



УДК 577.175.6

## СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРЕГНА-D'-ПЕНТАРАНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ТРЕМЯ БЕЛКАМИ КРЫСЫ

© 2004 г. Е. В. Покровская\*, И. С. Левина\*\*, Л. Е. Куликова\*\*,  
А. В. Камерницкий\*\*, А. Н. Смирнов\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119992, Москва, Воробьевы горы;

\*\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Поступила в редакцию 07.02.2003 г. Принята к печати 28.02.2003 г.

Исследована конкуренция ряда 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклоалкановых производных прогестерона с <sup>3</sup>H-мечеными лигандами за связывающие участки рецептора прогестерона матки, пентаранофилина матки и пентаранофилина сыворотки крови крысы. Найдено, что избирательными лигандами рецептора прогестерона являются прогестерон, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопропанопрогестерон и 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопент-3'-енопрогестерон, избирательными лигандами пентаранофилина сыворотки – 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегна-1,4-диен-3,20-дион и 3-гидрокси-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-20-он. Избирательные лиганды для пентаранофилина матки не обнаружены. Большинство исследованных заместителей в кольцах А, В и D' 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклоалканопрогестеронов снижало сродство лигандов ко всем трем белкам. Особенно сильное негативное действие оказывали замена  $\Delta^4$ -3-кетогруппировки на  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксигруппировку в случаях рецептора прогестерона и пентаранофилина матки и введение 3',4'-диметильной группировки в случае пентаранофилина матки. Величина и даже направленность влияния конкретного заместителя на сродство лигандов к белкам в значительной мере зависели от наличия других заместителей в молекуле стероида. Высказано предположение о наличии определенного сходства в общем плане строения лигандсвязывающих карманов трех исследованных белков.

*Ключевые слова:* прогестерон, аналоги; рецептор прогестерона; транспорт стероидов.

### ВВЕДЕНИЕ

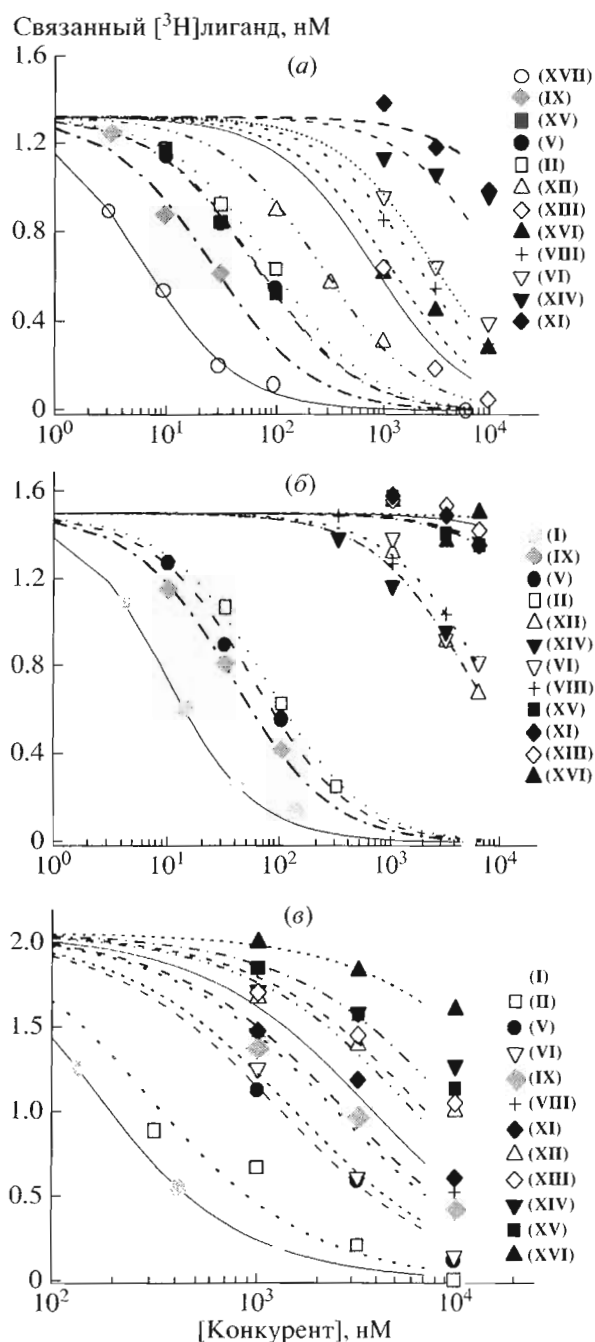
Прегна-D'-пентараны представляют собой группу производных прогестерона, содержащих дополнительный карбоцикл D' в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положениях стероидного скелета. Представители данной группы существенно различаются по характеру биологической активности. Часть из них, содержащая 6-членный цикл D', обладает активностью полных агонистов прогестерона в тестах стимуляции эндометрия и сохранения беременности, тогда как другие прегна-D'-пентараны, содержащие либо меньшее количество атомов углерода в дополнительном цикле, либо двойную связь в 6-членном цикле D', могут проявлять преимущественно один из указанных выше типов активности, т.е. ведут себя как селективные агонисты/антагонисты прогестерона [1]. Анализ взаимодействия некоторых представителей группы прегна-D'-пентаранов с рецептором прогестерона не выявил связи

между сродством данных лигандов к рецепторному белку и типом биологической активности [2–6]. Вместе с тем было обнаружено, что аффинность рецептора прогестерона к ДНК, содержащей гормончувствительный элемент, может различаться в присутствии разных лигандов, включая прегна-D'-пентараны, причем была выявлена тенденция к обратной корреляции между сродством рецептора к ДНК и полной агонистической активностью лигандов [7]. Таким образом, можно полагать, что структурные особенности прегна-D'-пентаранов могут обуславливать конформационные различия комплексов рецептора прогестерона с лигандами, определяющие в свою очередь различия в действии лигандов на уровне транскрипции. Не исключено, однако, что селективность действия некоторых прегна-D'-пентаранов может возникать и на других уровнях.

Было обнаружено, что, помимо рецептора прогестерона, прегна-D'-пентараны с 5- или 6-членным кольцом D' способны специфически связываться с еще одним белком матки с неизвестной функцией, причем сродство стероидов к этому белку (далее здесь обозначаемому как “пентаранофилин матки”) близко к их сродству к рецептору прогес-

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; ОКА – относительная конкурентная активность.

# Автор для переписки (тел.: (095) 939-36-78; факс: (095) 939-43-09; эл. почта: smirnov\_an@hotmail.com).



**Рис. 1.** Примеры анализа конкурентной активности производных прогестерона по вытеснению  $[^3\text{H}]$ прогестерона из комплексов с рецептором прогестерона (а),  $6\alpha$ -метил- $[^3\text{H}]$ - $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрогестерона из комплексов с пентанонефилином матки (б) и из комплексов с пентанонефилином сыворотки крови (в). Римские числа соответствуют номерам соединений.

терона, а концентрация лигандсвязывающих участков данного белка в несколько раз превышает концентрацию связывающих участков рецептора прогестерона [6, 8]. Данный белок выявлен в матке и почках, но не в других исследованных тканях [9], и это обстоятельство могло бы способство-

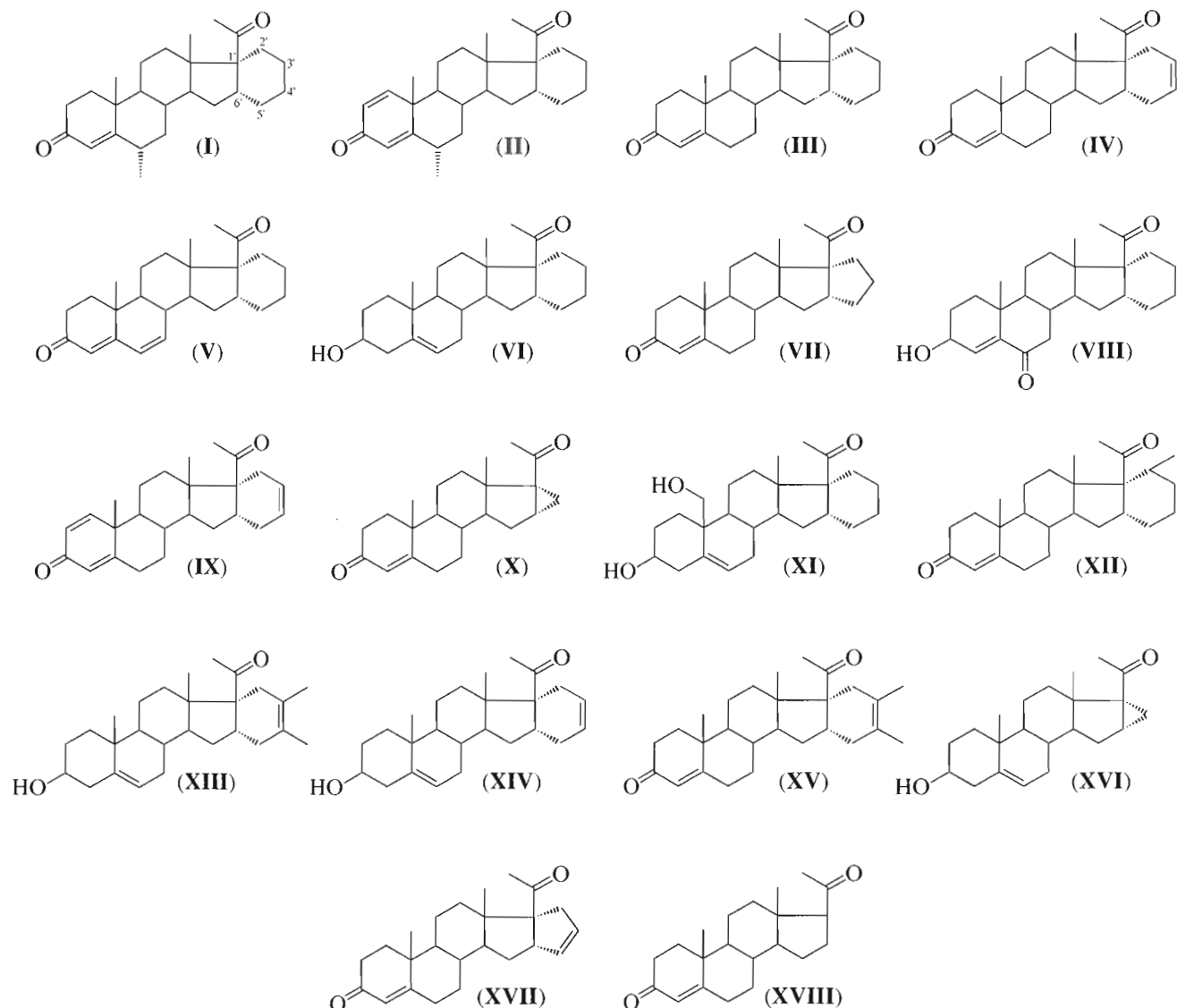
вать тканеспецифичности действия селективных прегна-D'-пентананов путем простой конкуренции пентананофилина матки с рецептором за общие лиганды. Представляется также весьма вероятным, что данный белок выполняет некую функцию в клетках и что эта функция может модифицироваться связыванием прегна-D'-пентананов. Дополнительный  $16\alpha,17\alpha$ -карбоцикл обеспечивает также взаимодействие прегна-D'-пентананов с неким белком сыворотки крови [10] (далее здесь обозначаемому как "пентананофилин сыворотки"). Хотя сродство изученных лигандов к сывороточному белку приблизительно на два порядка ниже, чем к рецептору прогестерона, но концентрация лигандсвязывающих участков пентананофилина сыворотки весьма велика, что может обеспечивать, с одной стороны, реальное снижение эффективной концентрации прегна-D'-пентананов в крови, а с другой – пролонгирование их действия за счет торможения метаболизма и экскреции.

Некоторые из изученных представителей ряда прегна-D'-пентананов могут послужить прототипами селективных аналогов прогестерона нового поколения, имеющих перспективы применения в акушерстве, гинекологии, контрацепции. Вполне очевидно, что знание структурных детерминант, определяющих способность соединений данного ряда взаимодействовать с рецептором прогестерона и белками, регулирующими это взаимодействие, является необходимым этапом в дизайне новых гормональных аналогов. Целью настоящей работы явилось изучение направленности и степени влияния ряда заместителей в структуре прегна-D'-пентананов (I)–(XVIII) на сродство лигандов к указанным выше белкам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные кривые вытеснения  $[^3\text{H}]$ лигандов немечеными конкурентами из комплексов с тремя изученными белками представлены на рис. 1. Можно видеть, что экспериментальные точки достаточно хорошо ложатся на серии кривых, соответствующих модели "один белок–два лиганда", т. е. в использованных условиях  $[^3\text{H}]$ лиганды и немеченые конкуренты специфически связывались в каждом случае лишь одним белком. Величины относительной конкурентной активности (ОКА) 18 проанализированных соединений в отношении трех белков крысы приведены в табл. 1. В качестве эталона сравнения использовали лиганд, обладавший наибольшим сродством к данному белку (ОКА = 1). Для удобства сравнения данные дублированы на рис. 2. Влияние различных заместителей на величины ОКА стероидов к трем белкам представлено в табл. 2.

Первый вывод, который можно сделать при взгляде на рис. 2, заключается в том, что среди изу-



ченных стероидов имеются соединения, с высокой избирательностью взаимодействующие с рецептором прогестерона (соединения (X), (XVII), (XVIII)) и пентаранофилином сыворотки (соединение (VI), отчасти соединение (II)), но нет избирательных лигандов пентаранофилина матки. Избирательность соединений (X) и (XVIII) по отношению к рецептору прогестерона, возможно, определяется тем, что минимальный размер кольца D' или отсутствие этого кольца служит препятствием для эффективного взаимодействия стероидов с пентаранофилинами матки и сыворотки. По-видимому, более объемный  $16\alpha,17\alpha$ -циклоалкановый заместитель обеспечивает образование дополнительных гидрофобных контактов между пентаранофилинами и лигандами. Исключение составляет соединение (XVII), содержащее ненасыщенное 5-членное кольцо D', которое, как и соединения (X) и (XVIII), эффективно взаимодейст-

вует с рецептором прогестерона, но не с пентаранофилинами матки и сыворотки. При этом между пентаранофилинами матки и сыворотки имеется существенная разница: первый из них предпочтительно взаимодействует с соединением, имеющим насыщенное 5-членное кольцо D', а второй – с соединениями, содержащими 6-членное кольцо D' (ср. соединения (VII) и (III) на рис. 2).

Возможно, избирательные лиганды для пентаранофилина матки могут быть созданы на основе соединения (VII) путем введения заместителей, ингибирующих взаимодействие стероидов с рецептором прогестерона и/или пентаранофилином сыворотки. Одним из таких заместителей могла бы служить  $6\alpha$ -метильная группа, которая направленно влияет на сродство стероидов к рецептору прогестерона и пентаранофилину матки (табл. 2). Во-первых, введение двойной связи в 6-членное кольцо D' соединения (III) с обра-

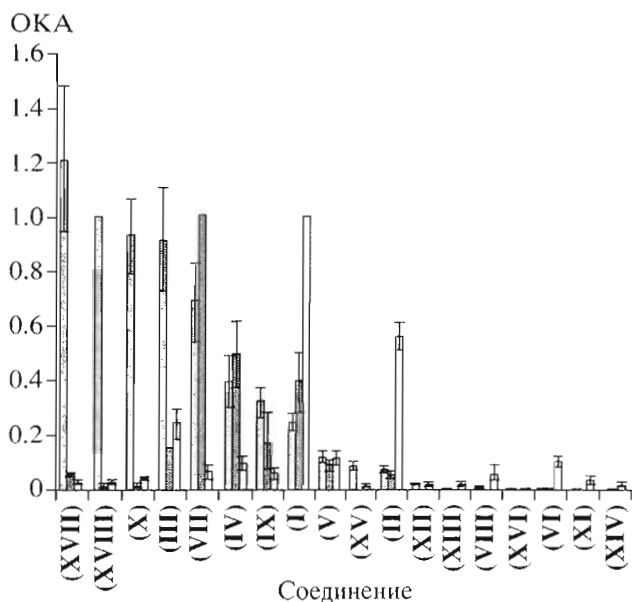


Рис. 2. Соотношение величин относительной конкурентной активности производных прогестерона (I)–(XVIII) к рецептору прогестерона (серые столбики), пентаранофиллину матки (темные столбики) и пентаранофиллину сыворотки крови (светлые столбики).

зованием соединения (IV) (см. также пару соединений (VI)/(XIV)) повышает сродство стероида к пентаранофиллину матки и снижает его сродство к рецептору прогестерона и пентаранофиллину сыворотки (табл. 1, 2, рис. 2). Во-вторых, соединение (VII), имеющее 5-членное кольцо D', предпочтительно взаимодействует с пентаранофиллином белками. Поэтому можно было ожидать, что введение двойной связи в кольцо D' соединения (VII) с образованием соединения (XVII) может дополнительно повысить избирательность стероида в отношении пентаранофилина матки. Полученные результаты, однако, оказались полностью противоположными ожидаемым: соединение (XVII) является избирательным лигандом рецептора прогестерона, а не пентаранофилина матки.

Если отталкиваться от структуры 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона (III) как базовой, то большинство модификаций молекулы снижает сродство производных ко всем трем белкам (табл. 2). Особенно мощное ингибирующее действие оказывает замена  $\Delta^4$ -3-кетогруппировки на  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксигруппировку в случаях рецептора прогестерона и пентаранофилина матки и введение 3',4'-диметильной группировки в кольцо D' в случае пентаранофилина матки. Последний факт позволяет ожидать, что сравнение биологических эффектов соединений (IV) и (XV) могло бы пролить свет на функции пентаранофилина матки. Одинаковая направленность влияния большинства модификаций стероидов на их сродство к исследованным

белкам позволяет предполагать, что общий план строения лигандсвязывающих карманов данных белков сходен.

Сравнение влияния одних и тех же модификаций молекулы прегна-D'-пентарана для различных базовых соединений показывает, что эффект заместителя на сродство лиганда к данному белку может существенно (на два порядка) различаться или быть даже противоположным (табл. 2). Данный факт можно интерпретировать двояким образом. С одной стороны, существование дальних взаимодействий, связанных с передачей пространственных или электронных эффектов в одной части скелета и приводящих к изменениям конформации и электронной плотности удаленных участков молекулы, является давно и хорошо установленным фактом [11]. С другой стороны, белки, включая рецепторы и ферменты метаболизма стероидов, обладают значительной конформационной пластичностью. Эта пластичность, в частности, проявляется в различиях конформации рецептора в присутствии агонистов, частичных агонистов/антагонистов и полных антагонистов [7, 12, 13]. Вполне очевидно, что взаимная ориентация аминокислотных остатков, формирующих лигандсвязывающий карман белка и участвующих в лиганд-белковом взаимодействии, может по-разному модифицироваться в присутствии лигандов с разными заместителями, и соответственно эффект введения дополнительного общего заместителя будет по-разному сказываться на взаимодействии лигандов с белком. Следующий из сказанного практический вывод заключается в том, что знание влияния каждого из заместителей в молекуле лиганда на сродство последнего к белку не является достаточным для предсказания сродства при сочетании данных заместителей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Источники белков.** В работе использовали половозрелых девственных самок крыс смешанной популяции массой 200–250 г. Животные получали внутримышечно инъекции эстрадиола по 10 мкг в 200 мкл пропиленгликоля ежедневно на протяжении 4-х дней и забивались декапитацией на 5-й день. Собранную кровь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, 30 мин при 4–6°C и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Полученную сыворотку хранили при –20°C. Матки измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе при 0–4°C в течение 5 мин в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1 мМ диотреит, 10% глицерин, при весовом соотношении ткань/буфер 1 : 6. Гомогенат центрифугировали при 4°C в течение 1 ч при 50000 g. Надоса-

**Таблица 1.** Величины относительной конкурентной активности прогестерона и его производных для рецептора прогестерона, пентаранофилина матки и пентаранофилина сыворотки крови крысы

Шифр	Лиганд	ОКА*		
		Рецептор прогестерона	Пентаранофилин матки	Пентаранофилин сыворотки
(I)	6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон	0.25 $\pm$ 0.03 (6)	0.40 $\pm$ 0.10 (4)	1
(II)	6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегна-1,4-диен-3,20-дион	0.076 $\pm$ 0.012 (3)	0.059 $\pm$ 0.011 (4)	0.56 $\pm$ 0.05 (4)
(III)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклогексанопрогестерон	0.91 $\pm$ 0.20 (9)	0.15 $\pm$ 0.03 (4)	0.24 $\pm$ 0.05 (3)
(IV)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклогекс-3'-енопрогестерон	0.40 $\pm$ 0.09 (5)	0.50 $\pm$ 0.12 (4)	0.10 $\pm$ 0.02 (5)
(V)	6 $\alpha$ -Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегна-4,6-диен-3,20-дион	0.12 $\pm$ 0.02 (3)	0.097 $\pm$ 0.018 (4)	0.11 $\pm$ 0.02 (4)
(VI)	3 $\beta$ -Гидроксн-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-20-он	0.0015 $\pm$ 0.0002 (3)	0.00043 $\pm$ 0.00012 (4)	0.10 $\pm$ 0.02 (4)
(VII)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопентанопрогестерон	0.69 $\pm$ 0.14 (3)	1	0.066 $\pm$ 0.024 (5)
(VIII)	3 $\beta$ -Гидроксн-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-6,20-дион	0.0030 $\pm$ 0.0002 (3)	0.00090 $\pm$ 0.00021 (4)	0.063 $\pm$ 0.029 (3)
(IX)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклогекс-3'-енопрегна-1,4-диен-3,20-дион	0.32 $\pm$ 0.05 (3)	0.17 $\pm$ 0.11 (4)	0.060 $\pm$ 0.022 (3)
(X)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопропанопрогестерон	0.93 $\pm$ 0.14 (7)	0.018 $\pm$ 0.005 (4)	0.043 $\pm$ 0.003 (3)
(XI)	3 $\beta$ ,19-Дигидроксн-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-5-ен-20-он	0.00021 $\pm$ 0.00007 (4)	0.00015 $\pm$ 0.00009 (4)	0.037 $\pm$ 0.016 (4)
(XII)	2'-Метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон	0.021 $\pm$ 0.003 (3)	0.00046 $\pm$ 0.00004 (4)	0.027 $\pm$ 0.006 (4)
(XIII)	3 $\beta$ -Гидроксн-3',4'-диметил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3'-енопрегн-5-ен-20-он	0.0057 $\pm$ 0.0008 (3)	0.00010 $\pm$ 0.00007 (4)	0.021 $\pm$ 0.010 (4)
(XIV)	3 $\beta$ -Гидроксн-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3'-енопрегн-5-ен-20-он	0.00018 $\pm$ 0.00009 (4)	0.0013 $\pm$ 0.0003 (4)	0.020 $\pm$ 0.008 (3)
(XV)	3',4'-Диметил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогекс-3'-енопрогестерон	0.087 $\pm$ 0.013 (3)	0.00010 $\pm$ 0.00004 (4)	0.012 $\pm$ 0.004 (3)
(XVI)	3 $\beta$ -Гидроксн-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопропанопрегн-5-ен-20-он	0.0027 $\pm$ 0.0013 (3)	0.00009 $\pm$ 0.00007 (4)	0.0024 $\pm$ 0.0011 (3)
(XVII)	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопент-3'-енопрогестерон	1.21 $\pm$ 0.27 (4)	0.049 $\pm$ 0.006 (3)	0.025 $\pm$ 0.006 (3)
(XVIII)	Прогестерон	1	0.012 $\pm$ 0.001 (4)	0.033 $\pm$ 0.005 (3)

\* Величины ОКА ( $M \pm m$ ) рассчитывали по соотношению  $K_d$  для лиганда, обладающего наибольшим сродством к данному белку (прогестерона в случае рецептора прогестерона, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона в случае пентаранофилина матки и 6 $\alpha$ -метил-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона в случае пентаранофилина сыворотки), и сравниваемого лиганда. В скобках – количество определений.

**Таблица 2.** Сравнение влияния заместителей на относительное сродство прегна-D'-пентаранов к рецептору прогестерона, пентаранофилину матки и пентаранофилину сыворотки крови крысы

Заместитель	Сравниваемые пары соединений	Направление и кратность изменений*		
		Рецептор прогестерона	Пентаранофилин матки	Пентаранофилин сыворотки
6 $\alpha$ -Метил $\Delta^1$	(III)–(I)	↓ 3.6	↑ 2.6	↑ 4.0
	(I)–(II)	↓ 3.3	↓ 6.7	↓ 1.8
	(IV)–(IX)	↓ 1.2	↓ 2.9	↓ 1.7
$\Delta^4$ -3-Кето $\rightarrow$ $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидрокси	(III)–(VI)	↓ 600	↓ 348	↓ 2.4
	(IV)–(XIV)	↓ 2300	↓ 387	↓ 5.0
	(X)–(XVI)	↓ 350	↓ 9.6	↓ 18.1
	(XIII)–(XV)	↓ 15	нет изменений	нет изменений
$\Delta^6$	(I)–(V)	↓ 2.1	↓ 4.1	↓ 8.8
19-Гидрокси	(VI)–(XI)	↓ 7.3	↓ 2.8	↓ 2.7
3-Кето $\rightarrow$ 3 $\beta$ -гидрокси + 6-кето $\Delta^3$	(III)–(VIII)	↓ 303	↓ 166	↓ 3.8
	(III)–(IV)	↓ 2.3	↑ 3.3	↓ 2.4
	(VI)–(XIV)	↓ 8.7	↑ 3.0	↓ 5.2
2'-Метил	(VII)–(XVII)	↑ 1.8	↓ 20	↓ 2.7
	(III)–(XII)	↓ 43	↓ 322	↓ 9.0
	(IV)–(XV)	↓ 4.6	↓ 5040	↓ 8.3
3',4'-Диметил	(XIV)–(XIII)	↑ 43	↓ 12.3	нет изменений
	(III)–(VII)	↓ 1.3	↑ 6.7	↓ 3.6
	(III)–(X)	нет изменений	↓ 8.5	↓ 5.6
16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -Циклогексано $\rightarrow$ 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклопентано	(VI)–(XIV)	↑ 1.7	↓ 4.6	↓ 43
	(III)–(XVIII)	нет изменений	↓ 13.0	↓ 7.4
16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -Циклогексано $\rightarrow$ 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклопропано				
16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -Циклогексано $\rightarrow$ отсут- ствие кольца D'				

\*Стрелки, направленные вверх и вниз, обозначают повышение и снижение сродства соответственно; числа рядом со стрелками – кратность различий в величинах ОКА.

дочную фракцию с концентрацией белка 4–6 мг/мл использовали немедленно.

**Стероиды.** Немеченные прегна-D'-пентараны (I)–(XVII) синтезировали как описано ранее [14–16]. Прогестерон и гидрокортизон были получены от Sigma (St. Louis, США). [1,2,6,7- $^3$ H]Прогестерон ( $^3$ [H]прогестерон) с удельной радиоактивностью 86 Ки/ммоль получен от предприятия “Изотоп” (Санкт-Петербург), 6 $\alpha$ -метил-[1,2- $^3$ H]-16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерон (43 Ки/ммоль) синтезировали как описано ранее [15].

**Измерение относительной конкурентной активности (ОКА) стероидов для рецептора прогестерона** проводили с применением [ $^3$ H]прогестерона в присутствии 3 мкМ гидрокортизона и цитозоля матки. ОКА стероидов для пентаранофилина матки измеряли с применением 6 $\alpha$ -метил- [ $^3$ H]-16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона, 127 нМ немеченого прогестерона и цитозоля матки [8]. Определение ОКА стероидов для сывороточного пентаранофилина проводили с 6 $\alpha$ -метил- [ $^3$ H]-

16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексанопрогестероном и сывороткой, разведенной в 8–16 раз буфером для гомогенизации (см. выше) без PMSF и дитиотреита. Цитозоль или разведенную сыворотку (100 мкл) инкубировали при 0–4 $^{\circ}$ C в течение 20 ч со 100 мкл смеси стероидов в соответствующем буфере, включающей (60–80)  $\times 10^3$  имп./мин (конечная концентрация 3–6 нМ) [ $^3$ H]лиганда и немеченый конкурент (конечные концентрации от 0 до 10 мкМ). Связанный белком и свободный лиганд разделяли инкубацией со 100 мкл 2% суспензии активированного угля Norit A (Serva, Германия), покрытого декстраном-70 (Fluka, Швейцария) в течение 5 мин при 0–4 $^{\circ}$ C. После центрифугирования в течение 5 мин при 3000g отбирали аликвоты (250 мкл) надосадочной фракции для измерения радиоактивности.

Инкубацию проводили в кварцевых пробирках, покрытых BSA [2]. Радиоактивность измеряли с использованием диоксанового сцинтиллятора [17] при эффективности счета 20%. Содержание белка определяли с помощью красителя

Кумасси голубого [18]. Все измерения проводили в двух параллельных образцах. Каждый эксперимент воспроизводили 3–4 раза. Определение равновесных констант диссоциации ( $K_d$ ) осуществляли подбором параметров  $K_d$  и  $V_{max}$ , обеспечивающих минимальное отклонение экспериментальных данных от кинетической модели “один белок – два лиганда” [6, 8]. Безразмерные величины ОКА рассчитывали по соотношению  $K_d$  для лиганда, обладающего наибольшим сродством к данному белку (прогестерона в случае рецептора прогестерона,  $16\alpha,17\alpha$ -циклопентанопрогестерона в случае пентаранофилина матки и  $6\alpha$ -метил- $16\alpha,17\alpha$ -циклогексанопрогестерона в случае пентаранофилина сыворотки), и сравниваемого лиганда.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-03-32523).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камерницкий А.В., Левина И.С. // Хим.-фарм. журн. 1991. Т. 25. С. 4–16.
2. Смирнов А.Н., Яковенко А.Р., Левина И.С., Камерницкий А.В. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1460–1470.
3. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1279–1287.
4. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В. // Пробл. эндокринологии. 1998. Т. 44. С. 37–40.
5. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1998. Т. 125. С. 532–534.
6. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 774–781.
7. Shchelkunova T.A., Rubtsov P.M., Levina I.S., Kamernitsky A.V., Smirnov A.N. // Steroids. 2002. V. 67. P. 323–332.
8. Smirnov A.N., Pokrovskaya E.V., Kogteva G.S., Shevchenko V.P., Levina I.S., Kulikova L.E., Kamernitsky A.V. // Steroids. 2000. V. 65. P. 163–170.
9. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф., Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В. // Биоорганическая химия. 2002. Т. 28. С. 251–257.
10. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 846–852.
11. Илиел Э., Аллинджер Н., Энжисал С., Маррисон Г. Конформационный анализ. М.: Мир, 1969. С. 315–383.
12. Смирнов А.Н. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1157–1181.
13. Hall J.M., McDonnell D.P., Korach K.S. // Mol. Endocrinol. 2002. V. 16. P. 469–486.
14. Левина И.С., Камерницкий А.В. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. С. 31–39.
15. Камерницкий А.В., Левина И.С., Куликова Л.Е., Галахова Т.Н., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф., Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шелкунова Т.А. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 8. С. 1532–1535.
16. Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В., Шашков А.С., Смирнов А.Н., Покровская Е.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2002. № 4. С. 649–653.
17. Bray G. // Analyt. Biochem. 1960. V. 1. P. 279–285.
18. Bradford M.M. // Analyt. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

### Structural Features of Pregna-D'-pentaranes Determining Their Interaction with Three Rat Proteins

E. V. Pokrovskaya\*, I. S. Levina\*\*, L. E. Kulikova\*\*, A. V. Kamernitsky\*\*, and A. N. Smirnov\*\*

# Phone: +7 (095) 939-3678, fax: +7 (095) 939-4309, e-mail: smirnov\_an@hotmail.com

\*Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

\*\*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

Competition of a number of progesterone  $16\alpha,17\alpha$ -cycloalkane derivatives with  $^3\text{H}$ -labeled ligands for the binding sites of the rat uterine progesterone receptor, uterine pentaranophilin, and blood serum pentaranophilin was studied. We found that the selective ligands for the progesterone receptor are progesterone,  $16\alpha,17\alpha$ -cyclopropanoprogesterone, and  $16\alpha,17\alpha$ -cyclopent-3'-enoprogesterone and the selective ligands for serum pentaranophilin are  $6\alpha$ -methyl- $16\alpha,17\alpha$ -cyclohexanopregna-1,4-diene-3,20-dione and  $3\beta$ -hydroxy- $16\alpha,17\alpha$ -cyclohexanopregn-5-en-20-one. No selective ligands for the uterine pentaranophilin were found. The majority of substituents in rings A, B, and D' we studied decreased the affinity of ligands for all the three proteins. The substitution of the  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxy grouping for the  $\Delta^4$ -3-keto grouping exerted the strongest negative effect in the case of the progesterone receptor and the uterine pentaranophilin, whereas the introduction of the 3',4'-dimethyl grouping strongly inhibited the ligand affinity for the uterine pentaranophilin. The extent and even the direction of the effect of a substituent on the affinity of ligands for the proteins substantially depended on the presence of other substituents in the steroid molecules. We hypothesized that a certain similarity exists between three proteins studied in respect to the structures of their ligand-binding pockets. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ligand binding, progesterone analogues, progesterone receptor, steroid transport