доработки: 06. 05. 2022.  
Принята к печати: 24. 05. 2022.

## THE INTERACTIONS OF ABIRATERONE AND ITS PHARMACOLOGICALLY ACTIVE METABOLITE D4A WITH CYTOCHROME P450 2C9 (CYP2C9)

*R.A. Masamrekh<sup>1,2</sup>, A.V. Kuzikov<sup>1,2</sup>, T.A. Filippova<sup>1,2</sup>, K.A. Sherbakov<sup>1</sup>, A.V. Veselovsky<sup>1,2</sup>, V.V. Shumyantseva<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow 119121, Russia; \*e-mail: v\_shumyantseva@mail.ru  
<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Interactions of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) were studied with the antitumor drug abiraterone and its pharmacologically active metabolite D4A, promising as an agent for prostate cancer treatment. It was shown by absorption spectroscopy, that both investigated compounds induced spectral changes of CYP2C9, indicating interactions of the pyridine nitrogen atom with the heme iron ion of the active site of the enzyme, but interactions of the ligands with the enzyme could be mediated by a water molecule bound to the heme iron ion. Based on the spectral changes, the values of dissociation constants ( $K_S$ ) for complexes of abiraterone and D4A with CYP2C9 were calculated as  $1.73 \pm 0.14 \mu\text{M}$  and  $3.95 \pm 0.16 \mu\text{M}$ . Both compounds inhibited O-demethylase activity of CYP2C9 towards its substrate. At 100  $\mu\text{M}$  concentration of naproxen the concentrations of abiraterone, D4A and sulfaphenazole inhibiting CYP2C9 activity by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) were determined as 13.9  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  and 41  $\mu\text{M}$ , respectively. The obtained results can be used for prognosis of drug-drug interactions at CYP2C9 level during administration of abiraterone or D4A as an antitumor agent for prostate cancer treatment in complex pharmacotherapy.

**Key words:** abiraterone; D4A; naproxen; CYP2C9; drug-drug interactions

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20250).

Received: 04.04.2022; revised: 06.05.2022; accepted: 24.05.2022.