

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

**Інститут молекулярної біології і генетики**

**Остринська Ольга Василівна**



УДК 577.322

**РОЗРОБКА НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ  
ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

**Науковий керівник –** доктор хімічних наук, професор  
**Ярмолюк Сергій Миколайович**,  
Інститут молекулярної біології і  
генетики НАН України,  
завідувач відділу біомедичної хімії.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Платонова Тетяна Миколаївна**,  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна,  
провідний науковий співробітник  
відділу структури і функції білка;

кандидат біологічних наук, старший  
науковий співробітник  
**Карпов Павло Андрійович**,  
Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України,  
завідувач лабораторії біоінформатики  
та структурної біології.

Захист відбудеться 24 листопада 2015 р. о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03680, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розіслано 23 жовтня 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук,  
с.н.с.



І. В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Раціональний дизайн низькомолекулярних органічних інгібіторів протеїнкіназ є важливим складником сучасної біотехнології та біомедичної хімії. Високоєфективні специфічні інгібітори застосовуються для вивчення ролі ензимів у мережі сигнальних шляхів клітини і розробки нових фармацевтичних препаратів.

Протеїнкіназа СК2 – перспективна молекулярна мішень для пошуку нових інгібіторів як попередників ліків. Це висококонсервативна конститутивно активна серин-треонінова кіназа, яка задіяна в регуляції таких важливих біологічних процесів, як транскрипція, трансляція, контроль клітинного циклу, проліферація, виживання клітин та апоптоз (Litchfield et al., 2003). СК2 є одним із ключових компонентів мережі сигнальних шляхів клітини, оскільки фосфорилує більш ніж 400 білків. Зміна рівня експресії або активності цієї кінази спричинює розвиток низки нейродегенеративних патологій, запальних процесів, серцево-судинних хвороб, вірусних і паразитарних інфекцій (Guerra et al., 2008), онкологічних захворювань (Tawfic et al., 2001) та ін.

Постійно триває активний пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед різних класів хімічних сполук (Sarno et al., 2002, Sarno et al., 2005, Sarno et al., 2011, Cozza et al., 2012), у тому числі серед похідних бензімідазолу й бензотриазолу (Szyszka et al., 1995, Battistutta et al., 2001), антрахінону (Yim et al., 1999), флуоренону (Meggio et al., 2004), кумарину (Cozza et al., 2006), флавоноїду (Lolli et al., 2012), дибензофурандіолу (Guerra et al., 2015) та ін.

Деякі інгібітори СК2 вже ефективно використовуються для вивчення функцій цього ензиму в клітині. Одна сполука – СХ-4945 – знаходиться на другій стадії клінічних досліджень як ліки проти багатьох типів пухлин (Pierre et al., 2011, Chon et al., 2015). Тому раціональний дизайн нових інгібіторів протеїнкінази СК2 є актуальним.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася в рамках бюджетних тем відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення протеїнкіназ як молекулярних мішеней для розробки терапевтичних засобів методами комбінаторної хімії та комп'ютерного моделювання» (номер державної реєстрації 0107U003345, 2008–2012 рр.), «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.) та конкурсної тематики «Оптимізація інгібіторів протеїнкінази СК2 та дослідження їхньої біологічної активності на культурах ракових клітин» (номер державної реєстрації 0107U004939, 2007–2009 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є раціональний дизайн нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 людини та дослідження їх взаємодії з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту цього ензиму методами молекулярного моделювання.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Провести рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук за допомогою молекулярного докінгу та відібрати перспективні сполуки для біохімічного тестування.

2. Визначити інгібувальну активність відібраних сполук відносно протеїнкінази СК2 *in vitro*.

3. Побудувати й дослідити комплекси активних сполук із протеїнкіназою СК2 за допомогою методів молекулярного моделювання.

4. Встановити взаємозв'язок між хімічною структурою та інгібувальною активністю знайдених інгібіторів.

5. Розробити моделі взаємодії знайдених низькомолекулярних інгібіторів з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2.

6. Провести порівняльні тестування найактивніших із розроблених інгібіторів на рекомбінантних білках каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$ .

**Об'єкт дослідження:** інгібувальна активність низькомолекулярних органічних сполук щодо протеїнкінази СК2 людини та її каталітичних субодиниць.

**Предмет дослідження:** протеїнкіназа СК2, інгібітори протеїнкінази СК2, комплекси «інгібітор – протеїнкіназа СК2 $\alpha$ », комплекси «інгібітор – протеїнкіназа СК2 $\alpha'$ ».

**Методи дослідження:** гнучкий молекулярний докінг, молекулярна динаміка, визначення інгібувальної активності сполук *in vitro* із використанням [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ та за допомогою люциферазної реакції, отримання рекомбінантних білків протеїнкіназ в клітинах *E. coli*, виділення і рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція.

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

1. Розроблено й охарактеризовано нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 людини серед п'яти класів хімічних сполук: 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолів, 4'-гідроксифлавонів, 4'-карбоксіфлавонолів, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонових кислот і (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот.

2. На основі даних, отриманих в результаті молекулярного моделювання та під час вивчення залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», запропоновано моделі взаємодії розроблених інгібіторів з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2.

**Практичне значення одержаних результатів.** У результаті виконання дисертаційної роботи розроблено й охарактеризовано нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 людини серед п'яти класів хімічних сполук. Отримані інгібітори можуть бути використані для вивчення особливостей функціонування ензиму в мережі сигнальних шляхів клітини, а також для з'ясування його ролі в біологічних процесах.

Хімічні структури розроблених інгібіторів можуть слугувати основою для розробки терапевтичних засобів проти онкологічних захворювань, нейродегенеративних патологій, запальних процесів, серцево-судинних хвороб, вірусних та паразитарних інфекцій. Запропоновані моделі взаємодії сполук з АТФ-

зв'язувальним сайтом СК2 є основою для пошуку й розробки нових ефективних та специфічних інгібіторів цієї кінази.

**Особистий внесок здобувача.** Результати, викладені в дисертації, отримано автором особисто або за безпосередньої участі в проведенні й обробці результатів досліджень. Дисертантом власноручно проведено аналіз і узагальнення літературних джерел за темою дослідження. Постановку наукових завдань здійснено спільно з науковим керівником – д.х.н., проф. С. М. Ярмолюком. Автором проведено тестування сполук біохімічними методами *in vitro* та одержано рекомбінантні білки каталітичних субодиниць протеїнкінази СК2. Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук проведено особисто або в співпраці з к.б.н. А. Г. Голубом та м.н.с. А. А. Грищенком. Дисертантом побудовано моделі комплексів інгібіторів з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2 та її каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$  за допомогою методів молекулярного моделювання і проведено їх аналіз. Встановлення взаємозв'язку між хімічною структурою та інгібувальною активністю сполук, а також розробка стратегії подальшої хімічної оптимізації сполук були проведені спільно з к.х.н., с.н.с. В. Г. Бджолою. Хімічний синтез сполук виконали співробітники відділу біомедичної хімії: к.х.н., н.с. А. О. Баланда, к.х.н., н.с. Н. В. Брюховецька, м.н.с. В. М. Сапелкін, м.н.с. А. О. Приходько та пров. інж. І. М. Котей.

Автор висловлює слова щирої вдячності к.б.н. О. П. Кухаренку за допомогу в проведенні біохімічних тестів *in vitro* та одержанні рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$ , а також членам групи молекулярного моделювання відділу біомедичної хімії за допомогу в аналізі результатів досліджень та підготовці наукових публікацій. Автор щиро вдячний науковому керівнику д.х.н., проф. С. М. Ярмолюку за корисні поради щодо планування роботи, обговорення та інтерпретації результатів досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на II Міжнародній науково-практичній конференції «Комп'ютерне моделювання в хімії та технологіях і сталий розвиток» (Київ, Україна, 2010), Першому Всеукраїнському з'їзді «Медична та біологічна інформатика і кібернетика» (Київ, Україна, 2010), IV Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 165-річчю з дня народження І. І. Мечникова (Київ, Україна, 2010), VII Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ-2011», присвяченій 60-річчю Севастопольського національного технічного університету (Севастополь, Україна, 2011), Науково-практичній конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (Десяті Данилевські читання)» (Харків, Україна, 2011), XXVIII Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (Київ, Україна, 2013), VII Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 175-річчю з дня народження О. Я. Данилевського (Київ, Україна, 2013), VIII Конференції молодих вчених

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 90-річчю з дня народження П. Г. Костюка (Київ, Україна, 2014).

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи опубліковано в 5 статтях у наукових фахових виданнях та 8 тезах доповідей на наукових конференціях. За результатами роботи отримано 1 деклараційний патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено в 4 розділах, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який нараховує 205 найменувань. Дисертація містить 33 рисунки і 16 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 149 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

### Матеріали та методи досліджень

**Гнучкий докінг.** Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг було проведено за допомогою пакета програм DOCK 4.0 в АТФ-зв'язувальну кишеню каталітичної субодиниці протеїнкінази СК2 (Protein Data Bank ID: 1JWH\_A). Сфери активного сайту рецептора були розраховані за допомогою програмного забезпечення *sphgen* пакета програм DOCK та *Connolly MS*. Карти решітки були розраховані за допомогою програми *Grid* пакета DOCK. Структуру рецептора описували повноатомною моделлю. Обертальні зв'язки та якірні елементи молекул лігандів ідентифікували за допомогою програми DOCK в автоматичному режимі. Множинні якірні елементи в структурі ліганду були дозволені. Пошук орієнтацій лігандів проводили з використанням автоматичного збігу. Здійснювали локальну мінімізацію енергії орієнтацій та конформацій ліганду і його якірних елементів. Ремінімізацію ліганду було дозволено. Параметри мінімізації енергії було взято за замовчуванням. Для побудови комплексів «ліганд – СК2» використовували каталітичні субодиниці протеїнкінази СК2 (PDB ID: 1JWH\_A та 2ZJW) та каталітичну субодиницю СК2 $\alpha'$  (PDB ID: 3OFM).

**Молекулярна динаміка комплексів «ліганд – рецептор».** Розрахунок молекулярної динаміки комплексів «FLC26 – СК2 $\alpha$ » і «FLC26 – СК2 $\alpha'$ » було проведено за допомогою пакета програм GROMACS. Топології лігандів (формат файлів .gro та .itp) будували за допомогою сервера Dundee PRODRG (<http://davarpc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrq/submit.html>). Стартову позицію лігандів в активному сайті рецептора генерували за допомогою пакета програм DOCK. Структуру комплексу «ліганд – рецептор» розміщували в центрі кубічного боксу та заповнювали його молекулами води (кількість молекул води визначалася програмою автоматично). Систему було врівноважено введенням необхідної кількості відповідних йонів. Мінімізацію енергії комплексу у водному оточенні проводили з використанням алгоритму крутого спуску. Фінальні координати системи «рецептор – ліганд – розчинник», отримані в результаті мінімізації енергії, було використано для розрахунку «обмеженої» молекулярної динаміки протягом 40 пс, яка включала гармонічну прив'язку позицій атомів рецептора та ліганду до вихідних координат.

Систему «білок – ліганд – вода», отриману в результаті «обмеженої» динаміки, брали як вихідну для розрахунку «повної» динаміки протягом 10 нс. Візуальний аналіз молекулярно-динамічних траєкторій проводили в програмі VMD.

**Біохімічні тести *in vitro*.** Тестування сполук проводили *in vitro* з використанням  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  або методом непрямой детекції за допомогою люциферазної реакції. Реакційна суміш містила рекомбінантний білок холоензиму СК2 ( $\alpha\alpha\beta\beta$ , New England Biolabs, Великобританія, або рекомбінантні білки каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$ ), субстрат RRRDDDSDDD (New England Biolabs, Великобританія), буфер та воду. Розчини інгібіторів готували в ДМСО (диметилсульфоксид). В залежності від обраного типу тестування сполук, вимірювання рівня радіоактивного сигналу або люмінесценції проводили на сцинтиляційному лічильнику (Tricarb 2800 TR, PerkinElmer, США) або люмінометрі (VICTOR 1420-50 Multilabel Counter, PerkinElmer, США), відповідно. Для визначення показника  $\text{IC}_{50}$  використовували низку концентрацій інгібітора і будували титрувальні криві. Експерименти з протеїнкіназами ASK1, JNK3, Aurora A, Rock1, FGFR1, c-Met та Tie2 було проведено згідно з інструкціями фірми-постачальника (Millipore, США).

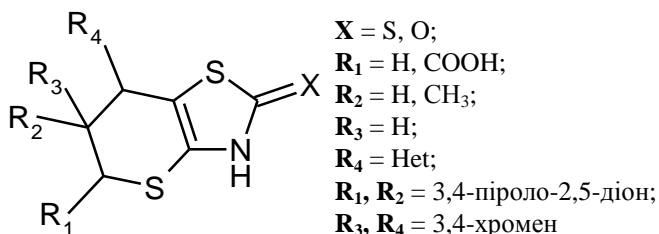
**Одержання рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ .** Для одержання рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 використовували плазмиду pCDNA4/TO із вбудованими в неї клонами кДНК СК2 $\alpha$  або СК2 $\alpha'$  людини (плазміда люб'язно надана Dr. Ivan Gut, LICR London) та відповідні пари олігонуклеотидних праймерів. ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері Perkin Elmer з використанням нативної форми Pfu полімерази (Fermentas, Литва) і dNTPs (Fermentas, Литва). Ампліфіковані відповідні вставки та вектор (pET-28a) піддавали рестрикції, очищували і лігували. Рекомбінантні білки субодиниць СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$  експресували в клітини *E. coli* й очищали методом «batch» хроматографії на сорбенті металосефарози (Clontech Laboratories, США) та діалізу.

## Результати досліджень та обговорення

Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 проводили за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу 150 000 низькомолекулярних органічних сполук і біохімічних тестів *in vitro*. Для подальшої оптимізації ідентифікованих інгібіторів використовували метод раціонального молекулярного дизайну.

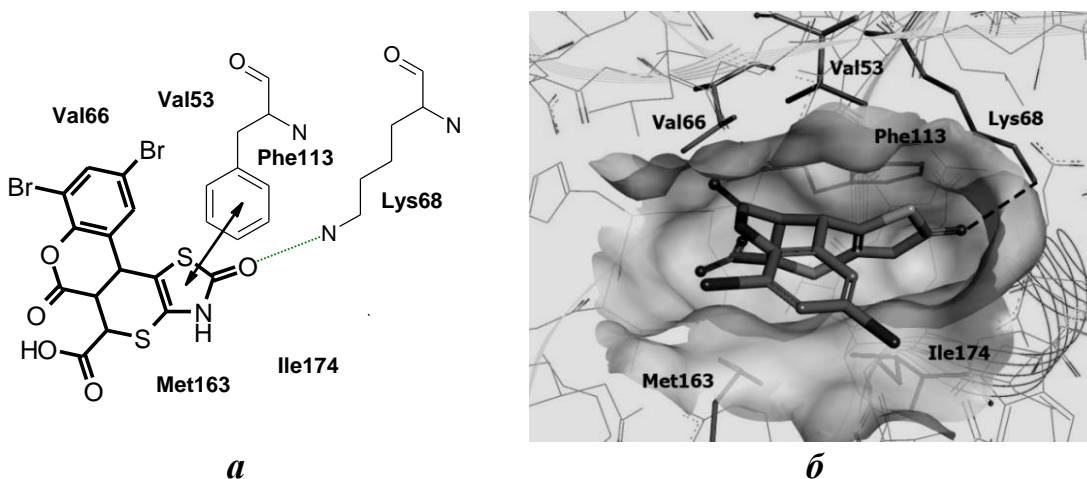
**Ідентифікація і дослідження похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу як нових інгібіторів протеїнкінази СК2.** Похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу (рис. 1) було ідентифіковано в ході рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу комбінаторних бібліотек низькомолекулярних органічних сполук. Сім сполук було відібрано для визначення інгібувальної активності *in vitro* за допомогою методу непрямой детекції протеїнкіназної активності (люциферазна реакція). Біохімічні тести показали, що всі сполуки є активними. Показник  $\text{IC}_{50}$  найефективнішого інгібітора – сполуки

ТТТ5 (8,10-дибромо-2,6-діоксо-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-7-оксо-1,4-дитіо-3-аза-циклопента[с]фенантрен-5-карбонова кислота) – становив 0,2 мкМ.



**Рис. 1.** Загальна хімічна структура семи похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, які були ідентифіковані за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу

За допомогою програми DOCK 4.0 було побудовано комплекси інгібіторів із СК2 (на рис. 2 зображено тип зв'язування найактивнішого інгібітору ТТТ5 з АТФ-акцепторним сайтом СК2). За даними докінгу, стабілізації комплексів похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу із СК2 сприяла низка гідрофобних контактів з амінокислотними залишками Val53, Val66, Met163, Ile174 та Phe113 (стекинг-взаємодія). Усі досліджувані сполуки утворювали водневий зв'язок із Lys68, що знаходився в глибині сайту зв'язування АТФ.



**Рис. 2.** Інгібітор ТТТ5 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *а* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (пунктирною лінією відмічено водневі зв'язки; стрілкою – стекинг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «ТТТ5-СК2» (водневі зв'язки зображено пунктирною лінією)

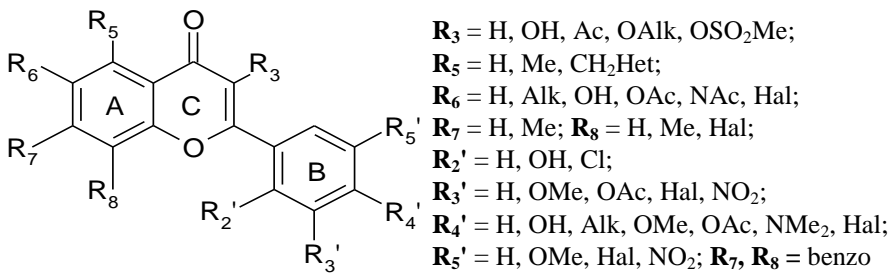
Отже, ідентифіковано нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу і досліджено їх взаємодію з амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту. Знайдено інгібітор (сполука ТТТ5) з активністю 0,2 мкМ.

**Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних флавону.** В результаті віртуального скринінгу бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук для біохімічного скринінгу *in vitro* було відібрано похідні флавону. Сполуки із цього класу є перспективними молекулами з точки зору медичної хімії, оскільки



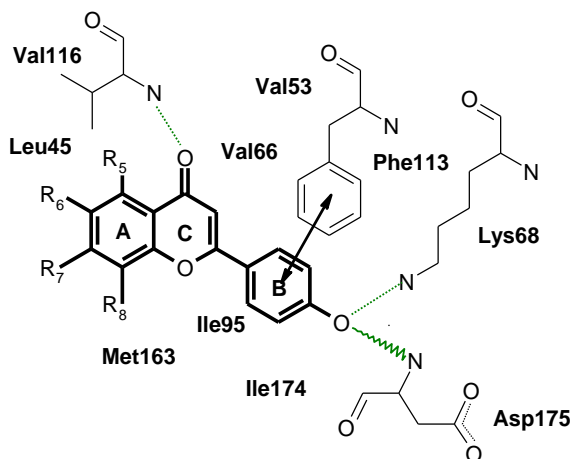
мають низьку токсичність і проявляють протизапальні, протівірусні та протипухлинні властивості (Kandaswami et al., 1994). Відомо, що найбільш активний інгібітор СК2 серед похідних флавону природного походження – фізетин – має показник  $IC_{50}$  0,35 мкМ.

Дослідження та хімічна оптимізація похідних 4'-гідроксифлавону як інгібіторів протеїнкінази СК2. За допомогою тестів *in vitro* з використанням  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  було встановлено, що 19 із 49 відібраних в результаті докінгу похідних флавону (рис. 3) пригнічували активність СК2 з  $IC_{50} < 30$  мкМ. При цьому інгібітор FNH28 (2-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-6,8-диметил-хромен-4-он,  $IC_{50}=0,1$  мкМ) пригнічував активність ензиму у 3 рази краще, ніж фізетин. Цей факт спонукав нас до подальшої оптимізації похідних флавону.

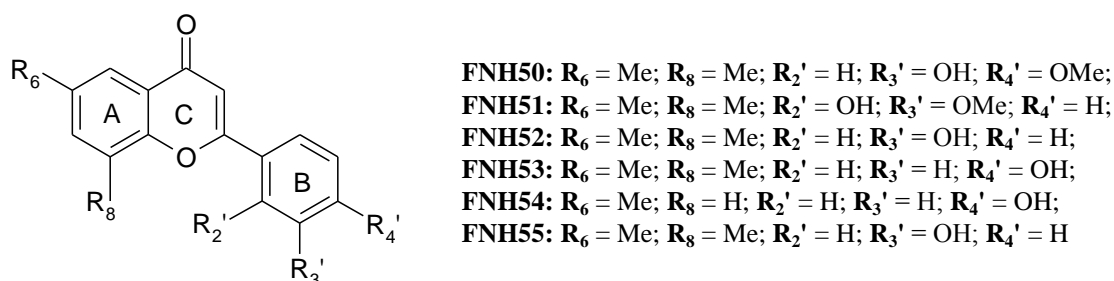


**Рис. 3. Загальна хімічна структура 49-ти похідних флавону, які були ідентифіковані за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу**

Було проведено аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» та комплексів «ліганд – рецептор», побудованих за допомогою програми DOCK 4.0. Отримані результати дали змогу розробити модель взаємодії похідних флавону з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2 (рис. 4). Встановлено, що найкраще активність ензиму пригнічували сполуки, які містили в 4' позиції флавону гідроксильну групу. Згідно з даними молекулярного моделювання, цей замісник брав участь в утворенні водневих зв'язків з амінокислотними залишками Lys68 та/чи Asp175 у глибині активного сайту кінрази. Оскільки подібний зв'язок здатні утворювати сполуки з гідроксильною групою в 3' позиції флавону, оптимальну позицію ОН-групи у фенільному заміснику було з'ясовано за допомогою направленої синтезу і біохімічного тестування шести додаткових сполук (FNH50-FNH55), хімічну структуру яких представлено на рис. 5.



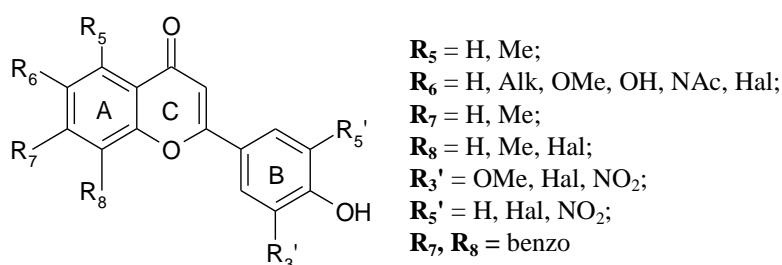
**Рис. 4. Модель взаємодії похідних флавону з АТФ-зв'язувальним сайтом ензиму. Стекінг-взаємодію з Phe113 позначено стрілкою, водневі зв'язки – пунктирною лінією, ймовірний водневий зв'язок з Asp175 – зигзагоподібною лінією**



**Рис. 5.** Загальна хімічна структура розроблених похідних гідроксифлавону

За допомогою аналізу взаємозв'язку між хімічною структурою та інгібувальною активністю сполук FNH50-FNH55 було з'ясовано, що перспективною для подальшої оптимізації є структура 4'-гідроксифлавону (рис. 6). Хімічну оптимізацію проводили у двох напрямках: за першим, у кільце А вводили додаткові гідрофобні замісники з метою покращення афінності лігандів до АТФ-зв'язувального сайту; за другим, проводили підбір замісників у кільці В для збільшення його гідрофобності та підсилення кислотних властивостей 4'-гідроксильної групи флавону.

Проведена оптимізація дала змогу розробити 28 нових інгібіторів протеїнкінази СК2 (рис. 6), при цьому 26 з них мали показник  $IC_{50} < 1$  мкМ. Найбільшу активність продемонстрували сполуки FNH68 ( $IC_{50}=0,01$  мкМ) і FNH79 ( $IC_{50}=0,004$  мкМ). За допомогою кінетичного аналізу було показано, що ці сполуки є АТФ-конкурентними інгібіторами ( $K_i$  становить 3,5 нМ і 1,8 нМ, відповідно).



**Рис. 6.** Загальна хімічна структура розроблених похідних 4'-гідроксифлавону

Інгібітори FNH68, FNH76, FNH78 та FNH79 було протестовано *in vitro* на панелі, яка складалася з чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Аугога А та Rock1) та трьох тирозинових (FGFR1, с-Met і Tie2) протеїнкіназ (табл. 1). З'ясовано, що досліджувані сполуки були селективними щодо СК2.

**Таблиця 1**

**Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ**

Інгібітор	СК2	ASK1	Jnk3	Aurora A	Rock1	FGFR1	с-Met	Tie2
FNH68	1,1	126	99	54	120	74	126	93
FNH76	2,3	116	102	57	113	81	108	112
FNH78	1,3	124	103	19	121	54	54	36
FNH79	0,8	126	103	55	89	74	87	85

На рис. 7 зображено найактивніший інгібітор FNH79 в активному сайті протеїнкінази СК2 (комплекс побудовано за допомогою програми DOCK 4.0). Сполука утворює гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val53, Val66, Ile95, Phe113, Met163 та Ile174 і водневі зв'язки з Val116 та Lys68. Отримані результати повністю узгоджуються з раніше розробленою нами моделлю (рис. 4).

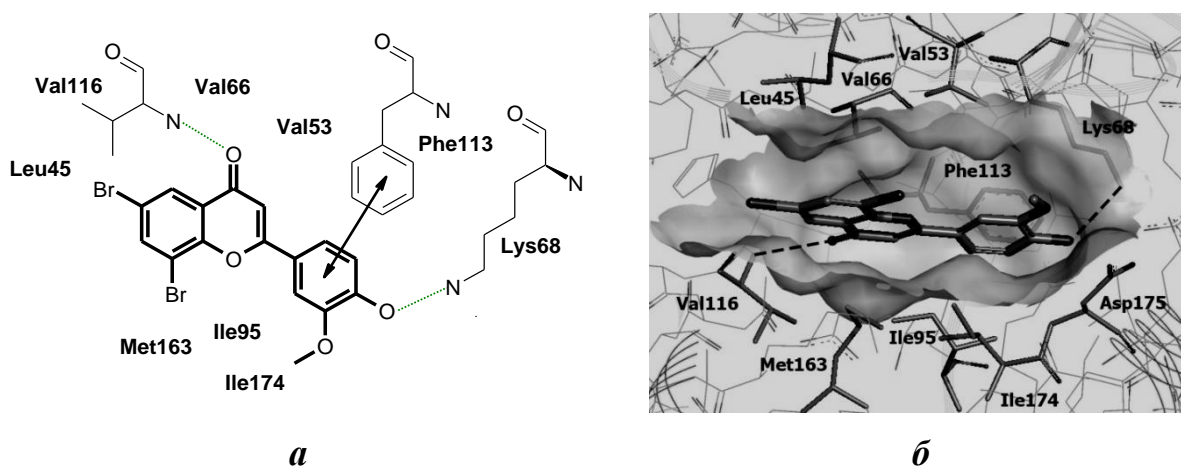


Рис. 7. Інгібітор FNH79 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (пунктирною лінією відмічено водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «FNH79-СК2» (водневі зв'язки зображено пунктирною лінією)

Отже, за допомогою методів молекулярного докінгу *in silico*, біохімічних тестів *in vitro* та двохетапної хімічної оптимізації було розроблено інгібітор FNH79, показник  $IC_{50}$  якого становить 0,004 мкМ, тоді як найактивнішого природного інгібітору із класу флавонів – фізетину – 0,35 мкМ.

Дослідження та хімічна оптимізація похідних 4'-карбоксіфлавонолу як інгібіторів протеїнкінази СК2. Для визначення інгібувальної активності *in vitro* було відібрано 13 карбоксилвмісних похідних флавону методом гнучкого докінгу (рис. 8). За даними біохімічних тестів із використанням  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , п'ять сполук пригнічували активність протеїнкінази СК2 у діапазоні від 0,6 мкМ до 8 мкМ.

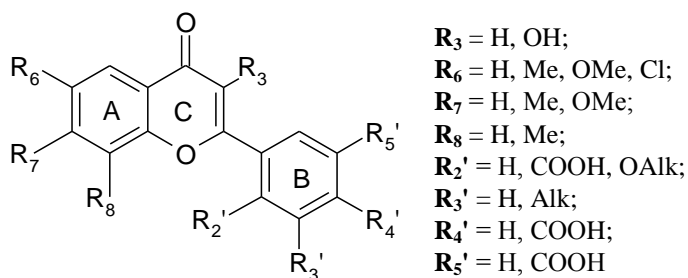


Рис. 8. Загальна хімічна структура 13-ти ідентифікованих похідних карбоксіфлавонолу

На основі результатів, отриманих під час аналізу залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» і комплексів інгібіторів із СК2, було розроблено модель взаємодії похідних карбоксіфлавонолу з активним сайтом

протеїнкінази. Встановлено, що ключовими замісниками в структурі досліджуваних флавонів є гідроксильна група в 3-му положенні гетероциклу та 4'-карбоксільна група фенольного радикалу. Тому для подальшої хімічної оптимізації було обрано структуру 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонолу (рис. 9). Додатково вводили гідрофобні замісники в 6-ту і 8-му позиції гетероциклу, оскільки гідрофобні взаємодії є важливими для формування високоафінних комплексів між інгібітором та СК2.

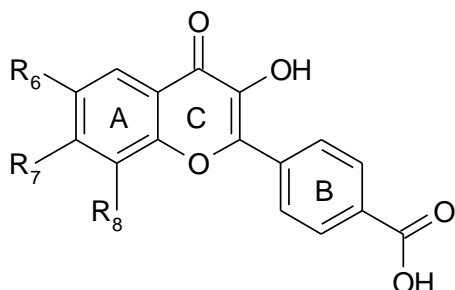


Рис. 9. Загальна хімічна структура 13-ти розроблених похідних 4'-карбоксифлавонолу

У результаті проведеної оптимізації було одержано 13 похідних 4'-карбоксифлавонолу (рис. 9, табл. 2), які, за даними біохімічного тестування *in vitro*, пригнічували активність СК2 у субмікромолярному діапазоні концентрацій (показник  $IC_{50} = 0,009-0,72$  мкМ). У кінетичних експериментах *in vitro* було встановлено, що найактивніші інгібітори FLC21 та FLC26 конкурують з молекулою АТФ за сайт зв'язування СК2, їх показник  $K_i$  становив 13 нМ та 2,5 нМ, відповідно.

Таблиця 2

Хімічні структури замісників похідних 4'-гідроксифлавонолу та результати біохімічного тестування ( $IC_{50}$ , мкМ)

Сполука	Структура замісників			$IC_{50}$ , мкМ
	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	
FLC14	Me	Me	H	0,3
FLC15	OMe	H	H	0,25
FLC16	NHAc	H	H	0,72
FLC17	Cl	Me	H	0,17
FLC18	Cl	H	H	0,18
FLC19	Me	H	Me	0,07
FLC20	Et	H	H	0,16
FLC21	Cl	H	Cl	0,04
FLC22	H	Me	H	0,7
FLC23	Br	H	H	0,08
FLC24	H	OMe	H	0,29
FLC25	Cl	H	Me	0,05
FLC26	Br	H	Br	0,009

Дослідження сполук FLC21 і FLC26 на панелі із семи протеїнкіназ показало, що вони також пригнічують активність FGFR1, c-Met та Aurora A, щоправда, з нижчою ефективністю, ніж CK2 (табл. 3).

Таблиця 3

## Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ

Інгібітор	CK2	ASK1	Jnk3	Aurora A	Rock1	FGFR1	c-Met	Tie2
FLC21	1,8	101	102	42	105	71	31	90
FLC26	1	73	101	14	92	35	16	103

Для сполуки FLC21 було побудовано комплекс із CK2 за допомогою молекулярного докінгу (рис. 10). Як і було передбачено в запропонованій нами раніше моделі взаємодії похідних карбоксифлавонолу з кіназою, сполука утворювала гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val66, Ile95, Phe113, Met163 та Ile174 і водневі зв'язки з Val116, Glu114 та Lys68.

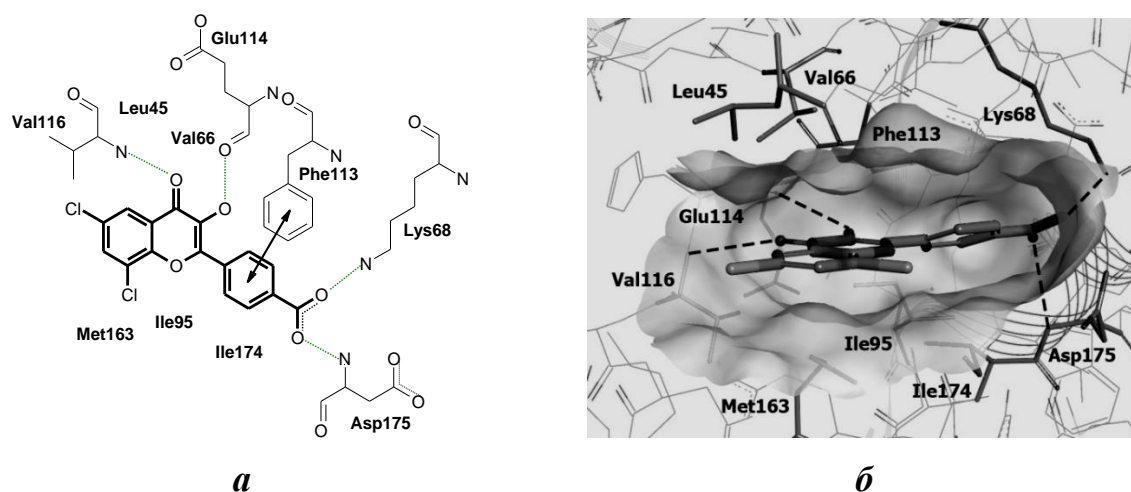


Рис. 10. Інгібітор FLC21 в АТФ-зв'язувальному сайті CK2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *а* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази CK2 (пунктирною лінією відмічено водневі зв'язки; стрілкою – стекинг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «FLC21-CK2» (водневі зв'язки зображено пунктирною лінією)

Отже, завдяки виробленим рекомендаціям для хімічної оптимізації, активність ідентифікованих сполук вдалося покращити більш ніж у 50 разів. Показано, що структура розроблених похідних 4'-карбоксифлавонолу є оптимальною для формування водневих зв'язків одночасно у двох ділянках активного сайту CK2 – шарнірній ділянці (Val116, Glu114) та в області зв'язування залишку фосфату молекули АТФ (Lys68, Asp175), що є важливою умовою для прояву високої інгібувальної активності сполук.

**Розробка інгібіторів протеїнкінази CK2 на основі похідних (тієно[2,3-д]піримідин)карбонової кислоти.** Сполуки з класу тієно[2,3-д]піримідинів вже

відомі як інгібітори протеїнкіназ ErbB, PDGF, VEGFR-2, FLT3 і Tie2 (Woods et al., 2008, Munchhof et al., 2004, Dai et al., 2005), проте немає жодних даних щодо пригнічення ними активності СК2. Поряд з тим, велика кількість інгібіторів цього ензиму містить у своїй структурі карбоксильну групу, тому було вирішено дослідити похідні (тієно[2,3-d]піримідин)карбонової кислоти.

Дослідження похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти як інгібіторів протеїнкінази СК2. За допомогою біохімічних тестів із використанням  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , було встановлено, що 19 сполук із 28 синтезованих *de novo* похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти (рис. 11) пригнічували активність ензиму більш ніж на 50 % при концентрації від 0,1 мкМ до 30 мкМ. Результати кінетичних експериментів найефективнішого інгібітору ба продемонстрували, що він є АТФ-конкурентним ( $K_i=40$  нМ).

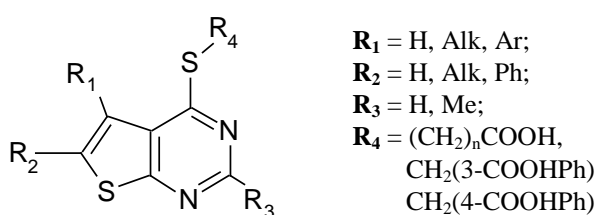


Рис. 11. Загальна хімічна структура синтезованих *de novo* 28-ми похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти

Селективність інгібіторів ба та 6d (табл. 4) щодо СК2 було підтверджено на панелі, яка складалася із чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Аугога А та Rock1) та трьох тирозинових (FGFR1, c-Met і Tie2) протеїнкіназ.

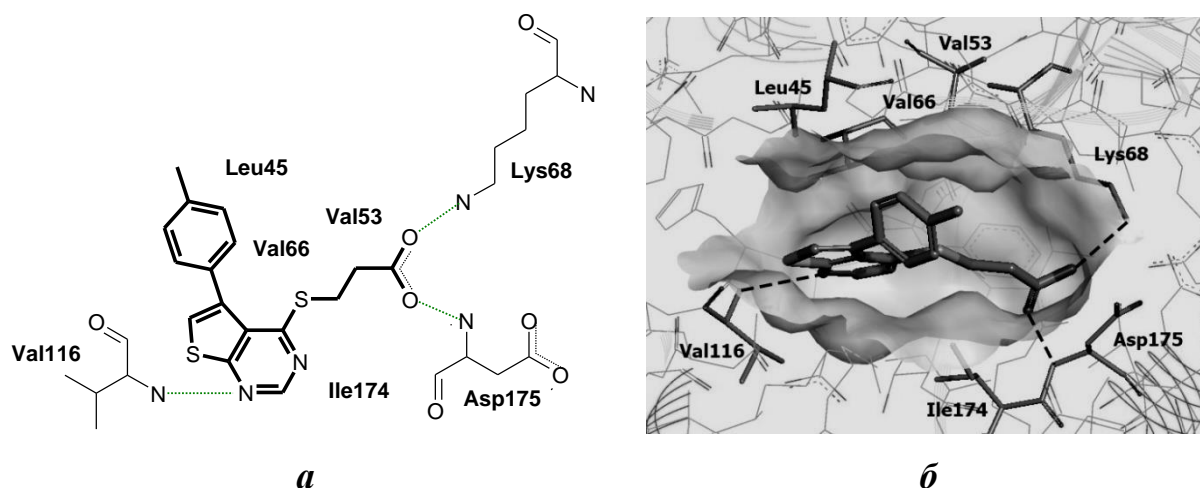
Таблиця 4

**Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ**

Інгібітор	СК2	ASK1	Jnk3	Auoga A	Rock1	FGFR1	c-Met	Tie2
ба	0,72	92	104	23	126	92	114	70
6d	0,86	100	94	48	115	99	115	46

Шляхом порівняння даних, одержаних у результаті аналізу залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» і молекулярного моделювання (рис. 12), було досліджено вплив окремих замісників 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу на здатність сполук пригнічувати активність СК2. Встановлено, що найбільший вплив на інгібувальну активність сполук мав замісник  $R^4$ . При цьому у найефективніших інгібіторів у цій позиції знаходився залишок пропіонової кислоти, який мав оптимальну довжину (відстань між карбоксильною групою і тієно[2,3-d]піримідиновим гетероциклом) для ефективного зв'язування інгібітору із СК2 шляхом формування водневих зв'язків одночасно в двох протилежних ділянках АТФ-акцепторної кишені ензиму (з Val116, Lys68 та/або Asp175). Замісники  $R^1$  та  $R^2$  мали менший вплив на активність сполук. Вони були орієнтовані на вихід із сайту зв'язування АТФ та разом із 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідиновим гетероциклом утворювали гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Val53, Val66, Val116, Met163 та Ile174. Варто додати, що при подальшій

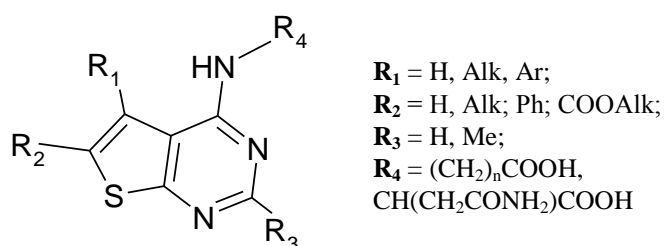
оптимізації досліджуваних сполук потрібно уникати введення об'ємного замісника  $R^3$ , оскільки він розташовується в напрямку шарнірної ділянки активного сайту СК2 і може перешкоджати утворенню водневого зв'язку між інгібітором та Val116. Це, у свою чергу, може призвести до втрати інгібувальної активності сполуками.



**Рис. 12.** Інгібітор 6а в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *а* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (пунктирною лінією відмічено водневі зв'язки); *б* – загальний вигляд комплексу «6а-СК2» (водневі зв'язки зображено пунктирною лінією)

Отже, за допомогою спрямованого синтезу було отримано чотири нові інгібітори протеїнкінази СК2 з  $IC_{50} < 1$  мкМ серед похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти.

Дослідження та оптимізація похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти як інгібіторів протеїнкінази СК2. Вісімнадцять похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти (рис. 13) було синтезовано як потенційно активні аналоги похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти (описані в тексті вище), в яких атом Сульфуру в 4-му положенні тієно[2,3-*d*]піримідинового гетероциклу було замінено на Нітроген.



**Рис. 13.** Загальна хімічна структура похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти

Біохімічні тести *in vitro* із використанням  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  показали, що лише 2 сполуки з 18 отриманих пригнічували активність СК2. При цьому сполука ННТР7 (рис. 14, *б*), яка була аналогом досліджуваного раніше інгібітору 6а ( $IC_{50}=0,1$  мкМ) (рис. 14, *а*), виявилася взагалі не активною.



Аналіз комплексів похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти з АТФ-акцепторною кишеною протеїнкінази СК2, побудованих за допомогою молекулярного докінгу, не дав змоги пояснити причину відсутності інгібувальної активності в досліджуваних сполук. Тому було зроблено припущення, що вона полягає в здатності цих сполук утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок (рис. 14, б).

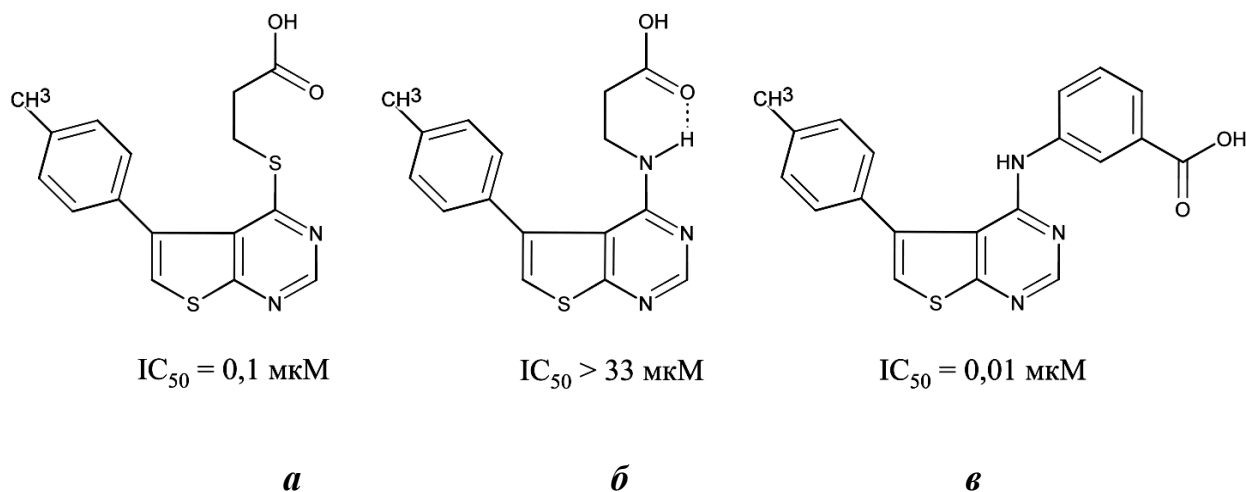


Рис. 14. Хімічна структура похідних (тієно[2,3-d]піримідин)карбонових кислот: **а** – сполука ба – похідне (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти, яка не здатна утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок, **б** – сполука ННТР7, яка, ймовірно, утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок, **в** – сполука ННТР23, що має замісник  $R^4$ , який не може утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок

Для перевірки запропонованої гіпотези було синтезовано 21 сполуку із замісниками  $R^4$  (рис. 15), структури яких не утворювали внутрішньомолекулярний водневий зв'язок (приклад, сполука ННТР23 зображена на рис. 14, в). Результати біохімічних тестів *in vitro* підтвердили зроблене припущення, оскільки більше половини оптимізованих похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти мали показник  $IC_{50}$  у діапазоні від 0,008 мкМ до 10 мкМ.

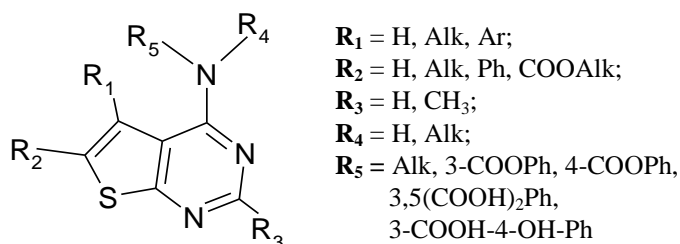


Рис. 15. Загальна хімічна структура розроблених похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти.

У кінетичних дослідженнях за участі найефективніших інгібіторів ННТР23, ННТР25 і ННТР33 було встановлено, що їх активність є результатом конкурентного зв'язування з молекулою АТФ з активним сайтом протеїнкінази СК2. Константи інгібування становили 4,5 нМ, 12,7 нМ та 4 нМ, відповідно. Також було



продемонстровано, що ці інгібітори є селективними по відношенню до СК2 на панелі із 7 серин-треонінових і тирозинових протеїнкіназ (табл. 5).

Таблиця 5

## Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ

Інгібітор	СК2	ASK1	Jnk3	Aurora A	Rock1	FGFR1	c-Met	Tie2
NHTP23	1,14	122	85,7	36,2	105,8	60,5	53,7	109
NHTP25	1,51	122	89,5	38,9	88,6	78,9	71,5	119,7
NHTP33	0,91	112	70,3	15,3	101,5	73,9	87,2	84,2

Аналіз побудованих комплексів інгібіторів із СК2 (рис. 16) показав, що похідні амінотієно[2,3-d]піримідину з  $R^4=C_6H_4COOH$  є більш перспективними для подальшої оптимізації, ніж з  $R^4=AlkCOOH$ , оскільки, за даними молекулярного докінгу, цей замісник реалізує контакт із Phe113 по типу стекінг-взаємодії. Також важливою є позиція карбоксильної групи у фенільному заміснику. Сполуки з  $R^4=C_6H_4COOH$ -*m* продемонстрували найбільшу інгібувальну активність, оскільки саме за цієї умови було можливе одночасне утворення водневих зв'язків між лігандом та амінокислотними залишками Val116 (шарнірна ділянка) і Lys68, Asp175 (фосфат-зв'язувальна область), що розташовані в протилежних частинах АТФ-акцепторної кишені ензиму.

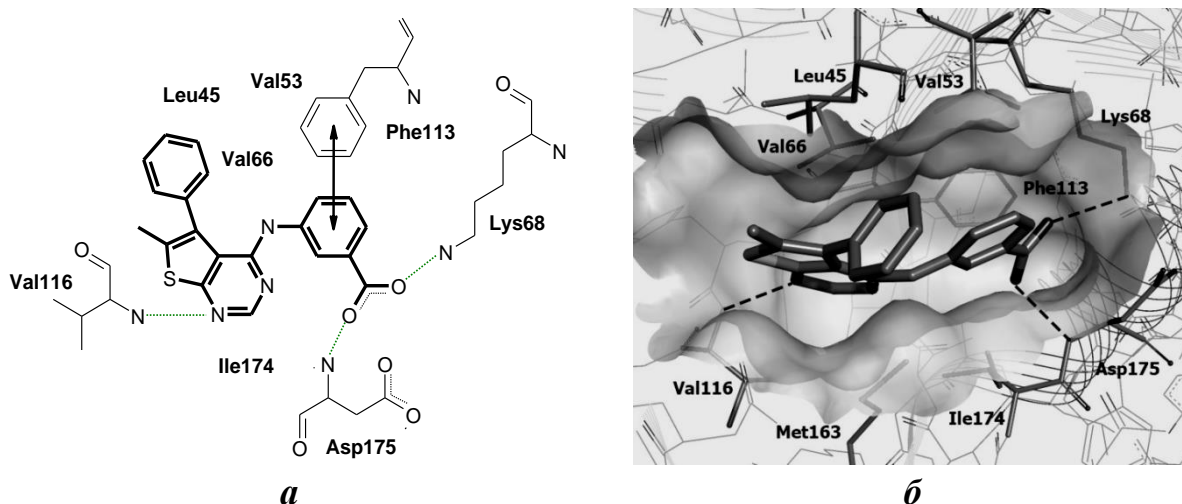


Рис. 16. Інгібітор NHTP33 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (пунктирною лінією відмічено водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «NHTP33-СК2» (водневі зв'язки зображено пунктирною лінією)

Отже, у процесі розробки інгібіторів протеїнкіназ необхідно приділяти увагу здатності сполук утворювати внутрішньомолекулярні водневі зв'язки. В одних випадках ці взаємодії можуть сприяти додатковій стабілізації структур сполук, а в

інших – бути причиною зміни загального розміру молекули інгібітору, що може призвести до значного зменшення чи зникнення його активності.

**Дослідження активності інгібіторів протеїнкінази СК2 з різних хімічних класів на її каталітичних субодиницях СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ .** Ізоформно-специфічні інгібітори протеїнкінази СК2 можуть ефективно використовуватися для встановлення функціональної відмінності каталітичних субодиниць у різних процесах у клітині та для з'ясування незалежної участі цих ізоформ у розвитку захворювань.

З метою виявлення ізоформно-специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 проводили біохімічне тестування 13-ти найбільш ефективних розроблених інгібіторів на отриманих рекомбінантних білках СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ . Було показано, що інгібітори з класів (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти краще пригнічували активність субодиниці СК2 $\alpha$ , тоді як похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу та 4'-карбоксіфлавонолу – активність СК2 $\alpha'$ . Для (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот і 4'-гідроксіфлавонів ситуація виявилася неоднозначною: одні сполуки краще інгібували СК2 $\alpha$ , інші – СК2 $\alpha'$ . У цілому показник IC<sub>50</sub> сполук на окремих каталітичних субодиницях СК2 відрізнявся в 1,6-6,7 разів. Найбільш ізоформно-специфічним інгібітором був FLC26 – 4-(6,8-дибромо-3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)бензойна кислота. Цей інгібітор пригнічував активність СК2 $\alpha'$  майже в 7 разів ефективніше, ніж СК2 $\alpha$  (IC<sub>50</sub> для СК2 $\alpha$  становить 0,02 мкМ, для СК2 $\alpha'$  – 0,003 мкМ).

## ВИСНОВКИ

У ході дисертаційного дослідження за допомогою методів молекулярного моделювання і біохімічних тестів *in vitro* розроблено нові інгібітори протеїнкінази СК2, що належать до п'яти хімічних класів. Для одержаних інгібіторів запропоновано моделі зв'язування лігандів з АТФ-акцепторним сайтом ензиму.

1. Уперше серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолів знайдено інгібітори протеїнкінази СК2. Величина IC<sub>50</sub> семи сполук, що досліджувалися, знаходилася в межах 0,2–24,5 мкМ. Встановлено, що ключовими взаємодіями, які відповідають за зв'язування лігандів із СК2, є гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Val53, Val66, Met163, Ile174 і Phe113 та водневий зв'язок із Lys68.

2. За результатами рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу і раціонального молекулярного дизайну розроблено 26 нових інгібіторів протеїнкінази СК2 (IC<sub>50</sub>=0,004-0,79 мкМ) на основі похідних флавонолу. Встановлено, що передумовою прояву високої інгібувальної активності сполук є наявність гідроксильної групи у 4' позиції флавонолу.

3. Ідентифіковано й оптимізовано нові інгібітори СК2 – 4'-карбоксіфлавоноли. Отримано 13 інгібіторів ензиму з активністю від 0,72 мкМ до 0,009 мкМ. Показано, що необхідною умовою для здатності сполук пригнічувати активність СК2 є наявність 3-гідроксильної та 4'-карбоксіильної груп, які утворюють

водневї зв'язки з амінокислотними залишками Glu114 та Lys68, Asp175 активного сайту цього ензиму, відповідно.

4. Уперше знайдено інгібітори СК2 серед похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-їлтію)карбонових кислот. Показано, що визначальний вплив на активність сполук має замісник у 4-му положенні тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу. Найбільш оптимальним є карбоксипропіл.

5. Розроблено 7 нових інгібіторів СК2 серед похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-їламіно)карбонової кислоти з показником  $IC_{50}$ , який становить 0,008–0,83 мкМ. Продемонстровано негативний вплив внутрішньомолекулярного водневого зв'язку на здатність похідних тієно[2,3-d]піримідину пригнічувати активність протеїнкінази СК2 і запропоновано шляхи уникнення формування цього зв'язку.

6. Найактивніші з розроблених інгібіторів холоензиму СК2 протестовано на рекомбінантних білках каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ . Найбільш ізоформно-специфічним інгібітором є похідне 4'-карбокифлавонолу FLC26, що пригнічує активність СК2 $\alpha'$  ( $IC_{50}$ =0,003 мкМ) у 6,7 раза ефективніше, ніж СК2 $\alpha$  ( $IC_{50}$ =0,02 мкМ).

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Synthesis and biological evaluation of substituted (thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acids as inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, V. G. Bdzhola, N.V. Briukhovetska, A. O. Balanda, O. P. Kukharenko, I. M. Kotey, O. V. Ostrynska, S. M. Yarmoluk // Eur. J. Med. Chem. – 2011. – Vol. 46, #3. – P. 870–876. (*Особистий внесок здобувача – біохімічні тести in vitro*).

2. Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, V. G. Bdzhola, I. V. Kyshenia, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, O. P. Kukharenko, I. M. Kotey, O. V. Ostrynska, S. M. Yarmoluk // Mol. Cell Biochem. – 2011. – Vol. 356, #1–2. – P. 107–115. (*Особистий внесок здобувача – біохімічні тести in vitro, побудова моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, аналіз комплексів «інгібітор – СК2»*).

3. Пошук нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу / О. В. Остринська, В. Г. Бджола, О. П. Кухаренко, С. М. Ярмолюк // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2012. – Т. 10, №2. – С. 25–29. (*Особистий внесок здобувача – рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг, біохімічні тести in vitro, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова та аналіз комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, написано основну частину статті*).

4. Discovery and characterization of synthetic 4'-hydroxyflavones – New CK2 inhibitors from flavone family / A. G. Golub, V. G. Bdzhola, O. V. Ostrynska, I. V. Kyshenia, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, O. P. Kukharenko, S. M. Yarmoluk // Bioorg. Med. Chem. – 2013. – Vol. 21, #21. – P. 6681–6689. (*Особистий внесок здобувача – біохімічні тести in vitro, побудова моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, аналіз комплексів «інгібітор – СК2», підготовка статті до публікації*).

5. Вплив інгібіторів протеїнкінази СК2 на її каталітичні субодиниці СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$  / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук // *Biotech. Acta.* – 2014. – Т. 7, № 6. – С. 29–39. (Особистий внесок здобувача – одержання рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ , біохімічні тести *in vitro*, побудова та аналіз моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2 методами молекулярного моделювання (молекулярний докінг і молекулярна динаміка), аналіз результатів, написано основну частину статті).

6. Пат. 86041 Україна, МПК С07D 215/00, А61Р 35/00 від 10.12.2013. Низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази СК2 на основі 4-аміно-гієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу / О. В. Остринська (UA), А. О. Баланда (UA), В. Г. Бджола (UA), І. М. Котей (UA), О. П. Кухаренко (UA), С. М. Ярмолук (UA) ; заявник Ін-т мол. біол. і ген. НАНУ (UA). – № u201307516 ; заявл. 13.06.13; опубл. 10.12.13, Бюл. № 23 // Pat. UA86041, С07D215/00, А61Р35/00, 2013-12-10. (Особистий внесок здобувача – біохімічні тести *in vitro*, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, написано основну частину патенту).

7. Розробка нових інгібіторів СК2 за допомогою методів комп'ютерного моделювання, комбінаторної хімії та тестів *in vitro* / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола, А. О. Баланда, І. М. Котей, Н. В. Брюховецька, С. М. Ярмолук // II Міжнар. наук.-практ. конф. «Комп'ютерне моделювання в хімії та технологіях і сталий розвиток», (Київ, 12–15 трав. 2010 р.) : матеріали конф. – К., 2010. – С. 59-60. (Особистий внесок здобувача – біохімічні тести *in vitro*, побудова комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2).

8. Search and design of novel protein kinase СК2 inhibitors : IV Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 165-річчю з дня народження І. І. Мечнікова, (Київ, 18–19 трав. 2010 р.) / О. V. Ostrynska, О. P. Kukharenko, V. G. Bdzholo, A. O. Balanda, I. M. Kotey, N. V. Briukhovetska, S. M. Yarmoluk // // *Biopolym. Cell.* – 2010. – Vol. 26, № 5. – P. 418. (Особистий внесок здобувача – біохімічні тести *in vitro*, побудова комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2).

9. Застосування методів віртуального скринінгу для розробки біологічно активних сполук / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, А. О. Баланда, І. М. Котей, Н. В. Брюховецька, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук // Перший Всеукраїнський з'їзд «Медична та біологічна інформатика і кібернетика» (Київ, 23–26 черв. 2010 р.) : зб. пр. – К., 2010. – С. 188. (Особистий внесок здобувача – біохімічні тести *in vitro*, побудова комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2).

10. Застосування комп'ютерних методів для пошуку нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук // Наук.-практ. конф. «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Десяті Данилевські читання), (Харків, 3–4 берез. 2011 р.) : матеріали конф. – Харків, 2011. – С. 87–88. (Особистий внесок здобувача – рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг, біохімічні тести *in vitro*, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» інгібіторів, побудова та аналіз комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2).

**11.** Похідні 3,4,5,6-тетрагідро-тіопірано[2,3-d]тіазолу – нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук // VII Міжнар. наук.-техн. конф. «Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ-2011», присвячена 60-річчю Севастопольського національного технічного університету, (Севастополь, 26–30 квіт. 2011 р.) : матеріали конф. – Севастополь, 2011. – С. 215–216. (*Особистий внесок здобувача – рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг, біохімічні тести in vitro, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова та аналіз комплексів інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2*).

**12.** 4'-гідроксифлаволи як інгібітори протеїнкінази СК2. Пошук, оптимізація та біологічне тестування / О. В. Остринська, В. Г. Бджола, А. Г. Голуб, В. М. Сапелкін, А. О. Приходько, О. П. Кухаренко, С. М. Ярмолук // XXVIII Наук. конф. з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України «Катализ и нефтехимия», (Київ, 28–29 берез. 2013 р.). – К., 2013. – №22. – С. 66. (*Особистий внесок здобувача – біохімічні тести in vitro, побудова моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, аналіз комплексів «інгібітор – СК2»*).

**13.** 4'-hydroxyflavone as inhibitors of protein kinase CK2. Search, optimization and biological testing / O. V. Ostrynska, V. G. Bdzhola, A. G. Golub, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, A. P. Kukharenko, S. M. Yarmoluk // VII Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 175-річчю з дня народження О. Я. Данилевського, (Київ, 28–29 трав. 2013 р.) : матеріали конф. – К., 2013. – С. 15. (*Особистий внесок здобувача – біохімічні тести in vitro, побудова моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, аналіз комплексів «інгібітор – СК2»*).

**14.** Recombinant CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  subunits differ in their sensitivity to same inhibitors / O. V. Ostrynska, V. G. Bdzhola, O. P. Kukharenko, S. M. Yarmoluk // VIII Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 90-річчю з дня народження П. Г. Костюка, (Київ, 14–15 трав. 2014 р.) : матеріали конф. – К., 2014. – С. 13. (*Особистий внесок здобувача – одержання рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$ , біохімічні тести in vitro, побудова та аналіз моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2 методами молекулярного моделювання (молекулярний докінг і молекулярна динаміка)*).

## АНОТАЦІЯ

**Остринська О. В. Розробка низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2015.

В дисертаційній роботі за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, біохімічних тестів *in vitro* і методів молекулярного моделювання розроблено й охарактеризовано 5 нових класів інгібіторів протеїнкінази СК2 –

3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазоли, 4'-гідроксифлавоноли, 4'-карбоксіфлавоноли, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонові кислоти та (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонові кислоти. Більше половини (56 сполук із 109) отриманих інгібіторів пригнічують активність СК2 в субмікромолярному діапазоні концентрацій. На основі даних, отриманих в результаті молекулярного моделювання, побудовано моделі взаємодії розроблених інгібіторів з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2 і встановлено взаємозв'язок між хімічною структурою сполук та їх інгібувальною активністю. Найефективніші інгібітори перевірено на специфічність щодо каталітичних субодиниць протеїнкінази СК2 *in vitro*.

**Ключові слова:** протеїнкіназа СК2, каталітичні субодиниці протеїнкінази СК2, інгібітор, докінг.

## АННОТАЦІЯ

**Остринская О. В. Разработка низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназы СК2.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

В диссертационной работе с помощью рецепторно-ориентированного виртуального скрининга, биохимических тестов *in vitro* и методов молекулярного моделирования разработаны и охарактеризованы 5 новых классов ингибиторов протеинкиназы СК2 – 3,4,5,6-тетрагидротіопірано[2,3-d]тіазоли, 4'-гідроксифлавоноли, 4'-карбоксіфлавоноли, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонові кислоти и (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонові кислоти. Больше половины (56 соединений из 109) полученных ингибиторов подавляют активность СК2 в субмикромолярном диапазоне концентраций. На основании данных, полученных в результате молекулярного моделирования, построены модели взаимодействия разработанных ингибиторов с АТФ-связывающим сайтом протеинкиназы СК2 и определена взаимосвязь между химической структурой соединений и их ингибиторной активностью. Самые эффективные ингибиторы проверены на специфичность по отношению к каталитическим субъединицам протеинкиназы СК2 *in vitro*.

**Ключевые слова:** протеинкиназа СК2, каталитические субъединицы протеинкиназы СК2, ингибитор, докинг.

## SUMMARY

**Ostrynska O. V. Development of low molecular weight inhibitors of protein kinase CK2.** – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

Protein kinase CK2 is a ubiquitous, highly pleiotropic and constitutively active Ser/Thr kinase that has more than 400 physiological targets and involved in many biological processes such as transcription, translation, cell cycle control, proliferation, cell survival and apoptosis. This enzyme takes part in the development of various diseases, including neurodegenerative and cardiovascular disease, inflammation, viral and parasitic infections and many cancer types etc.

Thus, inhibitors of protein kinase CK2 can be an effective tool for studying its role in signaling pathways and used to develop of therapeutic agents.

The aim of our research is to develop new low-molecular inhibitors of human protein kinase CK2 and to develop their binding models with enzyme ATP-acceptor site.

Initially, the receptor-based virtual screening has been performed and a number of classes of potential CK2 inhibitors have been identified. One of them was 3,4,5,6-tetrahydrothiopyrano[2,3-d]thiazole derivatives. Seven inhibitors from this class were tested *in vitro* and have  $IC_{50}$  values in the range of 0,2 to 24,5  $\mu$ M. The analysis of the binding modes of these compounds with CK2 ATP-acceptor site showed that the main influence on complex stability have hydrophobic contacts and hydrogen bond with Lys68.

Another identified inhibitors of CK2 were flavonoids – flavone and flavonole derivatives.

Biochemical tests *in vitro* revealed that 19 flavones out of 49 selected by virtual screening inhibit activity of CK2 ( $IC_{50} < 30 \mu$ M). The most active compound is FNH28 with  $IC_{50} = 0,1 \mu$ M. After studying the structure-activity relationship and inspecting flavones binding mode with ATP-acceptor site of CK2 the 4'-hydroxyflavone core was chosen as a template for further structural optimization. New synthesized derivatives show an incredibly high hit rate – 26 out of 28 compounds inhibit enzyme activity of CK2 in submicromolar range. The analysis of binding modes of newly synthesized flavones has shown that their strong binding with ATP-acceptor site is caused by interactions with its hydrophobic residues and formation of intermolecular hydrogen bonding network with key amino acids Val116, Lys68 and/or Asp175. It should be added that  $IC_{50}$  value of the 4'-hydroxyflavone FNH79 is nearly 100 times higher than  $IC_{50}$  of fisetin, the most active natural flavone known to inhibit CK2.

Other identified flavonoids were carboxyl-containing flavones. *In vitro* tests of 13 compounds from this class showed that five derivatives have inhibitory potency at the range from 0.6 to 8  $\mu$ M. The studying of their structure-activity relationship and docking complexes indicated that the most effect on the compounds activity has the presence of carboxyl group in position 4' of phenol ring and hydroxyl group in position 3 of the heterocycle. The chemical optimization step allows us to obtain 13 new 4'-carboxyflavonoles. All synthesized compounds have submicromolar activity ( $IC_{50} = 0.009–0.72 \mu$ M). The values of  $K_i$  for two more potent inhibitors FLC21 and FLC26 were 13 and 2.5 nM, correspondingly. The binding mode of these compounds with ATP-acceptor site showed an importance of hydrophobic substituents in structure of ligands for complexes stabilization.

The next studied series of compounds were thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. Initially, we determined inhibitory activity of 28 substituted (thieno[2,3-d]pyrimidin-4-

ylthio)carboxylic acids. Ten compounds from this class have negligible activity toward CK2, ten compounds have  $IC_{50}$  in the range 0.1-7  $\mu$ M. It was estimated that the activity of 4-mercaptothieno[2,3-d]pyrimidines is a result of their competition with ATP molecule for the binding site ( $K_i$  values of the most active compound 6a is 40 nM). Key contacts that contribute significantly to the ligand binding are Van der Waals interactions of thieno[2,3-d]pyrimidine heterocycle with a number of hydrophobic residues (Leu45, Val53, Val66, Val116 and Ile174). In addition, active compounds form intermolecular hydrogen bonds in two areas (hinge region and phosphate-binding region) of active site, that is possible then  $R^4 =$  propionic acid.

4-aminothieno[2,3-d]pyrimidines were synthesized as potentially active analogs of previously described compounds. But, biochemical in vitro tests revealed that only 2 out of 18 new compounds were active. The analysis of the complexes of these derivatives with ATP-binding site obtained with docking didn't explain why inhibitors activity disappeared. It has been suggested that compounds form intramolecular hydrogen bond. This hypothesis was confirmed during chemical optimization step which allowed us to design new more active compounds with chemical structure that prevents formation of this intramolecular hydrogen bond. The most active obtained inhibitors (NHTP23, NHTP25 and NHTP33) are ATP-competitive with  $K_i$  values 4.5 nM, 12.7 nM and 4 nM, respectively.

Finally we studied effect of the most active from developed protein kinase CK2 inhibitors (with  $IC_{50}$  from 0.004  $\mu$ M to 0.7  $\mu$ M) on the activity of CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  recombinant proteins. Biochemical tests showed that isozymes have different sensitivity toward same compounds. The most isoform-selective inhibitor is 4'-hydroxyflavone derivative (FLC26) with  $IC_{50}$  value of 0.02  $\mu$ M (CK2 $\alpha$ ) and 0.003  $\mu$ M (CK2 $\alpha'$ ).

**Keywords:** protein kinase CK2, catalytic subunit of protein kinase CK2, inhibitor, docking.



---

Підписано до друку 21.10.2015 р. Формат 60x90/16.  
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9.  
Тираж 100. Зам. 92.

---

«Видавництво “Науковий світ”»<sup>®</sup>  
Свідоцтво ДК № 249 від 16.11.2000 р.  
м. Київ, вул. Казимира Малевича (Боженка), 23, оф. 414.  
200-87-15, 050-525-88-77  
E-mail: [nsvit23@ukr.net](mailto:nsvit23@ukr.net)  
Сайт: [nsvit.cc.ua](http://nsvit.cc.ua)