

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ**

На правах рукопису

ОСТРИНСЬКА ОЛЬГА ВАСИЛІВНА

УДК 577.322

**РОЗРОБКА НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ
ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук

Науковий керівник

Ярмолюк Сергій Миколайович

доктор хімічних наук, професор

Київ – 2015

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Будова протеїнкінази СК2	11
1.1.1. Особливості первинної структури каталітичних субодиниць протеїнкінази СК2 – СК2 α та СК2 α'	12
1.1.2. Особливості третинної структури каталітичних субодиниць протеїнкінази СК2 – СК2 α та СК2 α'	14
1.1.3. Будова АТФ-акцепторного сайту СК2, як області зв'язування інгібіторів ..	14
1.2. Роль протеїнкінази СК2 та її каталітичних субодиниць в регуляції процесів життєдіяльності і загибелі клітин	17
1.2.1. Роль СК2 α і СК2 α' в регуляції клітинного циклу та поділі клітини	17
1.2.2. Роль СК2 α і СК2 α' у виживанні клітин та апоптозі.....	18
1.3. Участь протеїнкінази СК2 і її каталітичних субодиниць у виникненні та розвитку захворювань	19
1.4. Етапи пошуку та розробки інгібіторів протеїнкіназ.....	29
1.5. АТФ-конкурентні інгібітори холодензиму протеїнкінази СК2 та її каталітичних субодиниць	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1. Молекулярне моделювання.....	35
2.1.1. Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг.....	35
2.1.1.1. Підготовка рецептора	35
2.1.1.2. Підготовка лігандів	36
2.1.1.3. Гнучкий докінг	36
2.1.4. Молекулярна динаміка комплексу «ліганд - рецептор»	37
2.2. Біохімічні тести <i>in vitro</i>	39
2.2.1. Біохімічний скринінг <i>in vitro</i> із використанням [γ - ³² P]АТФ.....	39

2.2.2. Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази СК2 за допомогою люциферазної реакції	40
2.2.3. Визначення селективності інгібіторів протеїнкінази СК2.....	42
2.2.4. Визначення ензиматичної активності рекомбінантних білків	44
2.3. Одержання рекомбінантних білків СК2 α та СК2 α' каталітичних субодиниць	45
2.3.1. Одержання рекомбінантного білка СК2 α	45
2.3.2. Одержання рекомбінантного білка СК2 α'	47
РОЗДІЛ 3. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПОХІДНИХ	
3,4,5,6-ТЕТРАГІДРОТІОПІРАНО[2,3-D]ТІАЗОЛУ ЯК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2.....	49
РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ ФЛАВОНУ	
4.1. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 4'-гідроксифлавонолу	57
4.1.1. Ідентифікація та визначення інгібувальної активності похідних флавонолу...	57
4.1.2. Оптимізація похідних флавонолу.....	61
4.1.3. Дослідження селективності похідних 4'-гідроксифлавонолу	67
4.1.4. Аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 4'-гідроксифлавонолу та встановлення типу їх зв'язування з СК2.....	68
4.2. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 4'-карбоксифлавонолу	72
4.2.1. Ідентифікація та визначення інгібувальної активності карбоксилвмісних похідних флавонолу	72
4.2.2. Оптимізація та дослідження похідних 4'-карбоксифлавонолу.....	74
4.2.3. Аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 4'-карбоксифлавонолу та встановлення типу їх зв'язування з СК2	78
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ (ТІЄНО[2,3-d]ПІРИМІДИН)КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	
5.1. Дослідження інгібіторів протеїнкінази СК2 з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонові кислоти.....	82

5.1.1. Визначення інгібувальної активності похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти	82
5.1.2. Аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти.....	85
5.1.3. Встановлення типу зв'язування похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти з СК2	87
5.2. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних (тієно[2,3- d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти	89
5.2.1. Дослідження похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти.....	89
5.2.2. Хімічна оптимізація похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти	94
5.2.3. Аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та встановлення типу їх зв'язування з СК2	97
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 З РІЗНИХ ХІМІЧНИХ КЛАСІВ НА ЇЇ КАТАЛІТИЧНИХ СУБОДИНИЦЯХ СК2α І СК2α'	102
6.1. Визначення впливу інгібіторів протеїнкінази СК2 на активність її каталітичних субодиниць	102
6.2. Встановлення типу зв'язування інгібітору FLC26 з СК2 α та СК2 α'	107
6.3. Аналіз комплексів інгібітору FLC26 з АТФ-акцепторними сайтами СК2 α та СК2 α' методом молекулярної динаміки.....	109
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ	114
ВИСНОВКИ.....	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- ASK1 – апоптоз сигнал-регулююча кіназа 1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1)
- Aurora A – серин-треонінова протеїн кіназа 6
- CK2 – протеїнкіназа CK2 (Caseine kinase II)
- c-Met – кіназа рецептора фактора росту гепатоцитів
- CPS – рахунок за секунду (count per second)
- FGFR1 – кіназа рецептора фактора росту фібробластів 1 (Fibroblast growth factor receptor 1, fms-related tyrosine kinase-2)
- GSK3 – кіназа глікоген-синтетази 3 (Glycogen synthase kinase 3)
- JNK3 – c-Jun N-термінальна кіназа (c-Jun N-terminal kinase 3)
- IC₅₀ – концентрація інгібітору, при якій активність ензиму зменшується до 50%
- K_i – константа інгібування
- PI3K – фосфоінозитид 3 кіназа (Phosphoinositide 3-kinase)
- ROCK1 – rho-асоційована протеїнкіназа 1, що містить суперспіралі (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1)
- TIE2 – кіназа рецептора для ангіопоетину 1
- АТФ – аденозинтрифосфат
- БСА – бичачий сироватковий альбумін
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- мкМ – мікромоль
- МОПС – морфолін-4-пропансульфонова кислота
- нМ – наномоль
- нс – наносекунда
- Тріс – гідроксиметиламінометан

ВСТУП

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 [1]. 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 [2], онкологічних захворювань [3] та ін.

Постійно триває активний пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед різних класів хімічних сполук [4-7], у тому числі серед похідних бензімідазолу й бензотриазолу [8, 9], антрахінону [10], флуоренону [11], кумарину [12], флавоноїду [13], дибензофурандіолу [14] 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 [15, 16]. 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 α і СК2 α' .

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 α », комплекси «інгібітор – протеїнкіназа СК2 α' ».

Методи дослідження: гнучкий молекулярний докінг, молекулярна динаміка, визначення інгібувальної активності сполук *in vitro* із використанням [γ - 32 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'-карбоксифлавонолів, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)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 α і СК2 α' 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 α і СК2 α' , 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова протеїнкінази СК2

Структурна біологія протеїнкінази СК2 почалася в 1990-х роках [17]. На той час важливі властивості ензиму вже були добре охарактеризовані і чекали на своє пояснення виходячи з будови білка. Перша кристалічна структура холоензиму з'явилися в базі даних Protein Data Bank (PDB) на початку 2002-го року [18]. Сьогодні цей веб-ресурс містить більше ніж 100 структур, отриманих як на повнорозмірному холоензимі СК2, так і його окремих субодиницях.

Встановлено, що в більшості випадків СК2 є гетеротетрамером, який складається з двох каталітичних (СК2 α – 42-44 кДа, СК2 α' – 38 кДа) та двох регуляторних (СК2 β – 26 кДа) субодиниць (рис. 1.1). Нещодавно, в людини було ідентифіковано і охарактеризовано третю каталітичну субодиницю СК2 – СК2 α'' [19, 20]. Вперше, унікальний сиквенс цієї ізоформи був повідомлений в 1999 р. [21] в межах геному клону СК2 RP5-863C7 (gi: 5788437), як інтронна область, що повторюється або Alu-последовність. Припускають, що СК2 α'' субодиниця є або СК2 α -похідним ретропозоном [22], або результатом альтернативного сплайсингу, що селективно включає Alu-подібний екзон в зрілу мРНК [23]. СК2 α , СК2 α' та СК2 α'' субодиниці мають каталітичні домени і є активними самі по собі, тоді як СК2 β субодиниця – регуляторна і здійснює вплив на стабільність та субстратну специфічність субодиниць α -типу [24].

Холоензим СК2 може набувати вигляду: $\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha'\beta\beta$, $\alpha'\alpha'\beta\beta$, $\alpha\alpha''\beta\beta$, $\alpha'\alpha''\beta\beta$, $\alpha''\alpha''\beta\beta$. Також варто зауважити, що в експериментах, описаних в [25, 26] було знайдено полімерні комплекси вищого порядку, а в багатьох організмах

ідентифіковано субодиниці, які існували поодинокі [27-31] або були зв'язаними з іншими білками клітини [32-35].

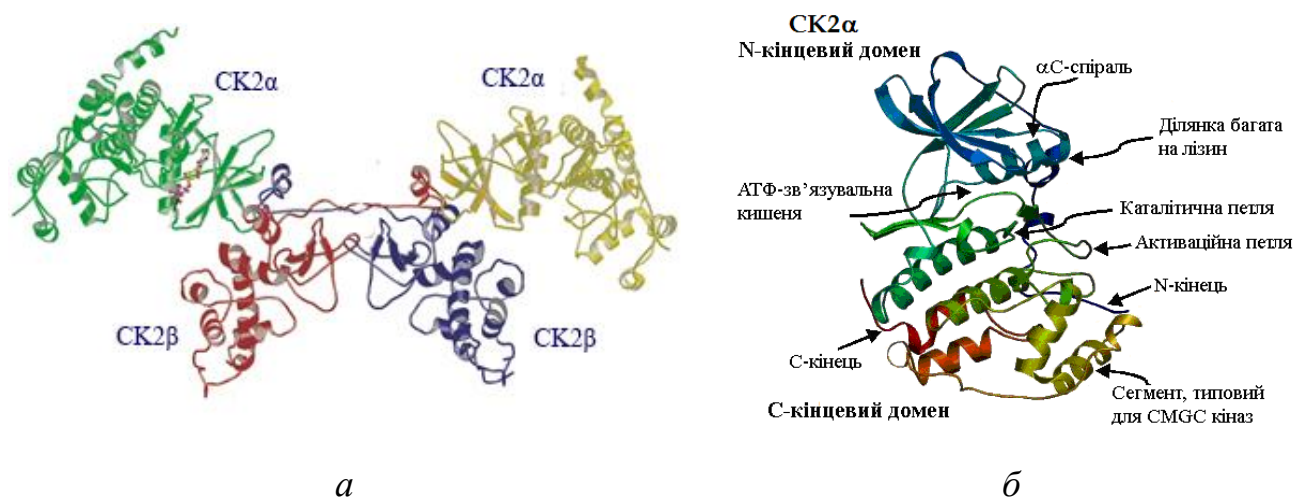


Рис. 1.1. Будова протеїнкінази CK2 [18]: *a* – загальна будова холоензиму; *б* – будова CK2α

Аналіз структури повнорозмірного білка CK2 [18] показав, що її каталітичні субодиниці безпосередньо не контактують між собою. Регуляторні субодиниці, навпаки, взаємодіють одна з одною та з субодиницями α -типу завдяки гідрофобним контактам, які утворюють їх С-кінці (рис. 1.1, *a*) [36].

1.1.1. Особливості первинної структури каталітичних субодиниць протеїнкінази CK2 – CK2α та CK2α'. CK2α і CK2α' субодиниці кодуються генами, які локалізовані в різних хромосомах. У людини CK2α кодує ген CSNK2A1, який розташований в 20-й хромосомі та містить тандемно розташовані Alu-повтори [37], CK2α' – ген CSNK2A2, що локалізований в хромосомі 16 [38].

Обидві каталітичні субодиниці CK2 відносять до CMGC групи підсімейства кіназ, до якого входять циклін-залежні кінази (CDKs), мітоген-активовані PKs, глікоген синтаза кінази (GSK) та CDK-подібні кінази [39]. Проте CK2α та CK2α' мають деякі характеристики, які відрізняють їх від інших членів цієї групи: α -субодиниці містять велику кількість оснóвних амінокислотних залишків (близько 10) довкола сайту розпізнавання субстрату, які доступні для взаємодії з кислими

субстратами; їх активаційні петлі не вимагають фосфорилування для збільшення активності ензиму; вони мають унікальну гліцин-збагачену петлю (Р-петля), яка містить лише два залишки гліцину; обидві ізоформи мають особливе видовження, утворене чотирма гістидинами, які розташовані на відстані п'яти амінокислотних залишків один від одного (у СК2 людини вони знаходяться в положенні 148, 152, 154, 160 і 166) [40].

Аналіз амінокислотної послідовності каталітичних субодиниць СК2 вказує на те, що вони мають високий ступінь гомології [36]. Загальна спорідненість перших 1-329 (1-330 в α') амінокислотних залишків СК2 α і СК2 α' , до яких входить N-кінець та каталітичні домени субодиниць, становить близько 86%. С-кінцева область (STD домен), навпаки, відмінна по довжині (СК α' на 41 залишок коротше, ніж СК α), – подібність послідовності становить 38% [40]. Результати, отримані в ході дослідження амінокислотного складу СК2 α'' , вказують на те, що ця субодиниця більше подібна до СК2 α . Встановлено, що перші 353 амінокислоти білків СК2 α і СК2 α'' ідентичні, за виключенням позиції 127 (Thr в СК2 α і Ala в СК2 α''). Проте, їх С-кінці повністю не співпадають за амінокислотним складом [20].

Незважаючи на низьку подібність амінокислотної послідовності С-кінців СК2 α і СК2 α' , вони є консервативними. Цей факт свідчить про те, що в їх доменах закодовані важливі функціональні властивості СК2. Наприклад, в експериментах Н. Yu та G. V. Cohen з колегами [41, 42] було продемонстровано, що «Р-Х-Х-Р» ділянка (амінокислотні залишки 363-366) С-кінця СК2 α є важливою для взаємодії з SH3 доменами деяких білків. Також відомо, що амінокислотна послідовність С-кінцевих ділянок майже не впливає на активність та субклітинну локалізацію СК2 α і СК2 α' [43, 44]. Для СК2 α'' спостерігається протилежна ситуація – 35 амінокислот її STD домену залучені в регуляцію субклітинної локалізації субодиниці [20]. Цей факт може бути ключовим для розуміння функцій цієї ізоформи.

Загальна міжвидова гомологія каталітичних субодиниць СК2 є високою. Наприклад, амінокислотні послідовності СК2 α та СК2 α' людини і курча ідентичні на 98% і 97%, відповідно [29]. Проте, слід відмітити, що J. Raaf з колегами [45]

виявили значні структурні відмінності між СК2 α субодинамиціями *Z. mays* і людини. Отримані результати свідчать про те, що пошук інгібіторів для СК2 людини має здійснюватись лише з використанням субодинамиць цього виду.

1.1.2. Особливості третинної структури каталітичних субодинамиць протеїнкінази СК2 – СК2 α та СК2 α' . СК2 α і СК2 α' мають типову для еукаріотичних протеїнкіназ дводольну структуру, яка утворюється завдяки N-кінцевому домену, багатому на β -стренди, та α -спіральному C-кінцевому домену (рис. 1.1, б). Між доменами розташовано активний сайт кінази, який може зв'язувати як молекули АТФ, так і ГТФ [18]. N-кінцеве видовження притаманне субодинамицям α -типу, має щільний контакт із обома доменами завдяки кластеру з ароматичних кислот та низці водневих зв'язків. Всі амінокислоти, які входять до цього видовження є високо консервативними серед різних видів [17, 46]. C-кінець СК2 α людини, на відміну від СК2 α' , містить чотири сайти фосфорилування для кінази CDK1 (циклін-залежна кіназа 1) [47] і сайт для глікозилування [48].

При дослідженні комплексів СК2 α та СК2 α' з інгібітором СС04820 [49] було показано, що ізоформи мають подібну укладку, особливо, в активному центрі. Незважаючи на це, в людини АТФ-зв'язувальні сайти каталітичних субодинамиць протеїнкінази СК2 відрізняються двома амінокислотними залишками (СК2 α : His115–Val116; СК2 α' : Tyr116–Ile117). Також в СК2 α' простір між інгібітором і шарнірною ділянкою, утворений Tyr116–Asn119, є значно меншим, ніж в СК2 α . Це зумовлено наявністю в СК2 α' амінокислотного залишку Ile117, бічний ланцюг якого є більшим, ніж у Val116 в СК2 α .

Також варто відмітити той факт, що СК2 α' має унікальну конформацію β 4- β 5 петлі, яка відповідає за СК2 α /СК2 β інтерфейс в гетеротетрамері СК2 $\alpha_2\beta_2$ [49].

Таким чином, каталітичні субодинамиці СК2 мають унікальні структурні детермінанти (АТФ-зв'язувальні сайти, СК2 α /СК2 β інтерфейс), які можуть бути використані для дизайну ізоформно-специфічних інгібіторів.

1.1.3. Будова АТФ-акцепторного сайту СК2, як області зв'язування інгібіторів. Усі протеїнкінази мають каталітичний домен (кіназний домен), який містить близько 300 амінокислотних залишків і складається з двох субдоменів,

утворених N-кінцевою (п'ять антипаралельно закручених β -стрендів і одна велика α -спіралі (α C-спіраль)) та C-кінцевою частиною, яка складається переважно з α -спіралей (рис. 1.1, б). Обидві частини з'єднані між собою гнучким ланцюгом з 6-9 амінокислотних залишків (хіндж-регіон, шарнірна ділянка). Він закінчується в N-кінцевому домені залишком гейткіперу (gatekeeper), який відіграє важливу роль в селективності зв'язування інгібіторів. Молекула АТФ зв'язується в щілині, яка утворюється між описаними вище субдоменами [50].

Деякі ділянки АТФ-зв'язувального сайту визначають активність протеїнкіназ. Це відбувається завдяки конформаційним змінам, які призводять до «відкритого» (DFG-in) або «закритого» (DFG-out) стану каталітичного сайту ензиму. До цих ділянок відносять гліцин-збагачену петлю (Р-петля), α C-спіраль, а також активаційну петлю (А-петля). Високо консервативний серед усіх протеїнкіназ DFG-мотив, має інший амінокислотний склад у СК2 [51], тому активний сайт протеїнкінази не здатний набувати закритої конформації і знаходиться завжди в DWG-in стані. Крім того, вважається, що завдяки нездатності СК2 α приймати DWG-out конформацію, можна уникнути проблем із резистентністю до ліків [52].

Згідно до фармакофорної моделі [53], АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкіназ можна розділити на три гідрофобні (аденін-зв'язувальна область, гідрофобний регіон I і II) і дві гідрофільні ділянки (кишеня, в якій розташовується залишок цукру і фосфат-зв'язувальна ділянка). Іншими важливими елементами є шарнірна ділянка та гейткіпер, бічний ланцюг якого контролює розмір гідрофобної ділянки I, а отже і селективність зв'язування з інгібіторами.

Гідрофобний регіон I та II АТФ-акцепторного сайту СК2 α (рис. 1.2) сформований залишками Leu85, Ile95, Leu111, Phe113, Ile174 та Leu45, His115, відповідно. Аденін-зв'язувальну ділянку утворюють амінокислоти Val53, Val66, Val116 і Met163. До шарнірної ділянки активного сайту протеїнкінази СК2 входять амінокислотні залишки Val116 та Glu114. У ролі гейткіпера тут знаходиться Phe113.

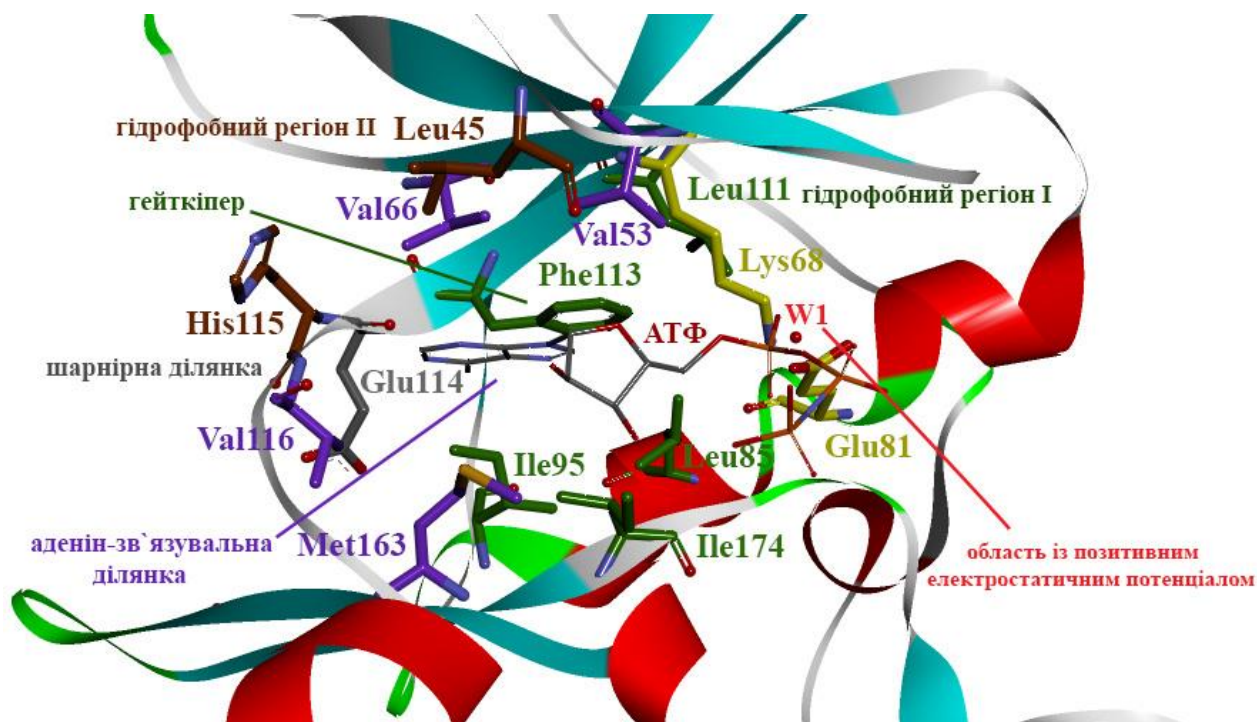


Рис. 1.2. Будова АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2. Модель комплексу каталітичної субодиниці СК2 α (PDB ID: 1JWH_A) з аналогом АТФ – аденілілімідодифосфатом (AMPPNP) [18]. Амінокислотні залишки, які належать до гідрофобного регіону I відмічено зеленим кольором, до гідрофобного регіону II – коричневим кольором, аденін-зв'язувальної ділянки – фіолетовим кольором

Аналіз активних сайтів інших протеїнкіназ показав, що вони є більші за розміром, ніж в СК2, оскільки цей ензим містить амінокислоти з громіздкими бічними ланцюгами. Найважливішими серед них у СК2 людини є Val66 та Ile174, які в більшості інших кіназ замінені на Ala та Ala, Tre або Leu, відповідно [51].

Також варто зауважити, що АТФ-акцепторна кишеня СК2 має область із позитивним електростатичним потенціалом (1,5–2,0 ккал/моль) між Lys68 і Glu81 (сольовий місток), де знаходиться консервативна молекула води W1, яка присутня в усіх структурах СК2, отриманих за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Апоензим СК2 містить в цій області дві додаткові молекули води W2 та W3, на відстані ≤ 3.5 Å від Lys68 [54]. В комплексах протеїнкінази із інгібітором ці молекули можуть бути витіснені останнім.

1.2. Роль протеїнкінази СК2 та її каталітичних субодиниць в регуляції процесів життєдіяльності і загибелі клітин

Відомо, що протеїнкіназа СК2 є необхідною для життєдіяльності клітини, оскільки залучена в реплікацію і транскрипцію ДНК, процесинг і трансляцію РНК [55], метаболізм клітини [56] та є важливим фактором регуляції апоптозу [57]. Роль окремих субодиниць СК2 в цих процесах залишається до кінця не з'ясованою.

1.2.1. Роль СК2 α і СК2 α' в регуляції клітинного циклу та поділі клітини. Протеїнкіназа СК2 залучена в кожен етап клітинного циклу [1] і фосфорилує низку білків, які є критичними для утворення повноцінних дочірніх клітин. Наприклад, вона взаємодіє з Pin1 (пептиди-проліл-цис/транс-ізомераза 1, що взаємодіє з кіназою NIMA (never in mitosis A)), який є основним регулятором процесу поділу клітини і контрольною точкою реплікації [58].

Однією з функцій СК2 α субодиниці в мітотичних і постмітотичних клітинах є участь в регуляції організації цитоскелету, від впорядкування якого залежать морфологічні зміни клітини. Припускають, що СК2 α залучена в реорганізацію клітинного каркасу шляхом фосфорилування тубуліну і міозину [59].

Міграція СК2 α' субодиниці з цитоплазми до ядра під час G фази і з ядра до цитоплазми під час S фази є одним з важливих процесів, що регулюють контроль клітинного циклу. Під час G1 фази, доки СК2 α' знаходиться в ядрі (в цей час СК2 α перебуває в цитоплазмі), загальна протеїнкіназна активність СК2 є високою. На S фазі клітинного циклу СК2 α' переміщується до цитоплазми, цей процес супроводжується зменшенням активності ензиму [59].

Асоціація субодиниці СК2 α' з ядерним матриксом [20], а також її здатність взаємодіяти з фактором транскрипції AP-1 вказує на участь цієї ізоформи в регуляції транскрипції. Було показано, що регуляція JNK/c-Jun/AP-1 сигнального

шляху за допомогою СК2 α' впливає на TNF- α індуковану смерть WT NuH-7 клітин.

Також відомо, що СК2 α антисенсові олігонуклеотиди [60], мікроін'єкції антитіл до СК2 та інгібітори СК2 [61, 62] здатні пригнічувати прогресію клітинного циклу в ссавців.

1.2.2. Роль СК2 α і СК2 α' у виживанні клітин та апоптозі. В експериментах із *Saccharomyces cerevisiae* (дріжджі) і *Dictyostelium discoideum* (липка пліснява), в клітинах яких СК2 знаходилась в неактивній формі, було продемонстровано, що ця протеїнкіназа є необхідною для їх життєздатності [30, 63]. В інших дослідах було показано, що для відновлення життєздатності дріжджів ензим має бути не лише присутнім, а й знаходитись в каталітично активному стані [64]. Детально зв'язок СК2 із процесами апоптозу детально досліджено К. Ahmed з колегами [65].

Пошкодження генів, які кодують каталітичні субодиниці СК2 в *Saccharomyces cerevisiae*, призводить до порушення процесів розвитку клітин [66] або до їх загибелі. В клітинах ссавців, примусова експресія кіназно-неактивних форм СК2 α та СК2 α' призводила до загрози проліферації клітин [1]. Проліферація та життєздатність клітин остеосаркоми людини U2OS з тетрациклін-регульованою експресією СК2 були порушені через індуковану експресію каталітично неактивної СК2 α' . Індукована експресія каталітично неактивної СК2 α в цих клітинах не мала впливу на виживання та життєздатність клітин ракової лінії [67].

Відомо, що СК2 α та СК2 α' антисенсові РНК в клітинах HeLa призводять до інтенсифікації процесів, що викликають загибель (апоптоз) клітин. Тоді як, результати експериментів [68] з використанням міРНК, з нокдауном СК2 α і СК2 α' , вказують на те, що СК2 захищає клітини від апоптозу викликаного 6-тіогуаніном, TRAIL (цитокін родини факторів некрозу пухлин) та іонізуючою радіацією.

Отже, каталітично активні СК2 α та СК2 α' субодиниці відіграють важливу роль у виживанні клітин. Окрім того, СК2 α' , ймовірно, має унікальні функції, які пов'язані з контролем проліферації та життєздатності клітин.

1.3. Участь протеїнкінази СК2 і її каталітичних субодиниць у виникненні та розвитку захворювань

Запальні процеси. Протеїнкіназа СК2 фосфорилує низку факторів транскрипції, які є ключовими регуляторами виникнення запальних реакцій і пов'язаних із ними захворювань. До них відносяться: NF-κB (ядерний фактор-карра В), STAT1 (перетворювач сигналу і активатор транскрипції 1), CREB (циклічний аденозинмонофосфат (сАМР) зв'язуючий білок із елементами відповіді), CREM (сАМР модулюючий білок із елементами відповіді), PU.1 (білок, що зв'язується з багатими на пурин ділянками ДНК), фактор транскрипції Sp1, C/EBP (ССААТ-підсилювач зв'язування білків), рецептори стероїдних гормонів, а також протоонкогени *c-Jun*, *c-Fos*, *c-Myc* та *Max* [69] тощо. Ці білки активуються протеїнкіназою СК2 безпосередньо (через фосфорилування) або опосередковано (через мережу сигнальних шляхів) [70-77].

Одними з найкраще вивчених СК2-опосередкованих запальних захворювань є гломерулонефрит [78] та атеросклероз [79]. Також відмічено надекспресію СК2 в матеріалі біопсії нирок в пацієнтів хворих на вовчаковий нефрит чи імуноглобулін-А-нефропатію. Пригнічення СК2 фармакологічними інгібіторами та СК2α антисенсовими олігонуклеотидами, викликало зменшення проліферації, запалення і фіброзу *in vivo*, що призводило до покращення функціонування нирок та позитивної прогресії гістологічної картини [36].

На мишачій моделі було показано, що СК2 залучена в модуляцію запального болю, оскільки взаємодіє з кількома молекулами, які регулюють передачу больового сигналу. Вона позитивно регулює функціонування серотонін 5-НТ3 рецепторного каналу [80], фосфорилує і активує гем-оксигеназу другого типу (НО-2) [81] та збільшує активність синтази оксиду нітрогену [82]. Регулярна обробка тканин спинного мозку селективними інгібіторами СК2 перед індукцією гострих або хронічних запальних болів різко зменшує больову поведінку в мишей, викликану індукторами запалення [83].

Також є докази участі протеїнкінази СК2 у розвитку аутоімунного енцефаломієліту [84] та інших аутоімунних захворювань [85]. Антитіла до СК2, особливо до СК2 α , були знайдені в сироватці пацієнтів, страждаючих на захворювання змішаної сполучної тканини, яке відносять до аутоімунних захворювань [86]. Крім того, СК2 фосфорилує і активує секреторний тип ПА фосфоліпази А2, виділену з синовіальної рідини пацієнтів з ревматоїдним артритом [87], і модулює секрецію ядерного ДНК-зв'язувального білка, прозапальна молекула якого активно секретується макрофагами і знайдена в синовіальній рідині пацієнтів з ювенільним артритом [88].

Нейродегенеративні захворювання. Протеїнкіназа СК2 має вплив на функції нейронів шляхом контролю їх диференціації на різних етапах, включаючи нейрогенез та формування синапсів, та нейронні ланцюги, які передають різні позаклітинні сигнали в кору головного мозку [89]. За допомогою аналізу експресії та/або рівня активності СК2 в тканинах мозку, одержаних від дорослих щурів, було встановлено, що СК2 плейотропно розподіляється в кортексі, путамені, мозочку, проміжному мозку та стовбурі головного мозку [90]. Зважаючи на все вищезазначене, стає очевидним, що низка білків і ензимів, які залучені в різноманітні функції в нервовій системі, є субстратами для СК2 [91].

Окрім того, що СК2 впливає на певні функції нейронів в нормальних тканинах, вона причетна до розвитку захворювань центральної нервової системи. Було відмічено знижену експресію СК2 в корі головного мозку при хворобі Альцгеймера не зважаючи на те, що специфічна активність ензиму була підвищеною [92]. В експериментах Е. Masliah з колегами [93] було показано, що N-кінці рекомбінантних ізоформ тау-білка містять вставки з кислих амінокислот, які є бажаними субстратами для СК2. Їх аномальне фосфорилування призводить до утворення нейрофібрилярних клубків і зупиняє стабілізацію мікротрубочок, що призводить до прогресування хвороби Альцгеймера. Альфа-синуклеїн та синфілін-1, які представлені в тільцях Леві і пов'язані з виникненням хвороби Паркінсона, також фосфорилуються СК2. Основну роль при цьому відіграють

регуляторні субодиниці цієї протеїнкінази [94]. Зменшення рівня експресії СК2 відмічали в пацієнтів із шизофренією [95].

Внесок СК2 в етіологію нейродегенеративних захворювань було підтверджено за допомогою імуногістохімічного аналізу, який показав, що СК2 експресується в мозку пацієнтів із деменцією Гуам-Паркінсона, синдромом видалення 18 хромосоми, прогресуючого супрануклеарного паралічу та захворювань Куфа і Піка [96]. Нещодавно було повідомлено, що СК2 діє як інгібітор нейронної Cdk5 (циклін-залежна кіназа 5) кінази, порушення регуляції якої призводить до низки нейрологічних захворювань, шляхом блокування формування комплексу між Cdk5 та її нейронним активатором p35 [97]. Також роль СК2 в різних нейрологічних функціях та патологічних станах, що впливають на діяльність центральної нервової системи, була відмічена в експериментах із церебральним ішемічним інфарктом в щурів [98].

Захворювання судин. Незважаючи на те, що багато ангиогенних факторів росту пов'язані з СК2, лише нещодавно було доведено важливу роль цього ензиму в процесах ангиогенезу та ангиогенез-споріднених захворюваннях. А. V. Ljubimov з колегами [99], використовуючи інгібітори протеїнкіназ широкого спектра дії показали, що лише сполуки, які здатні пригнічувати активність СК2, є ефективними для негативної модуляції ангиогенезу, викликаного факторами росту в культивованих ретинальних ендотеліальних клітинах. Крім того в досліджах, в ході яких у мишей ініціювали модель оксиген-викликаного ретинопатії, що поєднували з обробкою соматостатином та інгібіторами СК2 (емодин, ТВВ), було відмічено послідовне скорочення неоваскулярних пучків, тоді як основна судинна мережа залишалася без змін [100].

Роль протеїнкінази СК2 була встановлена в процесах васкуляризації. Показано, що СК2 і кіназа p38 фосфорилують ксантин оксидазу і ксантин дегідрогеназу у відповідь на гостру гіпоксію, тим самим, збільшуючи їх активність в мікросудинах ендотеліальних клітин легені щурів [101]. Гетеродимер фактора транскрипції 1 (HIF-1), що індукує гіпоксію, також регулюється СК2, що

було помічено під час інкубації клітин з відомими інгібіторами СК2 (DRB, ТВВ, апігенін) [102].

Патофізіологія скелетних м'язів та кісткової тканини. К. Р. Huang з колегами [103] були першими, хто повідомив, що протеїнкіназа СК2 фосфорилує білки, представлені в скелетних м'язах. Це було продемонстровано в експериментах, в яких субстратом для СК2 була глікоген синтаза-кіназа (GSK) екстрагована зі скелетних м'язів кроля. Через рік, було показано, що СК2 фосфорилує тропонін і легкі ланцюги міозину [104].

Оскільки деякі білки м'язів є субстратами для СК2 [91], очевидно, що цей ензим може бути причетним до виникнення захворювань, які вражають м'язову тканину. Наприклад, СК2 фосфорилує низку білків, які знаходяться в мембрані саркоплазматичного ретикулуму (SR). До них відносять багатий на гістидин Ca^{2+} зв'язуючий білок і саркалюменін – глікопротеїни, що приймають участь у Ca^{2+} сигналінгу і пов'язані з ріанодиновими рецепторами (RyRs), які є класом кальцієвих каналів, чії мутації спричиняють злоякісну гіпертермію, тахікардію та не ішемічну кардіоміопатію [105].

Також протеїнкіназа СК2 відіграє важливу роль в нервово-м'язових з'єднаннях, порушення яких призводить до аутоімунних розладів, таких як міастенія [106]. Важливим компонентом цих з'єднань є специфічна до м'язів рецептор-тирозин кіназа MuSK, чия агрин-опосередкована активація сприяє коректній організації ацетилхолінових рецепторів (AChR). В свою чергу, протеїнкіназа СК2 використовує кіназу MuSK як субстрат. Більше того, пригнічення чи повне інгібування активності СК2 порушує кластеризацію і стабільність рецепторів ацетилхоліну, тоді як нокаут регуляторної субодиниці в м'язових тканинах, призводить до розвитку міастенічного фенотипу, що супроводжується порушенням структури і функцій м'язових пластин [107].

Пригнічення активності СК2 α' може бути ефективним підходом для лікування серцевої недостатності. Це пов'язано з тим, що ця каталітична субодиниця фосфорилує супресор пухлин p27^{Kip1} і є посередником при його ангіотензин II-опосередкованій активації [108]. Оскільки ангіотензин II є сильним

індуктором гіпертрофії кардіоміоцитів, комплекс «p27Kip1-CK2 α' » можна використовувати як мішень при гіпертрофічному сигналінгу в кардіоміоцитах.

Вірусні інфекції. Інфікування організму різноманітними вірусними агентами порушує нормальний ріст клітин і шляхи їх виживання, що призводить до розвитку захворювань. Вважається, що конститутивна активність CK2 є причиною того, що деякі віруси використовують цей ензим як фосфорилуючий агент для різноманітних білків, залучених в їх життєвий цикл. Одними з цих вірусів є вірус Епштейна-Барр [109], простий вірус герпесу (ВПГ) [110], віруси гепатиту В і С [111, 112], вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) [113], цитомегаловірус людини [114], вірус папіломи людини [115] тощо. Здатність CK2 фосфорилувати білки вірусів вперше була повідомлена в 1988 р., коли F. A. Grässer з колегами ідентифікували низку фосфорильованих амінокислотних залишків великого Т-антигену SV40 і показали, що лише субфракція великих Т-молекул є субстратом для CK2 [116]. В 2003 р. F. Meggio і L. A. Pinna [91] ідентифікували близько 40 білків вірусів, які фосфорилуються CK2, що становило 1/8 від загальної кількості субстратів цієї кінази, повідомлених в літературі на той час. Фосфорилування білків вірусів протеїнкіназою CK2 має багато наслідків, а саме: підвищення їх ядерної локалізації [114], модуляцію зв'язування з ДНК [117], регуляцію вірусної ензиматичної активності [118], 26S протеасомну деградацію вірусних білків [112], реплікацію і транскрипцію вірусного генома [119].

Одним з найбільше досліджених прикладів взаємозв'язку між активністю CK2 і розвитком вірусної інфекції є вірус герпесу першого типу (ВПП-1). Кіназна активність детектована в препаратах очищених віріонів ВПП-1, була визначена як активність CK2 з білками ВПП-1, включаючи білки VP12 та VP23, які вона фосфорилувала [113]. Також відомо, що CK2 фосфорилує структурний білок вірусу простого герпесу VP16 по серину 375. При заміні цього залишку на аланін, формування комплексу між VP16 та клітинними факторами Oct-1 та HCF стає неможливим, це перешкоджає трансактивації ранніх генів вірусу [114]. Один з цих генів – ICP27 (інша назва IE63), фосфорилується CK2 по серину 16 та 18 [115] і

виділяється разом із СК2 та гетерологічним ядерним рибонуклеопротеїном К (hnRNP K) [116]. Пізніше було знайдено, що до цього комплексу також входить р32 – клітинний білок, який залучений в сплайсинг мРНК, і також фосфорилується СК2 в комплексі з ICP27. ВГП-1 стимулює активність СК2 одразу після інфікування, при цьому холоензим переміщується з ядра в цитоплазму, внаслідок цього hnRNP K стає мішенню для фосфорилування СК2, хоча за інших умов він не є субстратом цієї кінази. Ці зміни залежать від експресії ICP27 і полегшують літичний цикл ВГП-1 [117].

Рак. Доведено, що надекспресія протеїнкінази СК2 призводить до розвитку онкологічних захворювань, в тому числі аденокарциноми легені [118], раку молочної залози [119], простати [120], мозку, нирок [121], меланому, колоректальної карциноми [122] та гематологічних злоякісних новоутворень [123]. Велика кількість білків, які потенційно залучені в процеси онкогенезу є субстратами для СК2 (табл. 1.1) [3].

Докази участі СК2 в неопластичній трансформації було отримано в експериментах, проведених за участі протеїнкінази в модельних системах. Наприклад, у досліджах із Ipr/Iprg мишами було показано, що надекспресія СК2 α помітно посилює Т-клітинні лімфопроліферативні захворювання та аутоімунні прояви, пов'язані з порушенням експресії Fas ліганду, який відноситься до другого типу трансмембранних білків, що належать до родини факторів некрозу пухлин [3]. У трансгенних мишей надекспресія протеїнкінази СК2 в молочних залозах викликала гіперплазію та дисплазію, які призводили до виникнення аденокарциноми [85]. Пригнічення активності СК2 α за допомогою антисенсових олігонуклеотидів зменшувало ріст лускатих клітин карциноми голови і шиї [124].

Ґрунтуючись на вищевикладеній інформації, не лишається сумнівів в участі протеїнкінази СК2 в процесах онкогенезу. Проте, механізми, які залучають цей ензим в розвиток раку залишаються до кінця не відомими. Одне з припущень пов'язане з каталітичною активністю протеїнкінази. Але, враховуючи той факт, що СК2 приймає участь у великій кількості клітинних функцій, включаючи контроль клітинного росту, проліферацію та інші процеси, які навряд чи є випадковими,

постає питання про існування певних молекул/механізмів модуляторів, що впливають на її функціональну активність в різних ділянках клітини.

Таблиця 1.1

Білки, які є субстратами протеїнкінази СК2 і залучені в процеси онтогенезу [3]

Група білків	Субстрати
Білки, які залучені в синтез і відновлення нуклеїнових кислот	ДНК лігаза, ДНК топоізомераза 1 і 2, РНК полімераза 1 і 2, продукт гену <i>brca1</i>
Фактори транскрипції, включаючи онкогени та гени супресори пухлин	<i>c-myc</i> , <i>N-myc</i> , <i>c-Jun</i> , p53, Rb, рецептори андрогену, фактор відповіді сироватки, <i>mdm2</i>
Фактори, які залучені в синтез білків	eIF18, eIF28, eIF3, eIF48, eIF5
Білки, які залучені в сигнальну трансдукцію	p34 ^{cdc-2} , протеїнкіназа С, регуляторна субодиниця протеїнкінази А, інсуліновий рецептор, рецептор IGF-II, протеїн фосфатаза 2А
Вірусні білки	Вірус папіломи людини: E7, SV40: великого Т антигена, поліома: VP1, ВІЛ: Vpu, простий герпес: VP22, VP16, білок α22, субодиниця R1, вірус Епштейна-Барр: ZEBRA білок, EBNA-2

С. С. Allende з колегами [125] було висунуто припущення про існування білків, які слугують «перемикачами» при взаємодії з субодиницями СК2. Було показано, що останні є мішенню для тирозинових кіназ Abl та Src-Abl [126]. Білок CD5, який є маркером Т-клітин і аномально експресується в В лімфоцитах при хронічній лімфоцитарній лейкемії, безпосередньо взаємодіє з СК2 та збільшує її активність. Іншим прикладом є ген *brca1*, який кодує білковий комплекс, що залучений в репарацію ДНК. Мутаціями в гені *brca* на хромосомі 17р пояснюють виникнення раку молочної залози в межах однієї родини і схильність до раку яєчників. Було показано, що продукт цього гену зв'язується з СК2, яка його

фосфорилує. Ця взаємодія зменшувалася *in vitro*, коли було використано фрагмент гена *brca1* з мутацією, асоційованою з захворюванням [36].

Інший можливий механізм виникнення СК2-опосередкованих онкологічних захворювань може полягати в здатності протеїнкінази мігрувати до різних компартментів клітини у відповідь на різні стимули [3]. Ця гіпотеза була підтверджена спостереженнями, в яких СК2 зазнавала надшвидкої модуляції, перебуваючи в асоціації з хроматином і ядерним матриксом, у відповідь на зміну статусу стимуляторів росту, в тому числі гормонів і факторів росту. Наприклад, було показано специфічну модуляцію ядерного матриксу, асоційовану з СК2 під час прогресії клітинного циклу [85].

Переміщення кінази до різних частин клітини може впливати на формування фенотипу раку. Це було встановлено під час імуногістохімічного аналізу, який показав незначну кількість СК2 в цитоплазмі зразків доброякісних або нормальних клітин, тоді як у зразках ракових клітин спостерігалася інтенсивна ядерна локалізація. Переважна локалізація СК2 в ядрі клітин пухлин може впливати не лише на кіназну активність, пов'язану з ростом і проліферацією, але й на процеси, пов'язані з регуляцією її апоптичної активності [36]. Ця властивість СК2 може бути особливо важливою в зв'язку з залученням її в процеси неоплазії.

Ще одним із можливих механізмів залучення СК2 в процеси пухлиноутворення є здатність протеїнкінази фосфорилувати ядерні білки і онкогени, які впливають на клітинний цикл та проліферацію, а також білки, пов'язані з ядерним матриксом і хроматином. В ході експериментів, в яких досліджували фосфорилування останніх протеїнкіназою СК2 під час транскрипції, коли нуклеосоми є активними, було встановлено, що субстрати СК2 можуть змінюватися за різних умов. Наприклад, фосфорилування одних білків є можливим лише в транскрипційно-активних нуклеосомах, тоді як інших – в транскрипційно-неактивних [3].

Незважаючи на те, що процеси пухлиноутворення часто розглядають як дисбаланс між ростом і загибеллю клітин, було показано, що запалення також може

призвести до прогресії пухлин [127]. Наприклад, в ході популяційних досліджень було встановлено, що ризик виникнення раку зростає в особин, які схильні до хронічних запальних захворювань. При цьому, вірогідність виникнення пухлин значно зменшувалася при довготривалому використанні протизапальних ліків, таких як аспірин і селективний інгібітор Cox2 (циклооксигеназа 2) [128]. Ймовірно, мікросередовище пухлини, яке перебуває під контролем клітин запалення, модулює процеси проліферації, трансформації, міграції та виживання клітин. Крім того, відомо, що клітини пухлин використовують цитокіни і молекули адгезії для міграції, інвазії та метастазування [127].

На додаток, було встановлено, що протеїнкіназа СК2 здатна проявляти онкогенну кооперативність. Це було показано в експериментах на мишах із специфічною експресією СК2 α в Т-клітинах, які були схрещені з мишами, що мали надекспресію *c-myc* чи *tal-1* онкогенів або з мишами, в яких був дефект гена, що кодує фактор транскрипції p53 [129-131].

Диференційована роль каталітичних субодиниць СК2 у різних захворюваннях. Незважаючи на те, що в більшості публікацій мова йде про участь у виникненні низки патологій саме холоензиму СК2, а не його окремих субодиниць, останнім часом з'являється все більше доказів того, що СК2 α і СК2 α' мають незалежні функції в здоровому організмі та при розвитку захворювань. Наприклад, в експериментах із визначення терапевтичної ефективності нокауту СК2 α субодиниці в клітинах пухлин, було доведено важливість використання СК2 α і СК2 α' , як окремих мішеней для цільової терапії раку [132].

Нещодавно в мишей було ідентифіковано білки мозку, асоційовані з СК2 α . Деякі з цих білків відіграють важливу роль у розвитку неврологічних захворювань, а саме: шизофренії, хвороби Альцгеймера і Паркінсона, нейробластоми тощо [133]. Індукована експресія СК2 α в Т-клітинах і в клітинах молочних залоз трансгенних мишей призводила до лімфогенезу та непластичної трансформації, відповідно [134]. В людини підвищений рівень мРНК СК2 α було зафіксовано при меланомі і раку легені [135, 136]. К. Y. Lin з колегами [137] зафіксували зростання рівня експресії СК2 α в ядрах ракових клітин

колоректальної тканини. Є відомості, про те що ген, який кодує СК2 α є протоонкогеном [25].

Відомо, що СК2 α' у комплексі з p27Kip1 (білок, що регулює клітинний цикл) відіграє ключову роль в гіпертрофії кардіоміоцитів і інсулін-опосередкованій активності СК2 [40]. В клітинах, нокаутуваних по СК2 α' субодиниці, спостерігалось порушення переносу мембранного білка, що призводило до виникнення захворювань печінки [20].

Нами було проведено теоретичний аналіз даних експресії генів (SAGE аналіз) каталітичних субодиниць СК2 в нормальних клітинах та в клітинах уражених раком (використовували тканини людини і клітинні лінії) за допомогою веб-ресурсу Національного інституту раку США (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). В результаті цього дослідження, було отримано наступні дані: в нормальних клітинах вищий рівень експресії СК2 α спостерігався в підшлунковій залозі, печінці, товстому кишечнику, спинному та кістковому мозку, яєчниках, шкірі і значною мірою в ембріональних ствольних клітинах; вищий рівень СК2 α' – в клітинах головного мозку, сітчатки ока, серця, молочних залоз, плаценти, простати, лімфовузлів та судин. Цікаво, що вищий рівень експресії СК2 α було помічено в клітинах пухлин підшлункової залози та шкіри; вищий рівень СК2 α' – в клітинах пухлин головного мозку, молочних залоз та печінки. В пухлинах інших органів рівень каталітичних субодиниць СК2 значно не відрізнявся [36].

В експериментах G. Di Maira з колегами [138] було показано участь СК2 у виникненні в клітин резистентності до ліків (клітини пухлин ставали не чутливими до апоптозу, викликаного хімічними реагентами). Порівнюючи експресію СК2 субодиниць в чотирьох різних парах чутливих і резистентних ліній раку, було встановлено, що в трьох випадках резистентний фенотип супроводжується надекспресією СК2 α субодиниці. Отже, ймовірно, СК2 може розглядатися як мішень для дії в фарм-резистентних фенотипах.

Отже, той факт, що СК2 α і СК2 α' пов'язані з різними патологіями свідчить про те, що для лікування цих захворювань доцільніше використовувати інгібітори, які є специфічними до каталітичних субодиниць СК2.

1.4. Етапи пошуку та розробки інгібіторів протеїнази

Пошук та розробка низькомолекулярних інгібіторів протеїнази є одним з ефективних підходів, що використовується для створення фармацевтичних засобів нового покоління. Цей процес включає в себе низку етапів і значно прискорює та здешевлює процес отримання високоактивних сполук – попередників ліків. Сполуки, які не відповідають вимогам для фармацевтичних препаратів, проте є активними і селективними інгібіторами, використовуються в молекулярній біології для вивчення ролі протеїнази в мережі сигнальних шляхів клітини.

На першому етапі пошуку інгібіторів молекули-кандидати «просіюють» через різні фільтри. Далі десятки тисяч досліджуваних сполук перевіряються на комплементарність до обраної мішені за допомогою методів високопродуктивного скринінгу. Сполуки, які в результаті докінгу показали оптимальні показники енергії зв'язування ліганду з мішенню, мали водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії з ключовими амінокислотними залишками активного сайту рецептора, обираються для тестування *in vitro*. Коли, біологічна активність сполук стає відомою – проводять визначення взаємозв'язку між її величиною та хімічною структурою сполук. Додатково отримують комплекси лігандів із активним сайтом рецептора. Це допомагає встановити за рахунок яких взаємодій відбувається зв'язування сполуки з білком. Враховуючи результати аналізу залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» та комплексів «ліганд - рецептор» розробляють моделі взаємодії знайдених сполук з протеїназою та виробляють рекомендації щодо подальшої оптимізації сполук. Нові сполуки синтезують, перевіряють *in vitro* і знову досліджують взаємозв'язок між структурою та активністю і їх комплекси з білком. Тому, стадія оптимізації може складатися з кількох циклів, доки не буде одержано інгібітор із бажаною активністю. На останніх етапах розробки сполука-лідер може зазнавати оптимізації з метою збільшення її розчинності, стабільності, пролонгації дії тощо.

Отримані «хіти» (сполуки із високими активностями та заданими властивостями) переходять на стадію тестування *in vivo*. На цій стадії інгібітори перевіряють на ADMET-ох властивості (адсорбція, розподілення, метаболізм, виведення та токсичність). У разі успішного проходження цього етапу, препарат передають на доклінічні, а потім клінічні дослідження [139].

Отже, спочатку всі сполуки «просіюють» через низку фільтрів, які вибирають в залежності від вимог до кінцевих властивостей сполуки. Найбільш широко використовуваним фільтром для сполук, попередників фармацевтичних препаратів, є фільтр за параметрами Ліпінського («правило п'яти») [140]. Ці правила – набір молекулярних дескрипторів, які отримані на основі аналізу та класифікації ключових фізико-хімічних властивостей лікарських засобів та біологічно-активних сполук [141]. Згідно цього правила сполуки повинні відповідати наступним параметрам: молекулярна маса – не більше 500; коефіцієнт розподілу в системі 1-октанол/вода ($\log P$) – не більше 5; кількість нетермінальних зв'язків, що обертаються (Rot B) – не більше 10; кількість донорів водневого зв'язку (Hd) – не більше 5; кількість акцепторів водневого зв'язку (HA) – не більше 10 [140]. Часто, крім наведених вище критеріїв оцінки, враховують логарифм розчинності в воді (г/мл) при $\text{pH}=7,4$ ($\log S_w$, не менше -5) та кількість ароматичних кілець (не більше 4) [142]. D. F. Veber з колегами при дослідженні впливу структурних характеристик сполук на біодоступність встановили, що найбільший вплив на цей показник має молекулярна жорсткість, площа поверхні (PSA) та кількість водневих зв'язків. Пізніше вони запропонували правила, які характеризують сполуки з задовільним значенням біодоступності: кількість обертальних зв'язків ≤ 10 ; $\text{PSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$ або кількість усіх водневих зв'язків (акцептори та донори) ≤ 12 [143]. W. M. Pardridge [144] запропонував критерії для оцінки сполук, що повинні проникати через гематоенцефалічний бар'єр [141].

Далі сполуки, які пройшли попередній відбір на основі фільтрів, піддаються процедурі віртуального скринінгу (*in silico*). Цей процес може здійснюватися за допомогою кількох підходів: рецепторно-орієнтованого скринінгу, ліганд-орієнтованого скринінгу та фармакофорного скринінгу. Рецепторно-орієнтований

скринінг – це метод, який ґрунтується на проведенні докінгу низькомолекулярних сполук в обраний сайт білка-мішені (3D структура молекули білка відома) із подальшим використанням скорингової функції. Ліганд-орієнтований скринінг ґрунтується на пропрієтарних базах програмного забезпечення та базах, що збираються з літературних даних під конкретні задачі та дозволяє проводити докінг однієї молекули інгібітору в різні сайти білків-мішеней [139]. В ході фармакофорного скринінгу будують трьохвимірні моделі просторового взаєморозташування специфічних топологічних елементів молекул, серед яких: донори та/чи акцептори водневого зв'язку, області з позитивним чи негативним зарядом, гідрофобні зони тощо. Цей метод дозволяє запропонувати нові структурні хемоти́пи перспективних сполук на основі відомих активних речовин [145].

Рецепторно-орієнтований скринінг проводять за допомогою низки програм, найбільш розповсюдженими серед яких є UCSF Dock, AutoDock, ICM-Docking, FlexX тощо. Підходи та алгоритми, що використовуються в цих програмах детально розглянуто в низці публікацій [146-149]. Ці програми дозволяють передбачити взаємодію молекул, визначити просторову структуру їх комплексів та афінність зв'язування [150].

Далі, для сполук, відібраних в ході попереднього віртуального скринінгу, визначають інгібувальну активність. Для цього використовують низку біохімічних методик, найбільш розповсюдженими серед яких є метод із використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ [151] та люциферазна реакція [152]. В основі цих методів лежить кінетика процесу фосфорилування кіназою власного субстрату та вплив на цей процес сполук, що тестуються.

Наступним кроком при розробці ефективних інгібіторів є хімічна оптимізація. Її стратегію розробляють на основі даних, отриманих в ході дослідження взаємозв'язку між структурою та активністю сполуки, а також в результаті аналізу комплексів «ліганд - рецептор», що дозволяє оцінити взаємодії (водневі зв'язки, гідрофобні контакти), які виникають між сполукою та білком-мішенню. Комплекси сполук з білком отримують і досліджують за допомогою методів молекулярного моделювання (молекулярний докінг, молекулярна

динаміка тощо). Молекулярний докінг ґрунтується на фрагментах і використовує методи хімічної та стеричної комплементарності для генерації можливих орієнтацій ліганду [150]. Метод моделювання молекулярної динаміки розраховує флуктуації та конформаційні зміни молекулярної системи і дозволяє більш точно встановити кількість водневих зв'язків між рецептором та лігандом і оцінити їх стабільність у часі. Ця методологія детально описана в праці К. Binder з колегами [153].

1.5. АТФ-конкурентні інгібітори холоензиму протеїнкінази СК2 та її каталітичних субодиниць

Протягом останніх років інгібітори СК2 було знайдено серед великої кількості хімічних класів сполук [4-7], в тому числі серед похідних бензімідазолу і бензотриазолу [8, 9], антрахінону [10], флуоренону [11], кумарину [12], флавоноїду [13], дибензофурандіолу [14], хіноліну [154], триазину [155], амінопіримідинону [156], азнафталіну [157], тієнопіримідинону [158] та піразолотриазину [159]. Найбільш відомі інгібітори СК2 описано нижче та зображено на рис. 1.3.

Одним з перших повідомлених інгібіторів протеїнкінази СК2 є DRB (5,6-дихлор-1-(*b*-D-рибофуранозил)бензімідазол), показник K_i становить 23 мкМ [160]. Значно пізніше, на основі структури цієї сполуки, було розроблено одні з найбільш відомих інгібіторів протеїнкінази СК2 – полігалогензаміщені бензімідазоли. Серед них найбільш активним виявився ТІВІ (4,5,6,7-тетрайодо-1H-бензімідазол), його показник $K_i = 0,023$ мкМ [161]. Нажаль, специфічність сполук з цього класу щодо СК2 виявилась низькою. Наприклад, один із інгібіторів цієї групи (ТВВ) ефективно пригнічує активність кіназ DYRK1A, DYRK3, всіх членів родини PIM, HIPK2, ERK8 та PKD [162] і має коефіцієнт Gini 0,375. Незважаючи на це, сполуки з цього класу ефективно використовуються для вивчення ролі СК2 у внутрішньоклітинному сигналіngu.

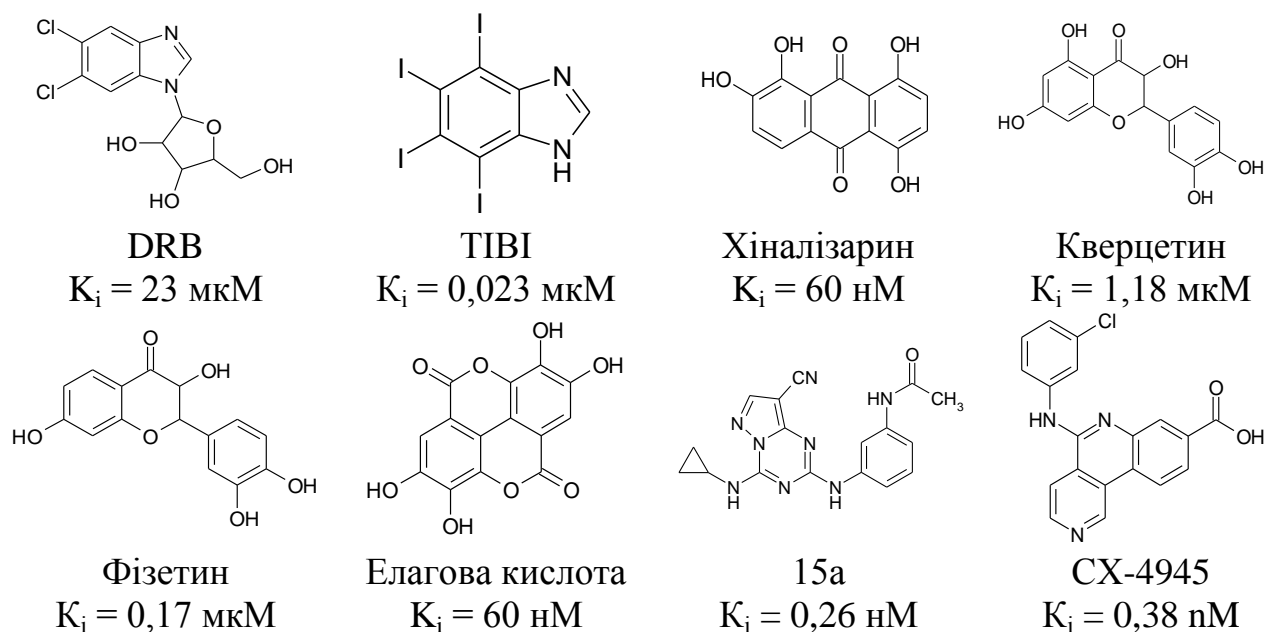


Рис. 1.3. Хімічна структура та значення константи інгібування відомих інгібіторів протеїнкінази СК2

Іншими відомими інгібіторами СК2 є сполуки, що мають природне походження: антрахінони, флавоноїди та кумарини. Найбільш активною сполукою серед похідних антрахінону є хіналізарин (1,2,5,8-тетрагідрокси-антрахінон, $K_i = 60 \text{ нМ}$) [163]. Флавоноїди представлені такими відомими інгібіторами, як кверцетин (3,3',4',5,7-пента-гідрокси-флавоон, $K_i = 1,18 \text{ мкМ}$) та фізетин (3,3',4',7-тетрагідроксифлавоон, $K_i = 0,17 \text{ мкМ}$) [13] тощо. Однак, ці сполуки також мають низьку селективність щодо протеїнкінази СК2. Представниками класу кумаринів є елагова кислота ($K_i = 60 \text{ нМ}$) та її похідні [164]. Основним недоліком цього інгібітору є те, що він не здатний проходити через бар'єр кишківника в нативному вигляді і трансформується в уролітин.

Найбільш активним інгібітором протеїнкінази СК2 є похідне піразоло[1,5-а][1,3,5]триазину (15a) з $K_i = 0,26 \text{ нМ}$ [159]. Але, варто зауважити, що активність цієї сполуки визначалася при концентрації кінази 20 нМ. Це означає, що показник IC_{50} вимірювався в діапазоні концентрацій інгібітору, які були значно меншими за концентрацію ензиму в реакційній суміші. В цих умовах показник K_i може бути

визначений не достовірно, а отже справжня активність цієї сполуки може відрізнятись від зазначеної.

Незважаючи на більше ніж 20-ти річну історію пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2, лише одна сполука СХ-4945 (5-(3-хлорфеніламіно)-бензо[с][2,6]нафтиридин-8-карбонова кислота, $K_i = 0,38$ нМ) знаходиться на другій стадії клінічних досліджень [165]. Відомо, що цей інгібітор пригнічує здатність до виживання та ангіогенні сигнальні шляхи в ракових клітинних лініях, а також проявляє протипухлинну активність на мишачих ксенотрансплантатах. Протипухлинний механізм дії СХ-4945 пов'язаний з пригніченням внутрішньо- і позаклітинних СК2-залежних процесів, які необхідні для підтримки фенотипу ракових клітин. Інгібітор заявлений, як ліки проти прогресуючих солідних пухлин, захворювання Кастлемана та множинної мієломи [15, 16].

Всі описані вище сполуки були заявлені або як інгібітори холоензиму СК2, або як СК2 α субодиниці. Надзвичайно мала кількість публікацій присвячена перевірці ізоформної специфічності сполук. Однією з таких робіт є праця М. Janeczko з колегами [166], в якій вони досліджували вплив похідних 4,5,6,7-тетрабromo- і 4,5,6,7-тетрайодо-1H-бензімідазолу на активність каталітичних субодиниць протеїнкінази СК2. Вони продемонстрували, що досліджувані інгібітори пригнічують активність СК2 α' в 3-6 разів краще, ніж СК2 α . Серію 4,6-дизаміщених похідних піразину, включаючи СС04820, було отримано як нові інгібітори СК2 α і СК2 α' субодиниць людини [49]. Про 4,6-дизаміщені похідні піразину відомо, що вони зменшують ступінь ураження нирок при нефриті через інгібування СК2 α і негативно впливають на сперматогенез через пригнічення СК2 α' [167].

З огляду на те, що окремі ізоформи СК2 можуть бути залучені до різних патологічних процесів не залежно одна від одної, більше уваги має приділятися пошуку та розробці ізоформно-специфічних інгібіторів. Вони допоможуть не лише в боротьбі з захворюваннями, в розвитку яких задіяні СК2 α і СК2 α' , а і в подальшому дослідженні незалежної біологічної ролі цих субодиниць.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Молекулярне моделювання

Стратегія молекулярного моделювання ґрунтується на пошуку взаємозв'язку між хімічною структурою та біологічною активністю сполук з метою відбору лігандів, які будуть ефективно взаємодіяти з відповідними біологічними мішенями. В цій роботі було використано рецепторно-орієнтований підхід на основі методу гнучкого докінгу. Процедура гнучкого докінгу складається з генерування комплексів ліганд-рецептор та оцінки сприятливих взаємодій шляхом аналізу внесків кожного з компонентів комплексу в загальну енергію зв'язування. Для рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу було використано пакет програм DOCK 4.0 [168]. Розрахунок молекулярної динаміки комплексів «інгібітор - СК2» було проведено за допомогою пакета програм GROMACS 3.0 [169]. Для побудови комплексів інгібіторів із протеїнкіназою СК2 використовували програму DOCK 4.0.

2.1.1. Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг

2.1.1.1. Підготовка рецептора. В ході досліджень було використано 3D структури протеїнкінази СК2, отримані з бази даних Protein Data Bank (PDB ID: 1JWH [18], 2ZJW [170] та 3OFM [171]). 1JWH – 3D структура холоензиму протеїнкінази СК2($\alpha\alpha\beta\beta$) людини (для рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу використовувалася 3D структура α -субодиниці (1JWH_A), яка містить в активному сайті аналог АТФ – аденілілімідодіфосфат (AMPPNP)). 2ZJW – 3D структура каталітичної субодиниці (СК2 α) протеїнкінази СК2 людини, в

активному сайті якої знаходиться інгібітор СК2 – елагова кислота (ellagic acid). Цю 3D структуру разом із 1JWH використовували для побудови комплексів «ліганд-рецептор». 3OFM – 3D структура каталітичної субодиниці (СК2 α') протеїнкінази СК2 людини, в активному сайті якої знаходиться інгібітор СК2 – MB002 (3-(4,5,6,7-тетрабромо-1H-бензотриазол-1-іл)пропан-1-ол). Цю 3D структуру було використано для побудови та дослідження комплексів «FLC26-СК2 α' » методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, відповідно.

Спочатку з файлів рецептора в форматі PDB було видалено інші субодиниці, молекули води, а також атоми ліганду та йони. Мінімізацію енергії проводили у воді за допомогою алгоритму крутого спуску в силовому полі GROMOS96 (1000 кроків мінімізації), реалізованому в пакеті програм молекулярної динаміки GROMACS 3.0 [169]. Часткові атомні заряди було розраховано за допомогою силового поля AMBER.

2.1.1.2. Підготовка лігандів. Підготовка файлів лігандів з бази даних комбінаторної бібліотеки (конвертація їх структур з 2D формату в 3D, розрахунок геометрії лігандів в силовому полі YFF [172] та призначення часткових атомних зарядів за допомогою метода Кірхгофа [173] здійснювалася за допомогою програми SCREENER [174]. Пакет програм GROMACS MD [169] використовували для швидкої мінімізації енергії лігандів за допомогою силового поля GROMOS96. Пакет програм GAMESS застосовували для оптимізації геометрії лігандів та розрахунку часткових атомних зарядів. Програма TOPBUILDER була використана для генерування топології молекул у форматі GROMACS, контролю мінімізації енергії лігандів в GROMACS, а також присвоєння атомам часткових зарядів, які були розраховані в GAMESS.

2.1.1.3. Гнучкий докінг. Для рецепторно-орієнтованого гнучкого докінгу була використана програма DOCK 4.0 [168]. DOCK використовує алгоритм інкрементальної реконструкції. Під час докінгу відбувається автоматичне генерування набору конформацій та орієнтацій ліганду в активному сайті рецептора. Найбільш енергетично вигідна позиція оцінюється за допомогою скорингових функцій (сумма енергій внутрішньомолекулярних та

міжмолекулярних Ван-дер-Ваальсових та електростатичних взаємодій). DOCK потребує вхідні файли просторової структури рецептора в наступних форматах: повна структура рецептора з присвоєними частковими атомними зарядами у форматі MOL2 та координати амінокислотних залишків активного сайту рецептора в форматі PDB. Координати лігандів мають бути в форматі MOL2 [149].

Сфери активного сайту рецептора були розраховані за допомогою утиліти *sphgen* пакета програм DOCK 4.0 та *Connolly MS*. Радіус проби складав 1,4 Å, густина поверхні складала 5,0 точок. Сфери, які не входили до кластеру, який описував активний сайт рецептора, були видалені. Карти решітки були розраховані за допомогою програми Grid пакета DOCK 4.0. Роздільна здатність решітки складала 0,5 Å, максимальна дистанція врахування енергетичних взаємодій складала 10 Å. Електростатичні взаємодії були розраховані з урахуванням відстань-залежної діелектричної константи, при цьому діелектричний фактор становив 4. Структура рецептора описувалась повноатомною моделлю. Обертальні зв'язки та якірні елементи молекул лігандів було ідентифіковано програмою DOCK в автоматичному режимі. Пошук конформацій лігандів проводився з використанням торсійного драйву, величина шумового перекривання становила 0,3. Множинні якірні елементи в структурі ліганду були дозволені, мінімальна кількість атомів кожного елемента складала 6. Пошук орієнтацій лігандів було проведено з використанням автоматичного збігу. Максимальна кількість орієнтацій дорівнювала 500-1000. Також було проведено локальну мінімізацію енергії орієнтацій та конформацій ліганду і його якірних елементів. Ремінімізація ліганду була дозволена. Параметри мінімізації енергії були взяті за умовчанням [149].

2.1.4. Молекулярна динаміка комплексу «ліганд - рецептор». Для моделювання молекулярної динаміки протягом 10 нс були використані 3D структури каталітичних субодиниць протеїнкінази SK2, отримані з бази даних Protein Data Bank (PDB ID: 1JWH_A та 3OFM). Розрахунок молекулярної динаміки комплексів «інгібітор - протеїнкіназа SK2» було проведено за

допомогою пакета програм GROMACS 3.0 [169]. Топології лігандів (формат файлів .gro та .itp) були отримані за допомогою серверу Dundee PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrp/>).

Стартову позицію лігандів в активному сайті рецептора генерували за допомогою пакета програм DOCK 4.0 [168]. На наступному етапі проводили конвертацію вихідного молекулярного комплексу (формат PDB) у внутрішній формат GRO пакета GROMACS. Протонування амінокислотних залишків молекули рецептора проводили програмою pdb2gmx у відповідності до структури топологій та силового поля GROMOS96 [175]. Структуру комплексу «ліганд-рецептор» розміщували в центрі кубічного боксу, дистанція від граничних атомів комплексу до стінок боксу не перевищувала 1 нм. Після цього бокс заповнювали молекулами води (програма визначає кількість молекул автоматично). Далі систему було врівноважено, шляхом додавання необхідної кількості відповідних йонів (Na^+ , Cl^-). На наступному етапі проводили мінімізацію енергії комплексу у водному оточенні з використанням алгоритму крутого спуску (steepest descent) протягом 1000 кроків. Фінальні координати системи «рецептор – ліганд – розчинник» отримані в результаті мінімізації енергії, було використано для розрахунку «обмеженої» молекулярної динаміки, яка включала гармонічну прив'язку позицій атомів рецептора та ліганду до вихідних координат. Це дозволяло провести релаксацію комплексу і, таким чином, запобігти небажаним контактам. Час релаксації води складав близько 10 пс; «обмежену» динаміку розраховували протягом 40 пс. Систему «протеїн – ліганд – вода», отриману в результаті «обмеженої» динаміки, брали як вихідну для розрахунку «повної» динаміки протягом 10 нс [176]. У динаміці використовували інтеграційну схему Верле [177], початкові швидкості атомів генерували випадковим чином з використанням розподілення Максвелла [177] у відповідності з атомними масами. Для підтримання постійних значень довжин зв'язків та величин валентних кутів молекул води застосовували алгоритм SETTLE [178]. Алгоритм LINCS [179] використовували для обмеження довжин ковалентних зв'язків у молекулах рецептора та ліганду. Молекулярну динаміку проводили при температурі 300K.

Для підтримання константної температури системи застосовували метод слабого сполучення Берендсена [180].

Аналіз траєкторій молекулярної-динаміки проводили за допомогою програми VMD [181]. Аналіз середньоквадратичного відхилення атомів у процесі динаміки, загальної енергії системи, міжмолекулярних водневих зв'язків здійснювали за допомогою програм *g_rms*, *g_energy* та *g_hbond* пакета GROMACS 3.0 [169], відповідно. Генерацію 2D карт міжмолекулярних контактів проводили за допомогою програми LigPlot [182].

2.2. Біохімічні тести *in vitro*

2.2.1. Біохімічний скринінг *in vitro* із використанням [γ - 32 P]АТФ.

Тестування сполук проводили за методикою, описаною С. J. Hastie з колегами [151]. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 3 мкл 10^x буфера для СК2 (200 мМ Тріс-НСl, рН 7,5; 500 мМ КCl; 100 мМ MgCl₂); 4 мкг синтетичного пептидного субстрату RRRDDDS \underline{S} DDD (New England Biolabs, Великобританія); 0,02 мкл (10 одиниць, 20 нг очищеного рекомбінантного білка протеїнкінази СК2 (гетеротетрамерний холоензим, продукований в *E. Coli*, #P6010L, New England Biolabs, Великобританія)); 13 мкл дистильованої води. У разі визначення ступеня інгібування каталітичних субодиниць СК2, використовували 0,02 мкл рекомбінантного білка СК2 α (відповідає приблизно 20 нг рекомбінантного білка) або 0,0035 мкл рекомбінантного білка СК2 α' (відповідає приблизно 3,5 нг рекомбінантного білка). Кінцеві молярні концентрації компонентів реакції для тестів з СК2 становили: близько 150-175 мкМ пептидного субстрату, близько 20 нМ ензиму (або 2,5-3 нМ для титрування сполук з наномолярною активністю). Далі аліквоти реакційної суміші (19 мкл/пробу) поміщали в епандорфи об'ємом 1,5 мл та додавали по 1 мкл розчину інгібітору (розчиненого в ДМСО) потрібної концентрації. Для ініціації

реакції до кожного зразка додавали попередньо приготовану суміш, яка складалася з 10 мкл 150 мкМ АТФ та $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, з радіоактивністю 0,1-0,2 мСі на 30 мл суміші. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Після інкубації, що тривала 25 хв при 30° С, реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5 % розчину *орто*-фосфорної кислоти; отриману реакційну суміш наносили на 20 мм диск (18x18 мм) фосфоцелюлозного паперу (Whatman, p31, p81). Диски відмивали тричі з використанням 1 % розчину *орто*-фосфорної кислоти та просушували в термостаті при 45° С. Рівень радіоактивного сигналу вимірювали в сцинтиляційній рідині в флаконах, використовуючи сцинтиляційний лічильник Tricarb 2800 TR (PerkinElmer, США). Як негативний контроль, замість розчину інгібітору додавали 1 мкл ДМСО (3,3 %). Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням включення $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в субстратний пептид при додаванні інгібітору та при додаванні ДМСО.

2.2.2. Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази СК2 за допомогою люциферазної реакції. Вимірювання активності протеїнкінази СК2 в присутності сполук проводили методом непрямой детекції [152]. Залишкову концентрацію АТФ визначали за допомогою люциферазної суміші (#860-07/001, Easy Light kit, PerkinElmer, США) за інтенсивністю люмінесценції, яку вимірювали на люмінометрі (VICTOR 1420-50 Multilabel Counter, PerkinElmer, США).

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 3 мкл 10^x буфера для СК2 (20 мМ Трис-НСІ, рН 7,5; 50 мМ КСІ; 10 мМ MgCl_2); 3 мкл (6 мкг) пептидного субстрату RRRDDDSDDD (#6012, New England Biolabs, Великобританія); 0,02 мкл (10 одиниць, 20 нг очищеного рекомбінантного білка протеїнкінази СК2 (гетеротетрамерний холоензим, продукований в *E. coli*, #P6010L, New England Biolabs, Великобританія)); 13 мкл дистильованої води. Аліквоти реакційної суміші 19 мкл/пробу поміщали в лунки планшету (#6005290, Optiplat 96, PerkinElmer, США). До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітору (розчиненого в ДМСО) потрібної концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл 22,5 мкМ АТФ. Кінцева концентрація АТФ у

реакційній суміші становила 7,5 мкМ. Після інкубації, що тривала 25 хв при 30° С, в кожен лунку додавали 30 мкл люциферазної суміші (#860-07/001, EasyLight-kinase, Perkin Elmer, США), що одночасно зупиняла кіназу і починала люциферазну реакцію із залишковим АТФ. Планшет переносили в люмінометр (VICTOR 1420-50 Multilabel Counter, PerkinElmer, США) і проводили вимірювання рівня люмінесценції згідно з протоколом програми приладу (1 секунда на пробу). Як негативний контроль використовували 1 мкл ДМСО (3,3 %). Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням інтенсивності рівня люмінесценції в пробах з ДМСО (100 % активності кінازی, 0% залишкового АТФ) із пробами, які містили інгібітор. Проби, в яких інтенсивність люмінесценції була істотно вищою за контроль (на 50-400 %), вважали такими, де кіназу активність пригнічено.

Визначення показника IC₅₀. Показник IC₅₀ інгібіторів визначали шляхом встановлення активності ензиму за різних концентрацій сполуки. Діапазон концентрації сполуки (титрування) для визначення показника IC₅₀ обирали та корегували повторними експериментами, що дозволяли отримати титрувальну криву з верхньою та нижньою асимптотами. Інгібітор перевіряли при 10-16 концентраціях, отриманих шляхом двократного розведення в трьох повторях. Титрувальні криві будували в координатах активності ензиму в CPS (counts per second, рахунок за секунду) (по осі ординат) та десяткового логарифму концентрації інгібітору (lg[I]) (по осі абсцис). Для середнього значення (значення концентрації інгібітору в точці, що відповідає середині відрізка між верхньою та нижньою асимптотами) знаходили обернений логарифм концентрації, який дорівнював значенню IC₅₀.

Визначення константи інгібування K_i. Для визначення константи інгібування K_i інгібіторів СК2 використовували той самий склад робочого розчину, умови проведення реакції та методика, що і для біохімічного скринінгу *in vitro*. Інгібітори в реакційній суміші розтитровували методом двократних розведень при різних концентраціях АТФ. Діапазон концентрацій інгібітору обирали залежно від його IC₅₀ (5-6 точок). Для кожної концентрації сполуки за

різної концентрації АТФ визначали ступінь інгібування за показниками лічильника Tricarb 2800 TR (PerkinElmer, США) та будували залежність в координатах $1/\text{CPS} \cdot 10^6$ (приймали за $1/v_0$) від $1/[\text{ATP}]$ (1/S). Точки перетину ліній з віссю абсцис відповідали $1/K_m$, а на осі ординат – v_{max} . Обраховували значення $K_m/v_{\text{max}} \cdot 10^x$ (ступінь) та будували графік залежності цієї величини від концентрації інгібітору [I]. Екстраполюючи отриманий графік на вісь абсцис, визначали точку перетину з віссю, що чисельно дорівнювала K_i .

2.2.3. Визначення селективності інгібіторів протеїнкінази СК2.

Селективність інгібіторів по відношенню до протеїнкінази СК2 було перевірено на чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Aurora A та Rock1) та трьох тирозинових протеїнкіназах (FGFR1, c-Met і Tie2). Визначення залишкової активності протеїнкіназ проводилось аналогічно до методики проведення біохімічного скринінгу *in vitro* на протеїнкіназі СК2 із використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [148] та рекомендацій фірми-постачальника (Millipore, США). Різним був склад реакційної суміші та час інкубації проб.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази ASK1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5^x кратного реакційного буфера для ASK1 (25 мМ МОПС, рН 7,2, 2,5 мМ ЕГТА, 2,5 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ (1,4-дитіотреїтол), 0,25 мг/мл БСА, 20 мМ β -гліцерофосфат), 3 мкл розчину субстрату MBP (5 мг/мл (природний основний білок мієліну, отриманий з бика, #13-104, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази ASK1 (0,1 мкг/мл (#314-606M, Millipore, США)), 10,7 мкл дистильованої води. Час інкубації становив 25 хв при 30°C .

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази JNK3. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 10^x кратного реакційного буфера для JNK3 (25 мМ Тріс-НСІ; рН 7,5, 5 мМ ЕГТА, 1% β -меркаптоетанол), 0,7 мкл розчину пептидного субстрату ATF2 (5 мг/мл, амінокислотні залишки 19-96 (#12-367, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази JNK3 (1 мкг/мл (#14-501, Millipore, США)), 13 мкл води. Час інкубації становив 25 хв при 30°C .

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази Aurora A. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5^x кратного реакційного буфера для Aurora A (75 мМ МОПС; рН 7,1, 1,25 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,05% β-меркаптоетанол, 0,015% Брідж 35 (поліоксиетиленлауриновий ефір)), 3 мкл розчину пептидного субстрату Kemptide (1,4 мг/мл (LRRASLG, #12-257, Millipore, США)), 0,0225 мкл розчину протеїнкінази Aurora A (0,2 мкг/мл, (#14-511, Millipore, США)), 11 мкл води. Час інкубації становив 20 хв при 30° С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази ROCK1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5^x кратного реакційного буфера для ROCK1 (40 мМ МОПС; рН 7,0, 1 мМ ЕДТА), 1,4 мкл розчину пептидного субстрату Long S6 Kinase substrate (1,96 мг/мл (синтетичний, 36 С-кінцевих амінокислот, #12-420, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази ROCK1 (1 мкг/мл (#14-601, Millipore, США)), 12,3 мкл води. Час інкубації становив 30 хв при 30° С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази FGFR1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5^x кратного реакційного буфера для FGFR1 (50 мМ МОПС; рН 7,1, 1 мМ ЕДТА, 1 мг/мл БСА, 0,1% β-меркаптоетанол, 0,01% Брідж 35, 0,5 мМ Na₃VO₄), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату IGR-IRtide (4 мг/мл (#12-527, Millipore, США)), 0,01 мкл розчину протеїнкінази FGFR1 (0,2 мкг/мл (#14-582, Millipore, США)), 11,5 мкл води. Час інкубації становив 25 хв при 30° С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази c-MET. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5^x кратного реакційного буфера для c-MET (50 мМ МОПС; рН 7,1, 0,6 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 1 мМ Na₃VO₄, 25 мМ β-гліцерофосфат, 0,05 % β-меркаптоетанол), 3 мкл розчину пептидного субстрату (4 мг/мл, KKKSPGEYVNIEFG, (#12-527, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази c-MET (1 мкг/мл (#14-526, Millipore, США)), 10,7 мкл води. Час інкубації становив 30 хв при 30° С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази Tie2. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 5 мкл 5^x кратного реакційного буфера для Tie2 (50 мМ МОПС/NaOH; pH 7,0, 1 мМ ЕДТА), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату Poly(Glu₄-Tyr) (1 мг/мл (#12-440, Millipore, США)), 1,25 мкл 10 мМ MnCl₂, 2,5 мкл розчину протеїнкінази Tie2 (35,8-71,5 нг (#14-540, Millipore, США)), 10 мкл дистильованої води. Час інкубації становив 10 хв при 30° С.

2.2.4. Визначення ензиматичної активності рекомбінантних білків СК2α та СК2α' каталітичних субодиниць. Активність отриманих рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 було перевірено за допомогою методу із використанням [γ-³²P]АТФ [151].

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 3 мкл 10^x буфера для СК2 (20 мМ Тріс-НСl, pH 7,5; 50 мМ КСl; 10 мМ MgCl₂); 3 мкл (6 мкг) пептидного субстрату RRRDDDSDDD (#6012, New England Biolabs, Великобританія); 14 мкл дистильованої води. Аліквоти реакційної суміші 20 мкл/пробу поміщали в епіндорфи об'ємом 1,5 мл (в перший епіндорф було додано 40 мкл реакційної суміші). В першу пробу вносили 1 мкл (0,5 мкг/мкл) рекомбінантного білка каталітичної субодиниці СК2α або 0,5 мкл (0,5 мкг/мкл) рекомбінантного білка каталітичної субодиниці СК2α' та розтитровували методом двократних розведень 10 разів. Для ініціації реакції до кожної пробірки додавали попередньо приготовану суміш, що складалася з 10 мкл 150 мМ АТФ та 0,01 мкл [γ-³²P]АТФ, з активністю 10 мСі/мМ/мл, тобто 100 мкСі/реакцію. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Після інкубації, що тривала 25 хв при 30° С реакцію зупиняли додаючи 8 мкл 5 % розчину орто-фосфорної кислоти, після чого реакційна суміш наносилась на 20 мм диск фосфоцелюлозного паперу (Whatman). Диски відмивали тричі з використанням 0,75 % розчину орто-фосфорної кислоти та просушували при кімнатній температурі. Рівень радіоактивного сигналу вимірювали в сцинтиляційній рідині, використовуючи лічильник Tricarb 2800 TR (PerkinElmer, США). Як негативний контроль, використовували пробу, що не містила рекомбінантний білок.

Активність ензиму визначали шляхом вимірювання ступеня фосфорилування субстрату каталітичною субодиницею (вимірювали інтенсивність радіоактивного сигналу включення [γ - ^{32}P]АТФ в молекулі АТФ в субстрат, показник CPS) за різних концентрацій білка. За отриманими даними будували титрувальні криві. Ту кількість білка, яка відповідала середньому значенню перегину кривої обирали оптимальною для використання в подальших біологічних дослідженнях.

Біохімічний скринінг сполук *in vitro* та визначення залишкової активності протеїнкіназ при додаванні 10 мкМ інгібітору в суміш для проведення реакції здійснювали в двох повторах. Значення показників IC_{50} та K_i розраховували за результатами трьох незалежних експериментів. В результатах роботи представлено середнє арифметичне значення розрахованих величин. Відхилення від середнього значення становило не більше 15 %.

2.3. Одержання рекомбінантних білків SK2 α та SK2 α' каталітичних субодиниць

2.3.1. Одержання рекомбінантного білка SK2 α . Для ампліфікації нуклеотидної послідовності, що кодує каталітичну субодиницю SK2 α використовували плазмиду pCDNA4/TO з вбудованим у неї клоном кДНК SK2 α людини (отриману від Dr. Ivan Gut, LICR London) та пару олігонуклеотидних праймерів: 1) Forward 5`- CAT GGA TCC CAT ATG TCG GGA CCC GTG CCA AGC AGG-3` та Reverse 5`- CATA AAGCTTA CTG CTG AGC GCC AGC GGC AG -3`, послідовності яких містили сайти рестрикції NdeI та HindIII. ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері Perkin Elmer (Cetus, США) з використанням нативної форми Pfu полімерази (#EP0571, Fermentas, Литва) та dNTPs (#R0241, Fermentas, Литва), за режиму 5 хв при 94° С, 31 цикл (45 с при 94° С, 30 с при 56° С, 150 с при 72° С), 7 хв при 72° С.

ПЛР-продукт (вставку) очищували на мініколонці та обробляли ендонуклеазами рестрикції NdeI (#FD0583, Fermentas, Литва) та HindIII (#FD0504, Fermentas, Литва). Відповідними ресриктазами обробляли вектор pET-28a. Отримані продукти рестрикції наносили на фореуз та виділяли ДНК вектора і вставки за допомогою набору для виділення ДНК з гелю (#20021, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN, ФРН).

Очищені фрагменти лігували у співвідношенні вектор:вставка – 1:5 протягом 3 год при температурі 23° С. Продукти лігазної реакції трансформували в клітини *E. coli* XL1. Відбір клонів проводили на твердому живильному селективному середовищі LB із додаванням антибіотику канаміцину. З отриманих після трансформації клонів виділяли плазмиду за допомогою методу лужного лізису [183].

Наявність вставки СК2 α у рекомбінантних клонів підтверджували рестрикцією ендонуклеазами HindIII і NdeI та характеристичною рестрикцією ендонуклеазами HincII (#FD0494, Fermentas, Литва) та XhoI (#FD0694, Fermentas, Литва), сайти яких наявні у вставці кДНК СК2 α .

Рекомбінантний білок, який здатна експресувати отримана конструкція, містив на N-кінці додаткові 20 амінокислот (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH), до яких входив His-tag (розрахована вага рекомбінантного білка складає 47 306 кДа). Із клонів, що містили фрагменти, які відповідали за розміром цільовій послідовності, виділяли плазмиду, якою трансформували компетентні клітини *E. coli* BL21 Rosetta (DE3). Їх селекцію проводили на чашках Петрі з твердим живильним середовищем, що містило селективні антибіотики (канаміцин та хлорамфенікол). Отримані клони культивували при 30° С на рідкому середовищі LB, до якого для індукції експресії білка додавали 0,5 мМ ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду (ІПТГ). З індукованих культур клітин отримували лізати та аналізували їх на наявність очікуваного рекомбінантного білка методом електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) за методом Lamely [184].

Клітини штаму-продуцента нарощували при 37° С на живильному середовищі LB з додаванням селективного антибіотика (канаміцин та хлорамфенікол) до $A_{600} = 0,5-1,0$, далі вносили індуктор експресії (ПТТГ) в такій кількості, щоб його кінцева концентрація в суміші становила 0,5 мМ. Інкубація тривала 16 год при 30° С. Після цього клітини осаджували центрифугуванням (10 000 g, 15 хв при +4° С), осад ресуспендували в лізуючому буфері А (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris, рН 7,5, 1 мМ β-меркаптоетанол), об'єм якого становив 1/70 від об'єму культури, та заморожували. Заморожені клітини розморожували на льоду, додаючи ще 1/70 буфера А з лізоцимом (кінцева концентрація становила 20 мкг/мл) та фенілметансульфонілфлуорид (ФМСФ, кінцева концентрація становила 2 мМ). Після 20 хв інкубації при +4° С суспензію обробляли ультразвуковим дезінтегратором Labsonic (Sartorius, ФРН). Фракцію розчинних білків, що містила цільовий продукт, відокремлювали від нерозчинної за допомогою центрифугування (20 500 g протягом 20 хв при +4° С) та визначали концентрацію тотального білка в лізаті по Бредфорду [165].

Рекомбінантний білок СК2α очищували методом хроматографії на сорбенті металосефарози (#635501, TALON® Metal Affinity Resins, Clontech Laboratories, Inc., США). Очистку проводили методом «batch» хроматографії [185]. Лізат додавали до сорбенту (з розрахунку 40 мкл сорбенту на 1 мл лізату) і інкубували 2 год при 4° С, при постійному перемішуванні (на роторі). Потім сефарозу зі зв'язаним білком відмивали двічі буфером А та двічі буфером Б, інвертуючи на роторі протягом 5 хв, між промивками препарат центрифугували при 3000 g протягом 45 с. Елюцію здійснювали за допомогою буфера, що складався з 300 мМ NaCl, 350 мМ імідазолу та 50 мМ Tris-HCl рН 7,5.

Отриманий білок діалізували від імідазолу в діалізному мішку протягом 16 год в буфері (350 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl рН 7,5, 1 мМ Na₂EDTA, 2 мМ ДТТ та 0,1% Triton X-100). Концентрацію очищеного білка визначали по Бредфорду [186], чистоту оцінювали за допомогою електрофорезу в 10%-му ПААГ візуально.

2.3.2. Одержання рекомбінантного білка СК2α'. Для ампліфікації нуклеотидної послідовності, що кодує каталітичну субодиницю СК2α'

(розрахована вага рекомбінантного білка складає 43 749 кДа), використовували плазмиду pCDNA4/TO з вбудованим в неї клоном кДНК СК2 α ' людини (отриману від Dr. Ivan Gut, LICR London) та пару олігонуклеотидних праймерів: 1) Forward 5`-CAT GGA TCC CAT ATG CCC GGC CCG GCC GCG GGC AG -3` та Reverse 5`-CA TAA AGC TTA TCG TGC TGC CGT GAG ACC ACT GGA A -3`, послідовності яких містили сайти рестрикції NdeI та HindIII. ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері Perkin Elmer (Cetus, США) з використанням нативної форми Pfu полімерази та dNTPs за режиму 10 хв при 95° С, 31 цикл (40 с при 94° С, 35 с при 55,5° С, 120 с при 71,5° С), 7 хв при 72° С.

Виділення ДНК вектора і вставки проводили за методикою, яка була описана раніше для каталітичної субодиниці СК2 α . Рекомбінантний білок містив на N-кінці додаткові 20 амінокислот (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH), до яких входив His-tag.

Виділені фрагменти лігували в молярному співвідношенні вектор:вставка 1:3 протягом 3 год при температурі 23° С. Отриманою конструкцією трансформували клітини *E. coli* XL1. Із отриманих після трансформації клонів виділяли плазмиду, як описано для каталітичної субодиниці СК2 α .

Рекомбінантний білок СК2 α ' отримували та очищували за процедурою аналогічною для СК2 α .

РОЗДІЛ 3

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПОХІДНИХ 3,4,5,6-ТЕТРАГІДРОТІОПІРАНО[2,3-D]ТІАЗОЛУ ЯК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 проводили рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторних бібліотек низькомолекулярних органічних сполук різних хімічних класів (150 000 шт.) за допомогою методу гнучкого докінгу. Докінг сполук було здійснено в АТФ-зв'язувальну кишеню каталітичної субодиниці протеїнкінази СК2 людини (Protein Data Bank ID: 1JWH_A).

Комплекси сполук із СК2, отримані за допомогою програми DOCK 4.0, було проаналізовано за показниками енергії зв'язування ліганду з рецептором та оцінено візуально. Для подальших досліджень обирали сполуки, які мали найменшу енергію взаємодії з СК2 (< -35 кДж/моль) і були комплементарними до активної кишені ензиму (мали гідрофобні контакти та низку водневих зв'язків із ключовими амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту СК2).

Серед відібраних за результатами докінгу сполук були сім похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу (загальна хімічна структура сполук подана на рис. 3.1). Відомо, що сполуки з цього класу мають різнопланову фармакологічну активність та значний протипухлинний потенціал [187]. Дані про пригнічення протеїнкіназної активності СК2 цими сполуками нині відсутні.

Здатність похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу пригнічувати активність протеїнкінази СК2 визначали *in vitro* за допомогою методу непрямой детекції протеїнкіназної активності (люциферазна реакція) [152].

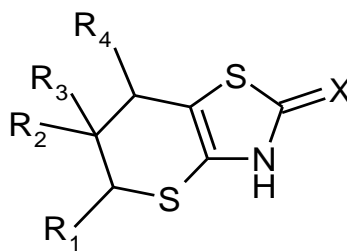
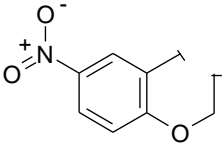
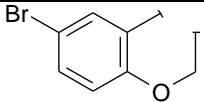
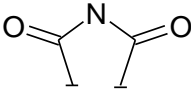
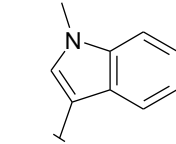
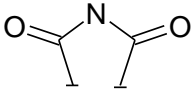
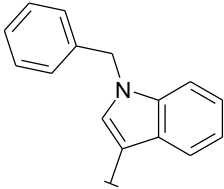
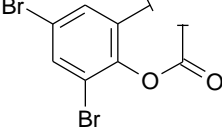
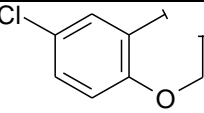
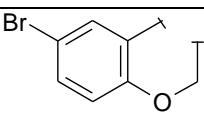


Рис. 3.1. Загальна хімічна структура семи похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, які були ідентифіковані за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу

За допомогою біохімічних тестів (результати експерименту подано в табл. 3.1) було встановлено, що всі відібрані похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу пригнічують активність протеїнкінази СК2. Показник IC_{50} протестованих сполук знаходиться в межах 0,2-24,5 мкМ. Найактивнішою є сполука ТТТ5 – 8,10-дибромо-2,6-диоксо-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-7-оксо-1,4-дитіо-3-аза-циклопента[с]фенантрен-5-карбонова кислота ($IC_{50} = 0,2$ мкМ).

Проведений аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу показав, що найбільший вплив на активність сполук мають замісники, які збільшують загальний розмір молекули. При порівнянні активності інгібіторів ТТТ3 і ТТТ4 видно, що заміна метильного залишку в індольному гетероциклі на бензил, зменшує активність сполуки ТТТ4 в 8 разів (показник IC_{50} сполук становить 3,1 мкМ та 24,5 мкМ, відповідно). Заміна атома Хлору в сполуці ТТТ6 на більший за розмірами атом Брому (сполука ТТТ7) також призводить до зменшення інгібувальної активності. Показник IC_{50} для цих інгібіторів становить 0,7 мкМ і 2,5 мкМ, відповідно. Проте, наявність додаткового метильного замісника в позиції 5а фенантренового гетероциклу сполуки ТТТ2 ($IC_{50} = 1,5$ мкМ), на відміну від ТТТ7 ($IC_{50} = 2,5$ мкМ), не має значного впливу на активність інгібітору.

Хімічні структури замісників похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ , мкМ
TTT1	S	H	H			1
TTT2	O	H	CH ₃			1,5
TTT3	O			H		3,1
TTT4	O			H		24,5
TTT5	O	COOH	H			0,2
TTT6	O	H	H			0,7
TTT7	O	H	H			2,5

З метою з'ясування впливу окремих замісників на активність похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, було побудовано їх комплекси з рецептором за допомогою методу молекулярного докінгу (рис. 3.2). Аналіз цих комплексів *in silico* показав, що стабілізації сполук в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 сприяє низка гідрофобних контактів і водневих зв'язків. Гідрофобні взаємодії виникають між лігандом і амінокислотними залишками Val53, Val66, Met163, Ile174 та Phe113. Варто зазначити, що контакт із Phe113 реалізується за

типом стекінг-взаємодії. Також всі досліджувані сполуки утворюють водневий зв'язок із Lys68, що знаходиться в глибині сайту зв'язування. За літературними даними, формування водневого зв'язку з цією амінокислотою є однією з передумов прояву інгібувальної активності сполук [5]. В досліджуваних нами комплексах зв'язок утворюється між атомом Оксигену карбонільної групи гетероциклу лігандів або атома Сульфуру (сполука ТТТ1) та атомом Нітрогену бічного ланцюга Lys68.

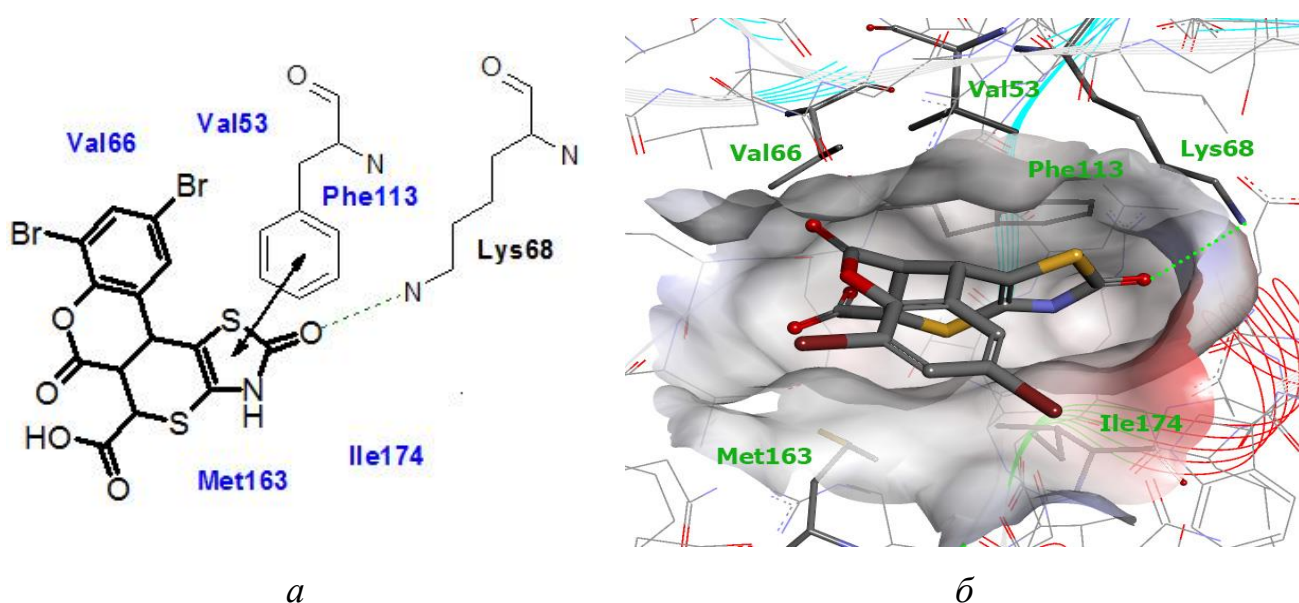


Рис. 3.2. Інгібітор ТТТ5 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «ТТТ5 - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

Сполуки ТТТ3 і ТТТ4 формують додатковий водневий зв'язок за участі атомів Нітрогену піролатіопіранотіазолового гетероциклу та Оксигену

карбоксылної групи амінокислотного залишку Leu45. Незважаючи на це, ці два інгібітори продемонстрували найменшу інгібувальну активність щодо СК2. Цей факт можна пояснити іншим положенням цих сполук в АТФ-зв'язувальному сайті протеїнкінази, що призводить до порушення гідрофобних контактів між інгібіторами ТТТ3 і ТТТ4 та амінокислотними залишками Met163 і Val66 і, як наслідок, до зникнення стекінг-взаємодії з Phe113.

Найкращу інгібувальну активність сполуки ТТТ5, ймовірно, можна пояснити тим, що цей інгібітор має більшу афінність до активного сайту протеїнкінази СК2 завдяки двом атомам Бромю.

Отже, важливою умовою для прояву високої інгібувальної активності похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу є формування гідрофобних контактів з унікальними амінокислотними залишками Val66, Met163 та Ile174, які відповідають за розмір АТФ-акцепторного сайту СК2 і відіграють важливу роль при зв'язуванні ліганду з рецептором [8]. Додатковій стабілізації комплексів «інгібітор - ензим» сприяє стекінг-взаємодія з Phe113.

Висновки:

1. Ідентифіковано та досліджено сім нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу. Показник IC_{50} найактивнішої сполуки ТТТ5 становить 0,2 мкМ;

2. Запропоновано модель взаємодії ідентифікованих похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу з активним сайтом протеїнкінази СК2, яка пояснює вплив замісників на активність інгібіторів. Показано, що найбільш важливими взаємодіями для прояву інгібувальної активності сполук з цього класу є їх гідрофобні контакти з унікальними амінокислотними залишками Val66, Met163 і Ile174 та стекінг-взаємодія з Phe113. Здобуті результати можуть бути основою для подальшого пошуку та розробки низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед структурних аналогів 3,4,5,6-тетрагідротіопірано-[2,3-d]тіазолу.

Основні результати розділу опубліковано в праці:

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 // Ukr. Bioorg. Acta – 2012. – Т. 10, №2. – С. 25-29.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ ФЛАВОНУ

Флавоноїди є природними низько-токсичними речовинами з широким спектром біологічної активності [188]. Відомо, що сполуки з цього класу проявляють антиоксидантну [189], протизапальну [190], протівірусну [191] та антимуtagenну [192] дії.

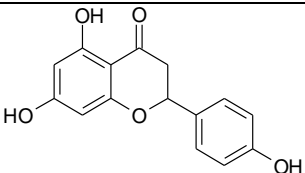
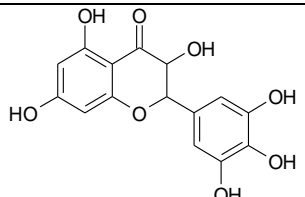
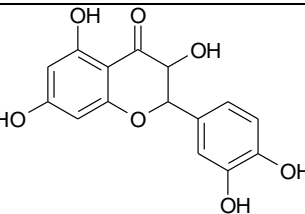
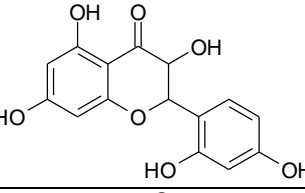
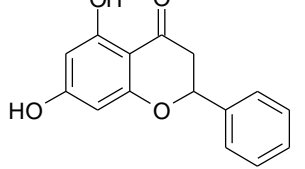
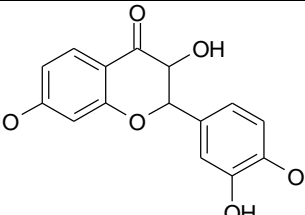
Серед похідних флавону є сполуки, які пригнічують активність протеїнкази СК2 (табл. 4.1) [13]. До них відносяться: апігенін, кверцетин, мірецетин, хризин, морин тощо. Найбільш активним інгібітором СК2 серед флавоноїдів є фізетин ($IC_{50} = 0,35$ мкМ). Цікаво, що в експериментах з мутантною СК2 (Val66Ala), показник IC_{50} для фізетину та кверцетину залишався незмінним, тоді як для хризину, морину та апігеніну – зростав у кілька разів. Грунтуючись на цих даних, Н. Edziri з колегами [193] висунув припущення, що завдяки своїй поліфенольній структурі похідні флавону здатні по різному орієнтуватися в активному сайті протеїнкази СК2.

За допомогою аналізу взаємозв'язку між хімічною структурою та інгібувальною активністю природних інгібіторів СК2 на основі похідних флавону (табл. 4.1) було встановлено, що найбільше на їх здатність пригнічувати активність цієї протеїнкази впливає кількість та положення гідроксильних груп в структурі сполуки. Наприклад, хімічна структура кверцетину відрізняється від апігеніну наявністю двох додаткових залишків гідроксилу в позиціях 3 та 3', що і обумовлюють його вищу інгібувальну активність. Однак, більша кількість гідроксильних груп як, наприклад, в мірецетину (додаткова група в позиції 5') призводить до незначного зменшення показника IC_{50} . Хризин та морин мають в 10 разів меншу активність, порівняно з апігеніном та кверцетином, що можна

пояснити відсутністю гідроксильної групи в 2-й позиції (хризин) і присутністю 2'-ОН групи (морин).

Таблиця 4.1

Хімічні структури похідних флавону, які пригнічують активність протеїнкінази СК2 та їх IC₅₀ (мкМ)

Структура інгібітору	Назва інгібітору	IC ₅₀ , мкМ
	4',5,7-тригідроксифлавіон (апігенін)	0,8
	3,3',4',5,5',7-гексагідроксифлавіон (мірицетин)	0,92
	3,3',4',5,7-пентагідроксифлавіон (кверцетин)	0,55
	2',3,4',5,7-пентагідроксифлавіон (морин)	10,0
	5,7-дигідроксифлавіон (хризин)	9,0
	3,3',4',7-тетрагідроксифлавіон (фізетин)	0,35

Описані вище інгібітори на основі похідних флавону є природними сполуками та, окрім СК2, ефективно взаємодіють із великою кількістю інших білків. Наприклад, кверцетин є відомим інгібітором РІЗ кінази (IC₅₀ = 3,8 мкМ) та

фосфоліпази A2 ($IC_{50} = 2 \text{ мкМ}$). Тому, в цій роботі увагу було приділено синтетичним похідним флавану, структуру яких змінювали в ході хімічної оптимізації з метою збільшення активності і селективності сполук щодо СК2.

4.1. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 4'-гідроксифлавану

4.1.1. Ідентифікація та визначення інгібувальної активності похідних флавану. Похідні флавану (загальну структуру сполук наведено на рис. 4.1), разом з іншими перспективними інгібіторами протеїнкінази СК2, було ідентифіковано в ході рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу комбінаторних бібліотек. Докінг сполук проводився в АТФ-зв'язувальну кишеню каталітичної субодиниці СК2 (PDB ID: 1JWH_A).

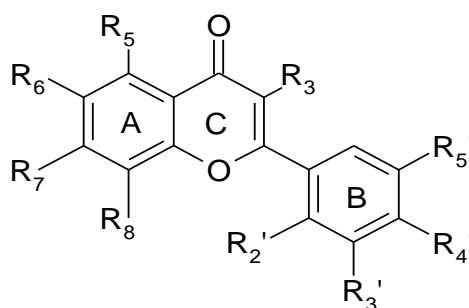


Рис. 4.1. Загальна хімічна структура 49-ти похідних флавану, які були ідентифіковані за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу

Сорок девять сполук, які мали найкращі показники енергії зв'язування та були комплементарними до активної кишені ензиму, було відібрано для біохімічного скринінгу *in vitro* з використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. Для сполук, які при концентрації 30 мкМ пригнічували активність СК2 більше ніж на 80 % визначали IC_{50} (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Хімічні структури замісників похідних флавону та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників									IC ₅₀ , мкМ
	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FNH1	H	H	OCH ₃	H	OAc	H	H	H	H	>30
FNH2	H	H	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	H	H	>30
FNH3	H	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H	30
FNH4	H	H	OCH ₃	H	H	H	OAc	H	H	>30
FNH5	H	H	Br	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH6	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	CH ₃	H	H	>30
FNH7	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H	CH ₃	H	CH ₃	H	>30
FNH8	H	H	N(CH ₃) ₂	H	OH	H	H	H	H	>30
FNH9	H	H	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H	>30
FNH10	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H	>30
FNH11	H	H	F	H	H	H	H	H	H	>30
FNH12	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H	H	0,8
FNH13	H	OEt	OH	H	H	H	H	H	H	7,5
FNH14	H	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH15	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	H	H	>30
FNH16	H	OEt	OH	H	H	H	CH ₃	H	H	8

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FNH17	H	H	Cl	H	OH	H	CH ₃	H	H	23
FNH18	H	H	F	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH19	H	H	Me	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH20	H	H	i-Pr	H	OH	H	CH ₃	H	H	26
FNH21	OH	H	H	Br	OH	H	CH ₃	H	H	28
FNH22	H	H	OCH ₃	H	OH	H	CH ₃	H	H	28
FNH23	H	OCH ₃	H	H	OH	H	CH ₃	H	H	25
FNH24	H	H	OEt	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH25	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH26	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH27	H	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	21
FNH28	H	OCH ₃	OH	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	0,1
FNH29	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	>30
FNH30	H	Br	H	H	H	H	OH	H	H	19
FNH31	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	H	26
FNH32	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	H	>30
FNH33	H	H	H	H	OCH ₂ COMорфолін	H	CH ₃	H	H	>30
FNH34	H	H	CH ₃	H	OCH ₂ COOH	H	CH ₃	H	H	>30

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FNH35	H	H	OCH ₃	H	OCH ₂ COOH	H	CH ₃	H	H	>30
FNH36	H	H	CH ₃	H	H	H	OH	H	H	19
FNH37	H	H	CH ₃	H	OCH ₂ COMорфолін	H	H	H	H	>30
FNH38	Cl	H	H	H	OCH ₂ COMорфолін	H	H	H	H	>30
FNH39	H	H	CH ₃	H	OCH ₂ COOH	H	CH ₃	H	CH ₃	28
FNH40	H	H	OCH ₃	H	OSOCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	28
FNH41	H	H	OCH ₃	H	OCO(1,4-бензоди оксан-2-іл)	CH ₃	H	CH ₃	H	21
FNH42	H	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ NCH ₃ Бензил	OH	H	H	>30
FNH43	H	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ (4-CH ₃ -1-піперидил)	OH	H	H	>30
FNH44	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂ (4-Et-1-Піперазиніл)	OH	H	H	>30
FNH45	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂ NCH ₃ Бензил	OH	H	H	>30
FNH46	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂ (1-Піперидил)	OH	H	H	>30
FNH47	H	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ Морфолін	OH	H	H	>30
FNH48	H	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ N(2-фурфурил)CH ₂ O		H	H	12
FNH49	H	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ N(3-трифлуоро метилфеніл)CH ₂ O		H	H	15

В результаті біохімічних тестів було встановлено, що 19 з 49 протестованих похідних флавону пригнічують активність протеїнкінази СК2 при концентрації менше ніж 30 мкМ. Найактивнішими виявились сполуки, які містять в 4' позиції гідроксильну групу (FNH12, FNH13, FNH16 та FNH28). При цьому, інгібітор FNH28 (2-(4-гідрокси-3-метокси-феніл)-6,8-диметил-хромен-4-он, $IC_{50} = 0,1$ мкМ) пригнічував активність ензиму в 3 рази краще, ніж фізетин (найактивніший флавоновий інгібітор СК2 природного походження). Варто зауважити, що відсутність поліфенольної структури, типової для природних флавонів, передбачає, що ідентифіковані інгібітори можуть мати більшу селективність щодо протеїнкінази СК2.

4.1.2. Оптимізація похідних флавону. Оптимізація ідентифікованих похідних флавону проводилася з урахуванням даних, отриманих в результаті біохімічного тестування та при вивченні міжмолекулярних взаємодій, які відповідають за зв'язування інгібіторів із амінокислотними залишками активного сайту рецептора. Для вироблення рекомендацій щодо хімічної оптимізації було розроблено модель взаємодії досліджених сполук із АТФ-акцепторною кишенню СК2 (рис. 4.2).

Встановлено, що всі досліджувані похідні флавону є комплементарними до АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази СК2. Значний внесок у стабілізацію комплексів вносять гідрофобні контакти, які виникають між лігандами та 7-ма амінокислотними залишками (Leu45, Val53, Val66, Ile 95, Phe113, Met163 та Ile174). Взаємодія кільця В флавону з Phe113 є особливо важливою, оскільки контакт із цією амінокислотою реалізується за типом стекінг-взаємодії, яка відіграє значну роль у фіксації інгібітору в активному сайті ензиму. Іншими ключовими взаємодіями, які сприяють фіксації інгібіторів в АТФ-акцепторному сайті СК2, є два міжмолекулярні водневі зв'язки. Перший з них утворюється між карбонільною групою ліганду та амінокислотним залишком Val116, який знаходиться в шарнірній ділянці АТФ-зв'язувальної кишені. Формування водневих зв'язків із цією ділянкою є типовим для більшості інгібіторів протеїнкіназ. Цей факт було підтверджено даними, отриманими за допомогою

рентгеноструктурного аналізу [53]. Другий водневий зв'язок формується між гідроксильною групою кільця В флавору та Lys68, що розташований в глибині активного сайту. Також сполуки завдяки 4'-гідроксильній групі ліганда можуть формувати додатковий водневий зв'язок з атомом Нітрогену головного ланцюга Asp175. Ця взаємодія можлива за умови сприятливої локалізації донора та акцептора водню (відстань між відповідними атомами Нітрогену та Оксигену в комплексі «FNH28 - СК2» становить 3,38 Å).

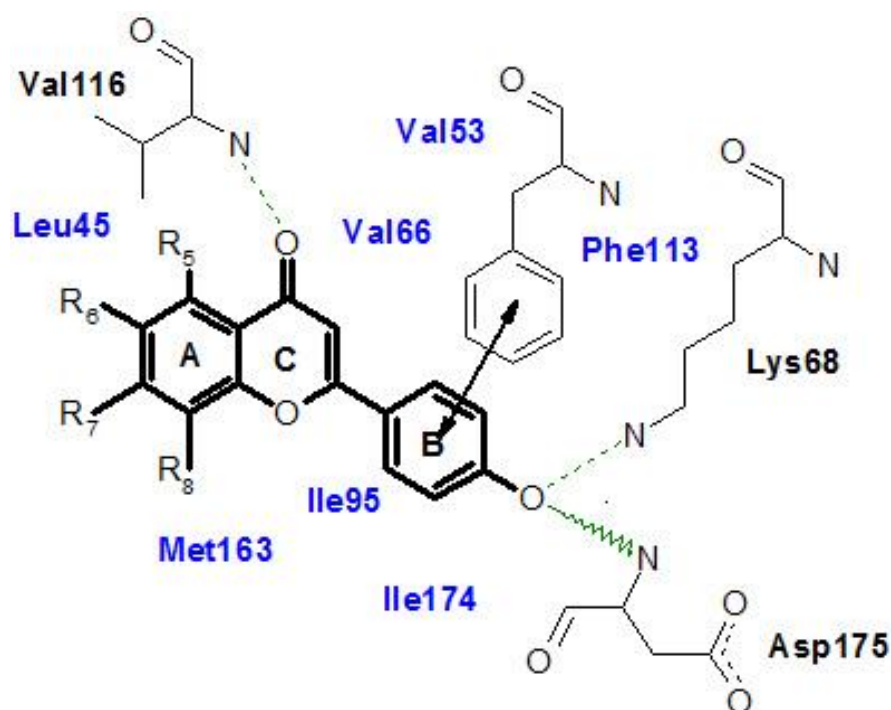


Рис. 4.2. Модель взаємодії похідних флавору з АТФ-зв'язувальним сайтом ензиму. Синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів, чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки. Стекінг-взаємодію з Phe113 позначено стрілкою, водневі зв'язки – зеленою пунктирною лінією, ймовірний водневий зв'язок з головним ланцюгом Asp175 – зеленою зигзагоподібною лінією

Запропонована модель зв'язування похідних флавору з АТФ-акцепторним сайтом СК2 (рис. 4.2) добре корелює з результатами тестів *in vitro* та пояснює вплив окремих замісників на інгібувальні властивості сполук. Однак, залишається

неоднозначним, яка з гідроксильних груп (в 3' чи 4' позиції) є переважною для подальшої оптимізації, оскільки формування водневого зв'язку з Lys68 є можливим в обох випадках. Також остаточно не зрозумілою залишається роль замісників, які розташовані поруч із цією гідроксильною групою. Для з'ясування цього питання, було одержано і протестовано *in vitro* сполуки FNH50 - FNH55, загальну хімічну структуру яких наведено на рис. 4.3.

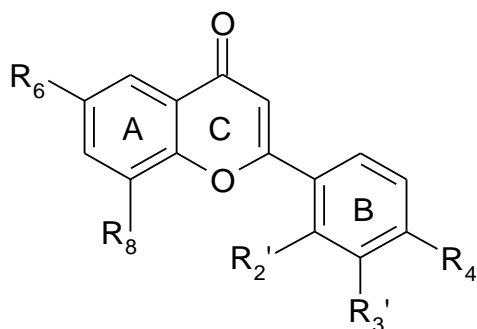


Рис. 4.3. Загальна хімічна структура розроблених похідних гідроксифлавоноу

В табл. 4.3 представлено структуру замісників похідних гідроксифлавоноу та результати біохімічних тестів *in vitro*.

Таблиця 4.3

Хімічні структури замісників похідних гідроксифлавоноу та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників					IC ₅₀ , мкМ
	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₆	R ₈	
FNH50	H	OH	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	>30
FNH51	OH	OCH ₃	H	CH ₃	CH ₃	>30
FNH52	H	OH	H	CH ₃	CH ₃	2,2
FNH53	H	H	OH	CH ₃	CH ₃	1,6
FNH54	H	H	OH	CH ₃	H	8
FNH55	H	OH	OH	CH ₃	CH ₃	0,45

Як видно з представлених в табл. 4.3 результатів, сполука FNH53, яка містить 4'-гідроксильну групу є дещо активнішою за сполуку FNH52, яка має ОН-групу в позиції 3' ($IC_{50} = 1,6$ мкМ та $2,2$ мкМ, відповідно). В той час, інгібувальна активність 3',4'-дигідроксифлаону FNH55 ($IC_{50} = 0,45$ мкМ) виявилася значно вищою, порівняно з обома попередніми сполуками. Цей факт можна пояснити здатністю цього інгібітору формувати міжмолекулярні водневі зв'язки одночасно з амінокислотними залишками Lys68 та Asp175, які локалізовані в глибині активного сайту протеїнкінази СК2. Крім цього, гідроксильні групи сполуки FNH55, що знаходяться в *орто*-положенні (R_3' та R_4' позиції), збільшують кислотність одна одної, утворюючи негативно заряджений кластер, який може сприяти електростатичному притяганням ліганда та позитивно зарядженої аміногрупи бічного ланцюга Lys68.

Присутність метоксигрупи (в позиції 3') поряд з 4'-гідроксильною групою також призводить до покращення активності похідних флавону (IC_{50} для сполук FNH28 та FNH53 становить $0,1$ мкМ та $1,6$ мкМ, відповідно). Однак, наявність більших за розмірами замісників у цій позиції значно зменшує активність інгібіторів (сполука FNH12, $IC_{50} = 0,8$ мкМ; сполука FNH13, $IC_{50} = 7,5$ мкМ), що є, скоріше за все, наслідком виникнення стеричних перешкод при зв'язуванні лігандів з амінокислотними залишками активного сайту СК2. Цікаво, що присутність метоксигрупи в 4' позиції призводить до повної деактивації інгібіторів, що видно на прикладі сполук FNH52 ($IC_{50} = 2,2$ мкМ) та FNH50 ($IC_{50} > 30$ мкМ).

Замісники в кільці А також мають значний вплив на активність досліджуваних похідних флавону. Наприклад, сполука FNH28 ($IC_{50} = 0,1$ мкМ), яка містить метильні групи в 6-й та 8-й позиціях, порівняно з сполукою FNH12 ($IC_{50} = 0,8$ мкМ), в якій R^6 та $R^8 = H$, є в 8 разів активнішою. Ймовірно, метильні замісники створюють додаткові гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val53 та Asn118 активного сайту протеїнкінази СК2, що і призводить до збільшення інгібувальної активності сполук, які їх містять.

Отже, враховуючи отримані залежності, було вирішено оптимізувати структуру 4'-гідроксифлавону (рис. 4.4). При цьому, з метою покращення афінності лігандів до АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази СК2, в кільце А флавону вводили додаткові гідрофобні замісники. Також було проведено підбір замісників в кільці В для збільшення його гідрофобності та підсилення кислотних властивостей 4'-гідроксильної групи. Проте, в останньому випадку зважали на те, що об'ємні замісники є недоречними, тоді як введення електрон-віддаленої групи в *орто*-позицію до 4'-ОН групи має збільшувати кислотні властивості останньої і, як наслідок, призводити до збільшення ймовірності утворення водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68 за рахунок електростатичного притягання.

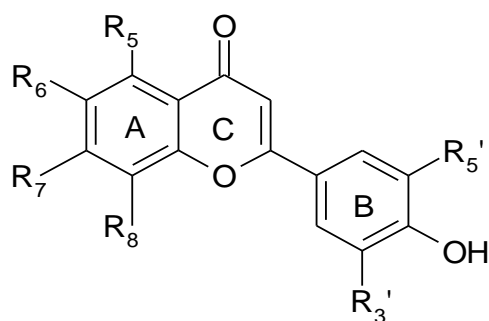


Рис. 4.4. Загальна хімічна структура розроблених похідних 4'-гідроксифлавону

Завдяки проведеній хімічній оптимізації, вдалося розробити 28 нових інгібіторів протеїнкінази СК2 (рис. 4.4, табл. 4.4), при цьому 26 з них пригнічують активність ензиму в субмікромольному діапазоні концентрацій. Найефективнішими інгібіторами є сполуки FNH68 ($IC_{50} = 0,01$ мкМ) – 6,8-дихлоро-2-(4-гідрокси-3-метокси-феніл)-хромен-4-он та FNH79 ($IC_{50} = 0,004$ мкМ) – 6,8-дибromo-2-(4-гідрокси-3-метокси-феніл)-хромен-4-он.

Хімічні структури замісників похідних 4'-гідроксифлавону та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників						IC ₅₀ , мкМ
	R ₃ '	R ₅ '	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	
FNH56	OCH ₃	H	H	OH	H	H	0,25
FNH57	OCH ₃	H	H	CH ₃	H	H	0,32
FNH58	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	0,20
FNH59	OCH ₃	H	H	Cl	H	H	0,24
FNH60	OCH ₃	H	H	Et	H	H	0,12
FNH61	OCH ₃	H	H	NAc	H	H	0,15
FNH62	OCH ₃	H	H	Br	H	H	0,12
FNH63	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	H	0,09
FNH64	OCH ₃	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃	0,09
FNH65	OCH ₃	Br	H	CH ₃	H	CH ₃	0,65
FNH66	OCH ₃	H	H	Cl	CH ₃	H	0,79
FNH67	OCH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	H	3
FNH68	OCH ₃	H	H	Cl	H	Cl	0,01
FNH69	OCH ₃	Cl	H	Cl	H	Cl	0,02
FNH70	NO ₂	H	H	CH ₃	H	CH ₃	0,012
FNH71	OCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	H	0,03
FNH72	OCH ₃	NO ₂	H	CH ₃	H	CH ₃	0,066
FNH73	Cl	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃	0,078
FNH74	Br	H	H	CH ₃	H	CH ₃	0,05
FNH75	Br	Br	H	CH ₃	H	CH ₃	0,18
FNH76	OCH ₃	H	H	Cl	H	CH ₃	0,04
FNH77	OCH ₃	H	H	H	C ₄ H ₄		0,028
FNH78	OCH ₃	Cl	H	Br	H	Br	0,018
FNH79	OCH ₃	H	H	Br	H	Br	0,004
FNH80	OCH ₃	Cl	H	H	C ₄ H ₄		0,087
FNH81	OCH ₃	H	CH ₃	Cl	CH ₃	H	2
FNH82	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₃	0,3
FNH83	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	0,175

Для встановлення механізму дії розроблених інгібіторів було проведено кінетичні дослідження і визначено константу інгібування (K_i). Експеримент проводили при різних концентраціях інгібітору та АТФ. Показник K_i визначали графічно (рис. 4.5). Отримані результати вказують на те, що сполуки FNN68 та FNN79 конкурують з молекулою АТФ за активний сайт СК2. Їх показник K_i становить 3,5 нМ та 1,8 нМ, відповідно.

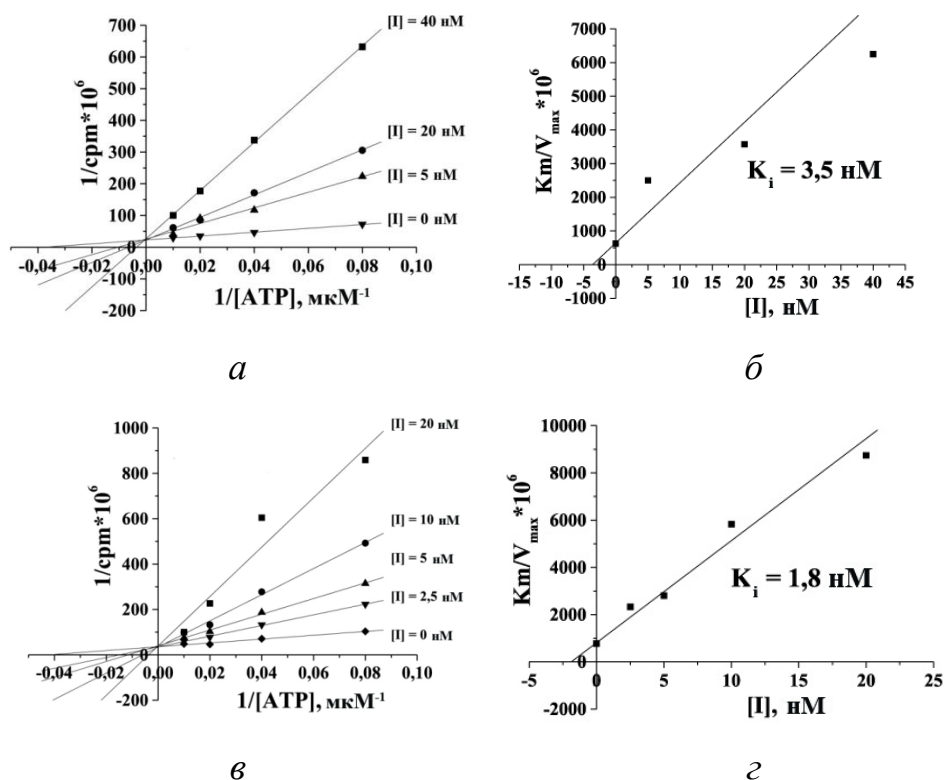


Рис. 4.5. Кінетичний аналіз утворення комплексів інгібіторів FNN68 та FNN79 з протеїнкіназою СК2. Показник K_i становить 3,5 нМ та 1,8 нМ, відповідно: а, в – визначення K_m і v_{max} в обернених координатах Лайнуївера-Берка. Концентрацію інгібітору змінювали від 0 нМ до 40 нМ (інгібітор FNN68) та від 0 нМ до 20 нМ (інгібітор FNN79); б, г – розрахунок значення K_i

4.1.3. Дослідження селективності похідних 4'-гідроксифлавону. Сполуки FNN76, FNN78, FNN79 та FNN68, які мають найбільшу інгібувальну активність, було протестовано *in vitro* з метою встановлення їх селективності щодо протеїнкінази СК2. Панель скринінгу включала чотири серин-треонінові (ASK1,

JNK3, Aurora A і ROCK1) та три тирозинові (FGFR1, c-Met і Tie2) протеїнкінази. В табл. 4.5 представлені дані залишкової активності ензимів при концентрації інгібіторів 10 мкМ.

Таблиця 4.5

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ

Інгібітор	CK2	ASK1	Jnk3	Aurora A	Rock1	FGFR1	c-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

Як видно з результатів експерименту, всі досліджувані інгібітори є селективними щодо CK2.

4.1.4. Аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 4'-гідроксифлавону та встановлення типу їх зв'язування з CK2. В результаті аналізу взаємозв'язку між хімічною структурою сполук та їх інгібувальною активністю було встановлено, що найбільше на здатність похідних 4'-гідроксифлавону пригнічувати активність протеїнкінази CK2 впливає ступінь гідрофобності замісників у 6-й та 8-й позиціях. У випадку з замісниками в 6-й позиції флавону, цю залежність можна представити у вигляді: Me < Cl ≤ MeO < NAc < Et ≤ Br. Наведені замісники відповідають інгібіторам FNH57, FNH59, FNH58, FNH61, FNH60 та FNH62, показник IC₅₀ яких становить 0,32 мкМ, 0,24 мкМ, 0,2 мкМ, 0,150 мкМ, 0,12 мкМ та 0,12 мкМ, відповідно. Заміна водню у 8-й позиції кільця А на метильну групу також позитивно впливає на інгібувальну активність похідних 4'-гідроксифлавону, що видно на прикладі сполук FNH57 (IC₅₀ = 0,32 мкМ) і FNH28 (IC₅₀ = 0,1 мкМ) та FNH59 (IC₅₀ = 0,24 мкМ) і FNH76 (IC₅₀ = 0,04 мкМ), відповідно. В свою чергу, присутність атома Хлору замість СН₃-групи чи атома Гідрогену, є більш сприятливою, що доводить сполука

FNH68 ($IC_{50} = 0,01$ мкМ). Чітка залежність активності інгібіторів від гідрофобності замісників R^6 та R^8 спостерігається в сполук FNH28, FNH68 та FNH79 (IC_{50} становить 0,1 мкМ, 0,01 мкМ та 0,004 мкМ, відповідно). Ця залежність має вигляд: Me < Cl < Br, відповідно.

При порівнянні структури замісників R^6 та R^7 похідних 4'-гідроксифлаону було показано, що 7-метокси заміщена сполука FNH83 ($IC_{50} = 0,175$ мкМ) має дещо кращу активність, ніж 6-метокси заміщена FNH58 ($IC_{50} = 0,2$ мкМ). Подібна ситуація спостерігається в сполук, в яких R^6 або $R^7 = CH_3$ (FNH57, $IC_{50} = 0,32$ мкМ та FNH63, $IC_{50} = 0,09$ мкМ). В свою чергу, активність 5,7-диметил заміщеного інгібітору FNH71 ($IC_{50} = 0,03$ мкМ) є вищою, ніж у 6,8-диметил заміщеного FNH28 ($IC_{50} = 0,1$ мкМ). Неочікувано низьке значення IC_{50} мали 6,7-дизаміщені флаволи (сполуки FNH66, $IC_{50} = 0,79$ мкМ та FNH67, $IC_{50} = 3$ мкМ) порівняно з 5,7- (FNH71, $IC_{50} = 0,03$ мкМ) та 6,8-дизаміщеними (FNH76, $IC_{50} = 0,04$ мкМ та FNH79, $IC_{50} = 0,004$ мкМ). Сполука FNH81, в якій R^5 та $R^7 = CH_3$ і $R^6 = Cl$, також не значно пригнічувала активність СК2 ($IC_{50} = 2$ мкМ).

При вивченні впливу замісників в 3' позиції кільця В на здатність похідних 4'-гідроксифлаону пригнічувати активність протеїнкінази СК2 було встановлено, що інгібувальна активність сполук зростає в ряду MeO < Br < NO₂ (показник IC_{50} для FNH28, FNH74 та FNH70 становить 0,1 мкМ, 0,05 мкМ та 0,012 мкМ, відповідно). Крім цього, ці замісники впливають на кислотність гідроксильної групи фенільного замісника, розташованої в *орто*-положенні по відношенню до них. Присутність замісників одночасно в 3' та 5' позиціях похідних 4'-гідроксифлаону призводить до незначного зменшення їх активності, що помітно в парах сполук FNH68 ($IC_{50} = 0,01$ мкМ) - FNH69 ($IC_{50} = 0,02$ мкМ), FNH74 ($IC_{50} = 0,05$ мкМ) - FNH75 ($IC_{50} = 0,18$ мкМ), FNH79 ($IC_{50} = 0,004$ мкМ) - FNH78 ($IC_{50} = 0,018$ мкМ). Це можна пояснити тим, що велика кількість різних груп у кільці В інгібіторів призводить до виникнення стеричних перешкод при їх зв'язуванні з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2.

Присутність гідроксильної і метокси груп в *орто*-положенні (позиції 3' та 4') по відношенню одна до одної є причиною прояву високої інгібувальної

активності похідних 4'-гідроксифлавону. Тоді як 3',4'-дигідрокси та 3',4'-диметокси заміщені похідні проявляють значно нижчу активність, що можна побачити на прикладі пар сполук FNH28 ($IC_{50} = 0,1 \text{ мкМ}$) - FNH55 ($IC_{50} = 0,45 \text{ мкМ}$) та FNH57 ($IC_{50} = 0,32 \text{ мкМ}$) - FNH15 ($IC_{50} > 30 \text{ мкМ}$).

За даними докінгу (рис. 4.6) всі активні похідні 4'-гідроксифлавону є комплементарними до АТФ-акцепторного сайту СК2 і мають подібний тип зв'язування до передбаченого в пункті 4.1.2 (рис. 4.2). Гідрофобні контакти виникають між лігандами та амінокислотними залишками Leu45, Val53, Val66, Ile95, Phe113, Met163 та Ile174. Водневі зв'язки утворюються між атомом Оксигену карбонільної групи гетероциклу лігандів і аміногрупою Val116 шарнірної ділянки активного сайту протеїнкінази та між гідроксильною групою фенільного кільця сполук і атомами Нітрогену Lys68 і/чи Asp175.

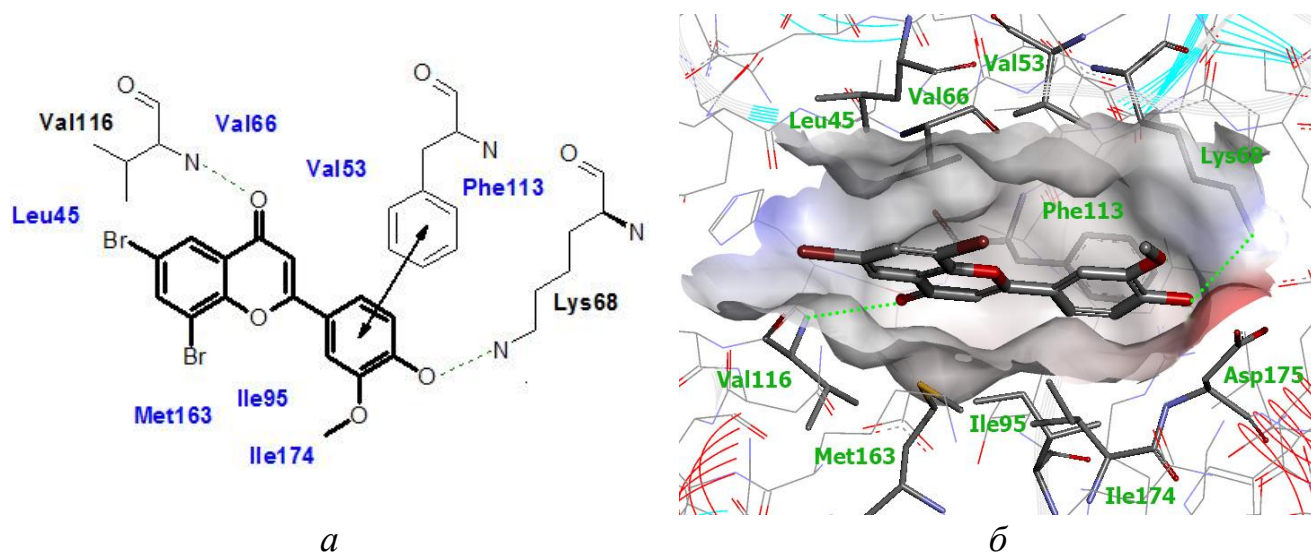


Рис. 4.6. Інгібітор FNH79 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекинг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «FNH79 - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

Грунтуючись на даних, одержаних в результаті дослідження впливу хімічної структури замісників на інгібувальну активність сполук та при вивченні комплексів «інгібітор - СК2», можна зробити висновок, що перевага 3'-метокси-4'-гідрокси заміщених похідних, порівняно з іншими 3',4'-дизаміщеними похідними флавону, полягає в їх оптимальних донорно-акцепторних властивостях і гідрофобному потенціалі, що сприяє формуванню високоафінних комплексів з протеїнкіназою СК2. При цьому меншу активність хлорзаміщених похідних (FNH68, $IC_{50} = 0,01$ мкМ), порівняно з бромзаміщеними (FNH79, $IC_{50} = 0,004$ мкМ), можна пояснити вищою гідрофобністю замісників останніх.

Висновки:

1. Ідентифіковано нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних флавону. Показник IC_{50} найактивнішого інгібітору становить 0,1 мкМ;
2. Проаналізовано залежність «хімічна структура - інгібувальна активність» та побудовано комплекси похідних флавону з СК2. На основі отриманих даних розроблено модель взаємодії ідентифікованих сполук із активним сайтом СК2 та вироблено рекомендації щодо подальшої оптимізації похідних 4'-гідроксифлавону;
3. Визначено інгібувальну активність розроблених похідних 4'-гідроксифлавону. Показник IC_{50} найефективнішого інгібітору FNH79 становить 0,004 мкМ, тоді як найактивнішого інгібітору СК2 з класу флавонів природного походження – фізетину – 0,35 мкМ;
4. Досліджено кінетичні характеристики найбільш активних інгібіторів (FNH68 ($K_i = 3,5$ нМ) і FNH79 ($K_i = 1,8$ нМ)) та встановлено, що вони є селективними щодо СК2 на панелі з 7 протеїнкіназ;
5. Побудовано комплекси похідних 4'-гідроксифлавону з СК2. Встановлено, що фіксація сполук в активному сайті протеїнкінази відбувається за рахунок утворення гідрофобних контактів із амінокислотними залишками Leu45, Val53, Val66, Ile95, Phe113, Met163 та Ile174 і водневих зв'язків із Val116, Lys68 та/чи Asp175. Значний вплив на активність сполук мають замісники в позиціях 3' та 4'.

Основні результати розділу опубліковано в праці:

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.

4.2. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 4'-карбоксіфлавонолу

4.2.1. Ідентифікація та визначення інгібувальної активності карбоксилвмісних похідних флавонолу. В ході описаного в підрозділі 3.1 рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, як перспективні інгібітори протеїнкінази СК2, було ідентифіковано похідні флавонолу, які містили залишок карбонової кислоти (загальна структура сполук наведена на рис. 4.7). Ці сполуки привернули увагу, оскільки велика кількість інгібіторів СК2 містять карбоксильну групу [193-197]. Відомості про карбоксилвмісні похідні флавонолу природного походження, які здатні пригнічувати активність СК2, відсутні [4, 13].

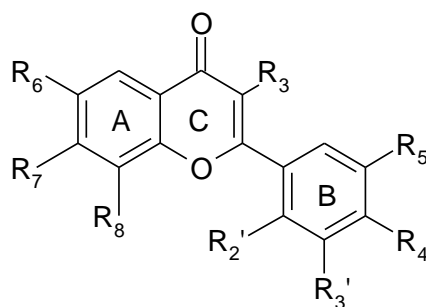


Рис. 4.7. Загальна хімічна структура 13-ти ідентифікованих похідних карбоксіфлавонолу

Інгібувальну активність сполук було визначено за допомогою біохімічних тестів *in vitro*. Результати експерименту подано в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Хімічні структури замісників похідних карбоксифлакону та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників								IC ₅₀ , мкМ
	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₃	R ₆	R ₇	R ₈	
FLC1	OCH ₂ OCH ₂		H	COOH	H	H	OCH ₃	H	8
FLC2	COOH	H	H	H	H	CH ₃	H	H	>30
FLC3	COOH	H	H	H	H	Cl	H	H	>30
FLC4	H	H	COOH	H	OH	H	H	H	1,3
FLC5	COOH	H	H	H	H	H	H	H	>30
FLC6	H	H	COOH	H	H	CH ₃	H	H	8
FLC7	H	H	COOH	H	OH	CH ₃	H	H	0,6
FLC8	COOH	H	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	>30
FLC9	H	H	COOH	H	H	CH ₃	H	CH ₃	5
FLC10	COOH	H	H	H	H	H	CH ₃	H	>30
FLC11	COOH	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃	H	>30
FLC12	COOH	H	H	H	H	Cl	CH ₃	H	>30
FLC13	COOH	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	>30

За допомогою біохімічних тестів було встановлено, що п'ять, з 13 відібраних карбоксилвмісних похідних флакону, пригнічують активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітору ≤ 30 мкМ (табл. 4.6). При цьому цю здатність мають лише сполуки, які містять COOH-групу в 4' та 5' позиціях кільця В флакону. Їх показник IC₅₀ знаходиться в межах 0,6-8 мкМ. Також на інгібувальну активність сполук впливала гідроксильна група в 3-й позиції гетероциклу, що видно на прикладі інгібіторів FLC6 і FLC7, показник IC₅₀ яких відрізняється більше ніж на порядок.

4.2.2. Оптимізація та дослідження похідних 4'-карбоксифлавонолу.

Ґрунтуючись на результатах аналізу комплексів «сполука FLC - СК2», отриманих за допомогою програми DOCK 4.0 та біохімічних тестів, було розроблено модель взаємодії похідних карбоксифлавонолу з активним сайтом протеїнкінази (рис. 4.8).

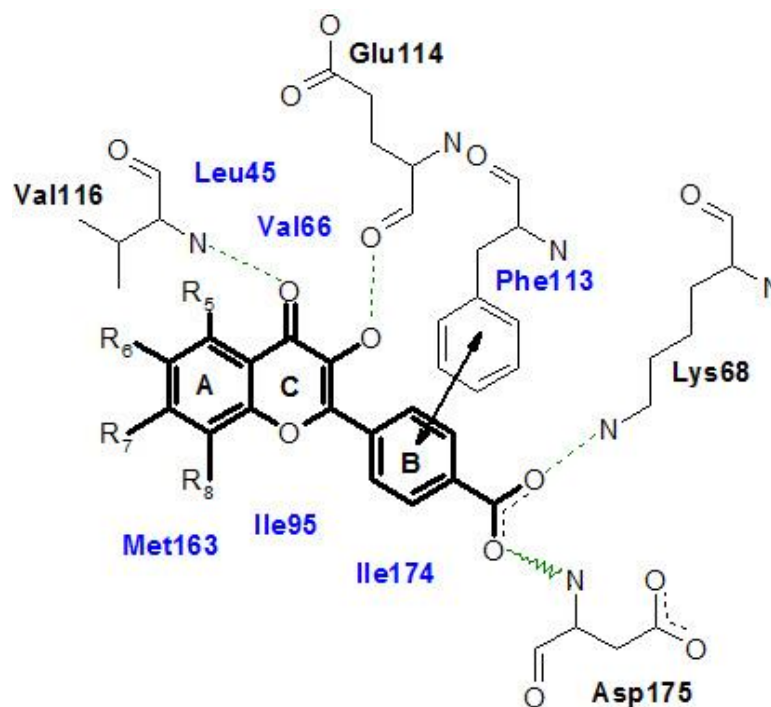


Рис. 4.8. Модель взаємодії похідних 4'-карбоксифлавонолу з АТФ-зв'язувальним сайтом ензиму. Синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів, чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки. Стекінг-взаємодію з Phe113 позначено стрілкою, водневі зв'язки – зеленою пунктирною лінією, ймовірний водневий зв'язок з головним ланцюгом Asp175 – зеленою зигзагоподібною лінією

Згідно запропонованої моделі, ліганди фіксуються в активному сайті протеїнкінази СК2 завдяки міцним гідрофобним контактам, які виникають між фенільним замісником в другій позиції хроменону і амінокислотними залишками Phe113, Ile95 та Ile174. Особливий внесок в афінність зв'язування робить стекінг-взаємодія кільця В флавонолу з Phe113. Додаткові гідрофобні взаємодії виникають із Leu45, Val66 та Met163 за участі гетероциклу ліганду. Окрім гідрофобних

контактів, інгібітори утворюють три міжмолекулярні водневі зв'язки. Перший з них виникає між атомом Оксигену в четвертій позиції хроменону і атомом Нітрогену головного ланцюга Val116, локалізованого в шарнірній ділянці СК2. Другий водневий зв'язок утворюється між 3-ОН групою і основним ланцюгом Glu114. Ймовірно, що саме цей зв'язок є причиною вищої активності сполуки FLC6 порівняно з FLC7 (IC_{50} становить 8 мкМ і 0,6 мкМ, відповідно). Третій зв'язок формується між атомом Оксигену карбоксильної групи ліганду та атомом Нітрогену бічного ланцюга Lys68. Також варто зауважити, що розрахунок відстані і величини кута між карбоксильною групою похідних карбоксифлавонолу та головним ланцюгом Asp175 дозволяє передбачити додатковий водневий зв'язок із цією амінокислотою. Виникнення саме цієї взаємодії може пояснити вищу активність сполук, що мають карбоксильну групу в 4' позиції фенілу, оскільки сполуки, які містять цю групу в 2' позиції не здатні утворювати цей зв'язок.

Отже, найбільш важливими замісниками в структурі досліджуваних похідних карбоксифлавонолу є гідроксильна група в 3-й позиції гетероциклу та 4'-карбоксильна група фенільного замісника. Тому для подальшої оптимізації було обрано структуру 4'-карбоксифлавонолу (рис. 4.7). Цю структуру має інгібітор FLC4 ($IC_{50}=1,3$ мкМ). Варто звернути увагу, що сполука FLC7 є в два рази активнішою ($IC_{50}=0,6$ мкМ), ніж FLC4 за рахунок метильної групи в 6-й позиції гетероциклу. Це свідчить про те, що присутність гідрофобних замісників в структурі інгібіторів сприяє зростанню їх активності, шляхом збільшення афінності комплексів «ліганд-рецептор». Тому, один з першопочаткових кроків структурної оптимізації ідентифікованих похідних карбоксифлавонолу полягав у введенні гідрофобних замісників в кільце А хроменону. Заміщення проводилося в 6-й, 7-й і 8-й позиціях, за виключенням 5-ї позиції (згідно до запропонованої в пункті 4.2.1 моделі взаємодії флавонолів із активним сайтом СК2 (рис. 4.8), замісники в цій позиції мають бути відсутні, оскільки вони можуть перешкоджати утворенню зв'язку між лігандом та амінокислотним залишком Val116).

В результаті проведеної оптимізації отримано 13 похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонолу (рис. 4.9).

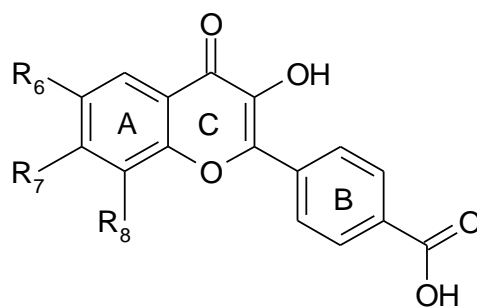


Рис. 4.9. Загальна хімічна структура 13-ти розроблених похідних 4'-карбокифлавонолу

Хімічні структури замісників розроблених похідних 3-гідрокси-4'-карбокифлавонолу та результати біохімічного тестування представлено в табл. 4.7.

Таблиця 4.7

Хімічні структури замісників похідних 4'-карбокифлавонолу та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	R ₆	R ₇	R ₈	IC ₅₀ , мкМ
FLC14	CH ₃	CH ₃	H	0,3
FLC15	OCH ₃	H	H	0,25
FLC16	NHAc	H	H	0,72
FLC17	Cl	CH ₃	H	0,17
FLC18	Cl	H	H	0,18
FLC19	CH ₃	H	CH ₃	0,07
FLC20	Et	H	H	0,16
FLC21	Cl	H	Cl	0,04
FLC22	H	CH ₃	H	0,7
FLC23	Br	H	H	0,08
FLC24	H	OCH ₃	H	0,29
FLC25	Cl	H	CH ₃	0,05
FLC26	Br	H	Br	0,009

Як видно з табл. 4.7, всі протестовані сполуки пригнічують активність СК2 в субмікромольному діапазоні концентрацій. В кінетичних експериментах *in vitro* було встановлено, що найактивніші інгібітори FLC21 та FLC26 конкурують з молекулою АТФ за сайт зв'язування СК2 (рис. 4.10), їх показник K_i становить 13 нМ та 2,5 нМ, відповідно.

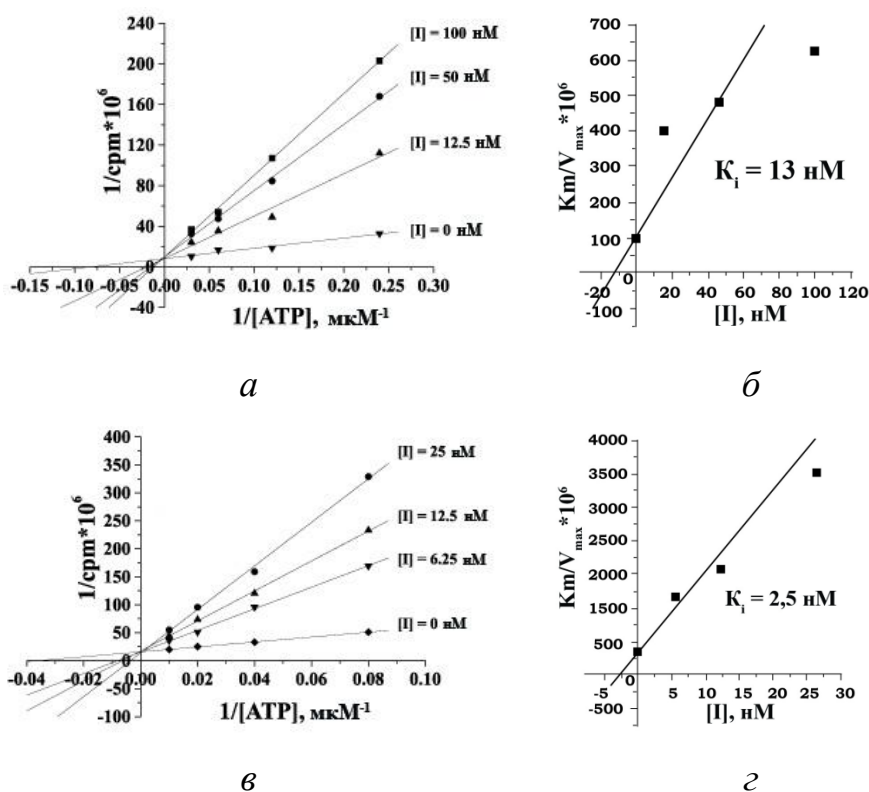


Рис. 4.10. Кінетичний аналіз утворення комплексів інгібіторів FLC21 та FLC26 з протеїнкіназою СК2. Показник K_i становить 13 нМ та 2,5 нМ, відповідно: а, в – визначення K_m і v_{\max} в обернених координатах Лайнуївера-Берка. Концентрацію інгібіторів змінювали від 0 нМ до 100 нМ (інгібітор FLC21) та від 0 нМ до 25 нМ (інгібітор FLC26); б, з – розрахунок значення K_i

Експерименти з визначення селективності інгібіторів FLC21 та FLC26 щодо СК2 було проведено на панелі, до якої входили чотири серин-треонінові (ASK1, JNK3, Aurora A та ROCK1) та три тирозинові протеїнкінази (FGFR1, c-Met та Tie2). Дослідження показало, що протестовані сполуки пригнічують активність ензимів FGFR1, c-Met і Aurora A, щоправда не в такій мірі як активність СК2

(табл. 4.8). Варто додати, що інгібітор FLC26 виявився менш селективним порівняно з FLC21.

Таблиця 4.8

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

4.2.3. Аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 4'-карбокифлавонолу та встановлення типу їх зв'язування з СК2. В результаті аналізу даних отриманих *in vitro*, було з'ясовано вплив окремих замісників на активність розролених інгібіторів. Можна зробити висновок, що активність сполук найбільше залежить від гідрофобності замісників в 6-й позиції флавону і зростає в ряду $Me < MeO < Cl \leq Et < Br$. Показник IC_{50} сполук FLC7, FLC15, FLC18, FLC20 та FLC23, що містять ці замісники, становить 0,6 мкМ, 0,25 мкМ, 0,18 мкМ, 0,16 мкМ та 0,08 мкМ, відповідно. Введення додаткових гідрофобних замісників у 8-му позицію кільця А також покращує інгібувальну активність похідних 4'-карбокифлавонолу, що видно на прикладі пар сполук FLC7 ($IC_{50} = 0,6$ мкМ) - FLC19 ($IC_{50} = 0,07$ мкМ) та FLC18 ($IC_{50} = 0,18$ мкМ) - FLC21 ($IC_{50} = 0,04$ мкМ). Сполуки, які містять в позиціях R^6 та R^8 одночасно два атоми Брому (інгібітор FLC26, $IC_{50} = 0,009$ мкМ) краще пригнічують ензиматичну активність СК2, ніж сполуки з двома атомами Хлору (інгібітор FLC21, $IC_{50} = 0,04$ мкМ) або залишками метилу (інгібітор FLC19, $IC_{50} = 0,07$ мкМ).

Для встановлення типу зв'язування похідних 4'-карбокифлавонолу з протеїнкіназою СК2, було побудовано комплекси сполук із рецептором (рис. 4.11) за допомогою методу молекулярного докінгу. З'ясовано, що досліджувані ліганди утворюють гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val66, Ile95, Phe113, Met163 та Ile174 і водневі зв'язки з Val116, Glu114 та Lys68, подібні

до описаних в пункті 4.2.1 (рис. 4.8). Крім того, в отриманих комплексах має місце передбачений раніше додатковий водневий зв'язок, який утворюється між 4'-карбоксильною групою флавонолу та атомом Нітрогену головного ланцюга Asp175.

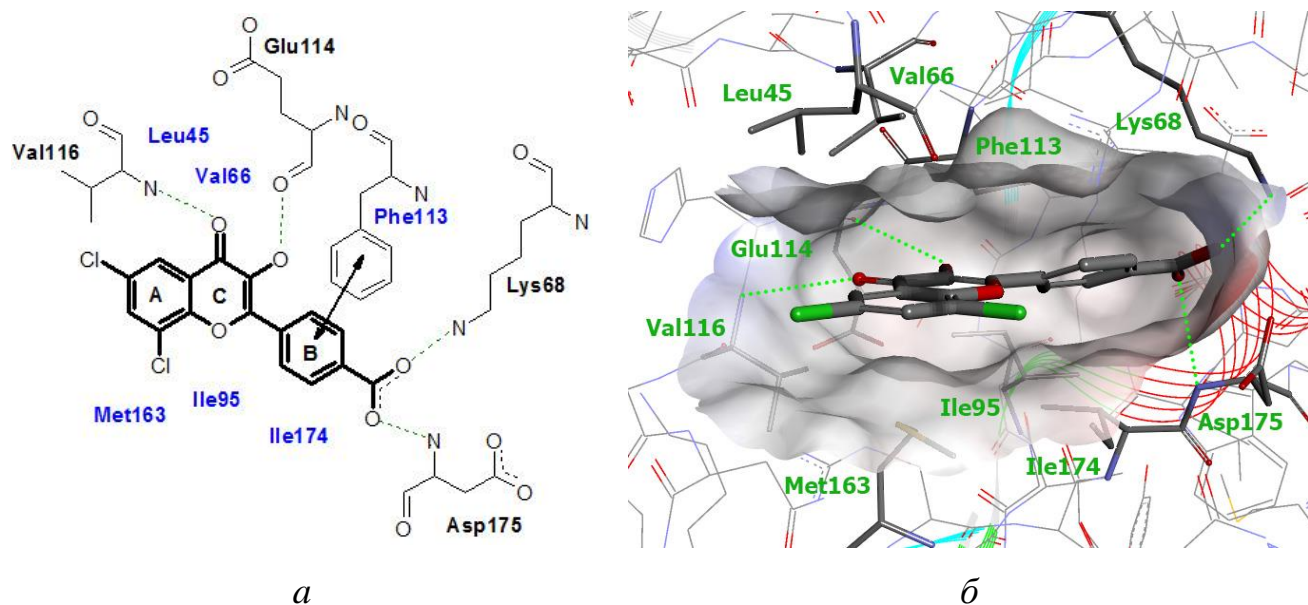


Рис. 4.11. Інгібітор FLC21 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *а* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «FLC21 - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

Варто відмітити, що запропонована модель комплексу «ліганд - СК2» (рис. 4.11) добре узгоджується з даними отриманими в ході вивчення взаємозв'язку між хімічною структурою та інгібувальною активністю розроблених похідних 4'-карбокифлавонолу та може бути підкріплена результатами кристалографічного аналізу комплексів інших інгібіторів із СК2

[198, 199]. Наприклад, сполука СХ-4945, яка перебуває на другій стадії клінічних досліджень [15, 16], також одночасно формує міжмолекулярні водневі зв'язки з амінокислотним залишком Val116 в шарнірній ділянці та Lys68 і Asp175 в фосфат-зв'язувальній області АТФ-акцепторного сайту СК2 [199]. Цей інгібітор, так само як і досліджені в цьому підрозділі похідні 4'-карбокифлавонолу, має ароматичне гетероциклічне ядро оточене донорами/акцепторами водню.

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

Висновки:

1. Ідентифіковано нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних карбоксифлавонолу. Показник IC_{50} найактивнішої сполуки становить 0,6 мкМ;

2. Проаналізовано залежність «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних карбоксифлавонолу та побудовано комплекси сполук із СК2. На основі отриманих даних розроблено модель взаємодії знайдених низькомолекулярних інгібіторів із АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази. Для подальшої хімічної оптимізації обрано структуру 3-гідрокси-4'-карбокифлавонолу;

3. Завдяки проведеній хімічній оптимізації похідних 3-гідрокси-4'-карбокифлавонолу отримано 13 нових інгібіторів СК2 з активністю в субмікромолярному діапазоні концентрацій. Показник IC_{50} найактивнішої сполуки FLC26 становить 0,009 мкМ;

4. Досліджено кінетичні характеристики найбільш активних інгібіторів (FLC21 ($K_i = 13$ нМ) та FLC26 ($K_i = 2,5$ нМ)) та встановлено, що вони є селективними щодо СК2 на панелі з 7 протеїнкіназ;

5. За допомогою методу молекулярного докінгу, отримано комплекси похідних 4'-гідроксифлавонолу з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Встановлено, що стабілізація цих комплексів відбувається за рахунок гідрофобних контактів із амінокислотними залишками Leu45, Val66, Ile95, Phe113, Met163 і Ile174 та водневим зв'язкам із Val116, Glu114, Lys68 та Asp175.

Основні результати розділу опубліковано в праці:

Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2 / A.G. Golub, V.G. Bdzholá, 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.

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ (ТІЕНО[2,3-d]ПІРИМІДИН)КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

Похідні піримідину є широко розповсюдженими в природі сполуками, їх часто використовують для розробки нових біологічно активних речовин. Серед анелюваних піридинів найбільш поширеними є тієнопіримідини, зокрема похідні тієно[2,3-d]піримідину. Сполуки з цього класу проявляють імуномодулюючу, протівірусну, нейротропну, протизапальну, анальгетичну, антиалергічну, протипухлинну, антибактеріальну та фунгіцидну дії [200] та ідентифіковані як інгібітори протеїнкіназ ErbB, PDGF, VEGFR-2, FLT3 і Tie2 [201-203]. Проте дані про їх здатність пригнічувати активність СК2 відсутні.

Оскільки, як неодноразово згадувалося вище, велика кількість інгібіторів протеїнкінази СК2 містить в своїй структурі COOH-групу [194, 195, 197, 198], мета подальших досліджень полягала в розробці активних і селективних інгібіторів СК2 на основі похідних (тієно[2,3-d]піримідин)карбонОВОЇ КИСЛОТИ.

5.1. Дослідження інгібіторів протеїнкінази СК2 з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтїо)карбонОВОЇ КИСЛОТИ

5.1.1. Визначення інгібувальної активності похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтїо)карбонОВОЇ КИСЛОТИ. За допомогою біохімічних тестів *in vitro* із використанням [γ -³²P]АТФ, було перевірено здатність 28-ми синтезованих *de novo* похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтїо)карбонОВОЇ КИСЛОТИ (загальну

хімічну структуру сполук наведено на рис. 5.1) пригнічувати активність протеїнкінази СК2.

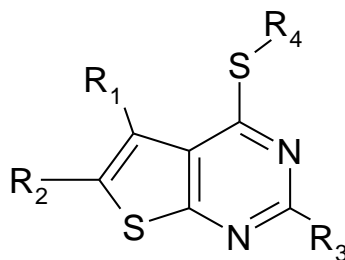


Рис. 5.1. Загальна хімічна структура синтезованих *de novo* 28-ми похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтїо)карбонової кислоти

Результати біохімічних тестів *in vitro* отриманих сполук представлено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Хімічні структури замісників похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтїо)карбонової кислоти та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структури замісників				IC ₅₀ , мкМ
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
1	2	3	4	5	6
5a	-(CH ₂) ₄ -		H	CH(CH ₃)COOH	17
5b	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -		H	CH(CH ₃)COOH	20
5c	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃)COOH	>30
5d	Ph	H	H	CH ₂ COOH	30
5e	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -		H	CH ₂ COOH	1,78
5f	-(CH ₂) ₄ -		H	CH(C ₂ H ₅)COOH	>30
5g	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ COOH	17,75
5h	Ph	H	H	CH(CH ₃)COOH	23
5i	4-ClC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ COOH	>30

1	2	3	4	5	6
5j	4-ClC ₆ H ₄	H	H	CH(C ₂ H ₅)COOH	>30
5k	H	Ph	H	CH ₂ COOH	1,5
5l	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	CH(CH ₃)COOH	>30
5m	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	CH(C ₂ H ₅)COOH	>30
5n	4-BrC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ COOH	14
5o	-(CH ₂) ₄ -		H	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	>30
5p	4-ClC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	0,175
5q	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	17,75
5r	-(CH ₂) ₄ -		CH ₃	CH ₂ -CH ₂ COOH	15,8
5s	-(CH ₂) ₄ -		H	CH ₂ -(CH ₂) ₂ COOH	>30
5t	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	11,3
5u	Ph	CH ₃	H	CH ₂ COOH	>30
6a	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	0,1
6b	3,4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	0,175
6c	H	CH ₃	H	CH ₂ COOH	4
6d	4-C ₂ H ₅ OC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	0,125
6e	4-FC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	1,2
6f	H	CH ₃	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	7
6g	H	Ph	CH ₃	CH ₂ -CH ₂ COOH	3,5

Було встановлено, що 19 похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти пригнічують ензиматичну активність протеїнкінази СК2 більше ніж на 50% при концентрації від 0,1 мкМ до 30 мкМ. Найкращим інгібітором є сполука 6a – 3-(5-*p*-толіл-тієно[2,3-d]піримідин-4-ілсульфаніл)пропіонова кислота, її показник IC₅₀ = 0,1 мкМ. За допомогою кінетичних експериментів було продемонстровано, що цей інгібітор є АТФ-конкурентним (рис. 5.2) і має константу інгібування K_i 40 нМ.

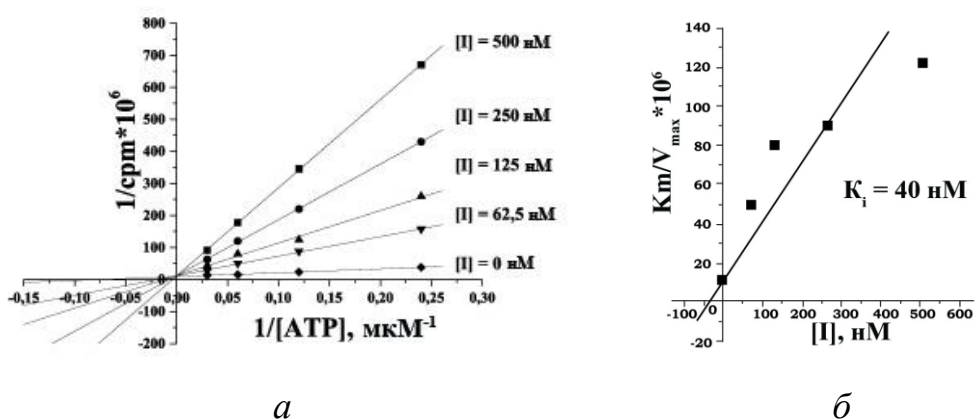


Рис. 5.2. Кінетичний аналіз утворення комплексу інгібітору ба з протеїнкіназою СК2. Показник K_i становить 40 нМ : а – визначення K_m і v_{max} в обернених координатах Лайнуївера-Берка. Концентрацію інгібітору змінювали від 0 нМ до 500 нМ ; б – розрахунок значення K_i

Селективність найкращих інгібіторів ба та бd щодо СК2 було перевірено *in vitro* на панелі з семи протеїнкіназ. В табл. 5.2 представлено залишкову активність ензимів при концентрації інгібіторів 10 мкМ .

Таблиця 5.2

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 мкМ

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

Як видно з табл. 5.2, незважаючи на пригнічення активності кінази Aurora A обома інгібіторами, сполуки продемонстрували гарну селективність щодо СК2.

5.1.2. Аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти. В ході аналізу залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» було досліджено вплив замісників R^1 , R^2 та R^4 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу на здатність сполук пригнічувати активність СК2.

Встановлено, що найбільший вплив на інгібувальну активність сполук має замісник R^4 . Ліганди, які в цій позиції містять пропіонову кислоту є ефективнішими інгібіторами, ніж сполуки з залишком оцтової кислоти. Це можна побачити на прикладі пар сполук – 6t та 5g, 5p та 5i (показник IC_{50} становить 1,3 мкМ та 17,75 мкМ, 0,175 мкМ та > 30 мкМ, відповідно). Сполуки з $R^4 = 2$ -пропіонова кислота виявились менш активними, ніж з $R^4 =$ оцтова кислота (5e та 5b, 5g та 5c, відповідний показник IC_{50} становить 1,78 мкМ та 20 мкМ, 17,75 мкМ та >30 мкМ). В той час, сполуки з $R^4 = 2$ -пропіонова кислота є активнішими за сполуки з $R^4 = 2$ -бутанова кислота та n-бутанова кислота (IC_{50} сполук 5a, 5f, 5s становить 17 мкМ, >30 мкМ та >30 мкМ, відповідно). Замісники $CH_2C_6H_4COOH-m$ (сполука 5g) та CH_2COOH (сполука 5q) однаковою мірою впливають на інгібувальну активність досліджуваних сполук, показник IC_{50} обох інгібіторів становить 17,75 мкМ.

Отже, замісники в позиції R^4 за їх впливом на інгібувальну активність сполук можна розташувати в наступному порядку: $CH_2CH_2COOH > CH_2COOH > CH(CH_3)COOH > CH_2CH_2CH_2-COOH = CH(C_2H_5)COOH$. Отримана залежність вказує на те, що похідні 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідину з $R^4 =$ пропіонова кислота є найефективнішими інгібіторами серед досліджуваних похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти. Збільшення довжини і/чи розгалудження замісників в 4-й позиції гетероциклу, негативно впливає на здатність сполук пригнічувати активність СК2. Цікавим залишається той факт, що сполука 6c, яка містить залишок оцтової кислоти є дещо активнішою за 6f ($R^4 =$ пропіонова кислота), показник IC_{50} цих сполук становить 4 мкМ та 7 мкМ, відповідно. Ймовірно, ця ситуація зумовлена тим, що інгібітор 6c в 5-й та 6-й позиції тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу містить не великі за розміром замісники ($R^1 =$ водень, $R^2 =$ метил, відповідно), що дозволяє йому розташовуватися в глибині АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2 і утворювати водневі зв'язки з амінокислотними залишками Lys68 та Asp175.

За умови, що $R^4 =$ пропіонова кислота, найменший показник IC_{50} мають інгібітори, в яких в 1-й позиції знаходиться пара-заміщений феніл (сполуки 5p, 6a, 6b, 6d та 6e). Залежність інгібувальної активності цих сполук від R^1 можна подати у

вигляді: $4\text{-FC}_6\text{H}_4 < 3,4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_3 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4 < 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4 < 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$ (показник IC_{50} сполук, що містять ці замісники становить 1,2 мкМ, 0,175 мкМ, 0,175 мкМ, 0,125 мкМ та 0,1 мкМ, відповідно). В той час, похідні, в яких $R^1 =$ пара-заміщений феніл, але $R^4 =$ оцтова (сполуки 5i, 5n), ізопропанова (сполука 5l) чи ізобутанова кислота (сполуки 5j, 5m) мають низьку активність або є взагалі не активними. Показник IC_{50} сполук 5i, 5n, 5l, 5j та 5m становить > 30 мкМ, > 30 мкМ, > 30 мкМ, > 30 мкМ та 14 мкМ, відповідно.

В 6-й позиції тієно[2,3-d]піримідиновий гетероцикл є незаміщеним або містить залишок метилу чи фенілу. Ці замісники не значно впливають на інгібувальну активність сполук. Наприклад, показник IC_{50} інгібітору 5k із $R^2 = \text{C}_6\text{H}_5$ та інгібітору 6c із $R^2 = \text{CH}_3$ становить 1,5 мкМ та 4 мкМ, відповідно. Сполуки з $R^1, R^2 =$ циклобутан (5a, $IC_{50} = 17$ мкМ) або ізоциклопентан (5b, $IC_{50} = 17$ мкМ) також майже однаково пригнічують активність СК2. Сполука 5c із $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ є не активною.

5.1.3. Встановлення типу зв'язування похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти з СК2. З метою вивчення міжмолекулярних взаємодій, які впливають на інгібувальну активність похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти, було побудовано комплекси інгібіторів із протеїнкіназою СК2. Результати, отримані за допомогою методу молекулярного докінгу показали, що всі сполуки з $IC_{50} < 1$ мкМ є комплементарними до АТФ-зв'язувального сайту ензиму (рис. 5.3) та займають в ньому подібне положення. Цей факт можна пояснити тим, що замісники R^1 та R^4 у 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідиновому гетероциклі найактивніших інгібіторів мають структурну подібність.

Ключовими взаємодіями, які сприяють фіксації лігандів в активному сайті СК2 є сили Ван-дер-Ваальса. Вони виникають між інгібітором та низкою амінокислотних залишків (Leu45, Val53, Val66, Val116 та Ile174). На додаток, сполуки формують три міжмолекулярні водневі зв'язки. Перший з них виникає між атомом Нітрогену в 1-й позиції тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу та Val116 шарнірної ділянки АТФ-зв'язувального сайту СК2. Два інші зв'язки утворюються між замісником R^4 (пропіонова кислота) та бічним ланцюгом Lys68 і головним ланцюгом Asp175.

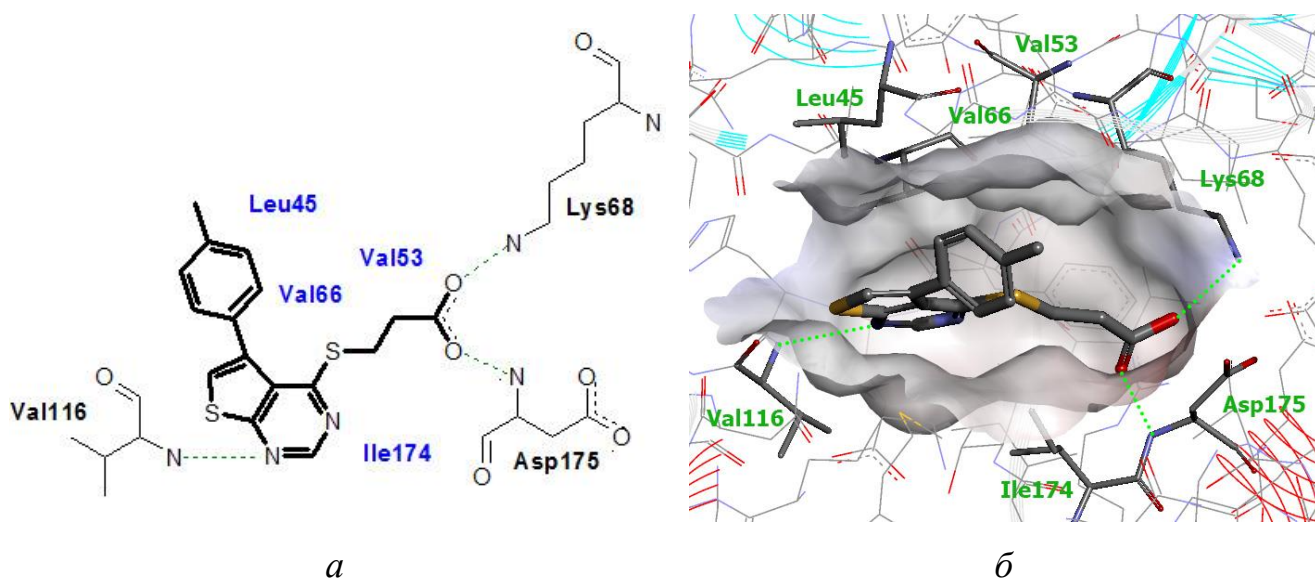


Рис. 5.3. Інгібітор ба в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки); *б* – загальний вигляд комплексу «ба - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

Результати, отримані в ході аналізу комплексів похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти з СК2 та залежності «хімічна структура - інгібувальна активність», підтвердили припущення, що R^4 = пропіонова кислота є оптимальними за довжиною замісником, оскільки він дозволяє сполукам формувати водневі зв'язки одночасно в двох областях АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази СК2 (шарнірній та фосфат-зв'язувальній ділянках).

Висновки:

1. Досліджено нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти. Найактивнішим інгібітором є сполука ба ($IC_{50} = 0,1$ мкМ);

2. Проаналізовано залежність «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти та з'ясовано, що найбільший вплив на здатність інгібіторів пригнічувати активність СК2 має замісник R⁴;

3. Досліджено кінетичні характеристики інгібітору 6a ($K_i = 40$ нМ) та встановлено, що він є селективним щодо СК2 на панелі з 7 протеїнкіназ;

5. Встановлено тип зв'язування похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Показано, що стабілізації комплексів «ліганд - рецептор» сприяє низка гідрофобних контактів із амінокислотними залишками Leu45, Val53, Val66, Val116, Ile174 та водневі зв'язки з Val116, Lys68 та Asp175.

Основні результати розділу опубліковано в праці:

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. Bdzholo, N.V. Briukhovetska, A.O. Balandu, O.P. Kukhareno, I.M. Kotey, O.V. Ostrynska, S.M. Yarmoluk // Eur. J. Med. Chem. – 2011. – Vol. 46, № 3. – P. 870-876.

5.2. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти

5.2.1. Дослідження похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти. В ході експериментів, описаних в підрозділі 5.1, було отримано та досліджено нові інгібітори протеїнкінази СК2 – (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонові кислоти. Їх висока інгібувальна активність спонукала нас до подальшої розробки активних сполук на основі похідних

(тієно[2,3-d]піримідин)карбонової кислоти. Увагу привернули сполуки з подібною структурою, в яких залишок $-S-(CH_2)_n-COOH$ було замінено на $-NH-(CH_2)_n-COOH$. Варто зауважити, що $-NH-$ група за розміром подібна до $-CH_2-$ групи, а отже не повинна створювати стеричні перешкоди. В той час, вона має зовсім інші властивості, наприклад, надає електрони для карбонільної групи та захищає її від гідролізу. Крім цього, заміна S на NH дозволяє порівняти відносне значення акцептору водневого зв'язку (S) з донором (NH).

Отже, для біохімічних тестів *in vitro* було одержано похідні (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти, які є аналогами інгібіторів протеїнкінази СК2 описаних в підрозділі 5.1. Загальна структура сполук представлена на рис. 5.4. Структури замісників та інгібувальну активність інгібіторів подано в табл. 5.3.

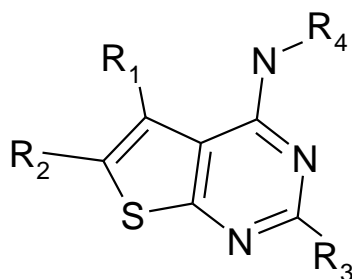


Рис. 5.4. Загальна хімічна структура похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти

Результати експерименту продемонстрували, що лише дві сполуки з 18 отриманих пригнічують активність СК2. Це сполука ННТР2 ($IC_{50} = 9,5$ мкМ) – 3-(5,6,7,8-тетрагідро-бензо[4,5]тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)-пропанова кислота та сполука ННТР5 ($IC_{50} = 16$ мкМ) - 3-(7-метил-5,6,7,8-тетрагідро-бензо[4,5]тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)-пропанова кислота.

Хімічні структури замісників похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників				IC ₅₀ , мкМ
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
NHTP1	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		H	CH ₂ COOH	>30
NHTP2	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		H	CH ₂ -CH ₂ COOH	9,5
NHTP3	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ COOH	>30
NHTP4	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -		H	CH ₂ COOH	>30
NHTP5	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -		H	CH ₂ -CH ₂ COOH	16
NHTP6	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP7	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP8	Ph	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP9	CH ₃	COO-CH ₂ -CH ₃	H	CH ₂ COOH	>30
NHTP10	4-FC ₆ H ₄	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP11	3,4-(CH ₃)C ₆ H ₃	H	H	CH ₂ COOH	>30
NHTP12	3,4-(CH ₃)C ₆ H ₃	H	H	(CH ₂) ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP13	H	CH ₃	H	CH ₂ COOH	>30
NHTP14	H	Ph	H	CH- (CH ₂ OH)(COOH)	>30
NHTP15	H	Ph	H	CH- (CH ₂ ONH ₂)(COOH)	>30
NHTP16	H	CH ₂ -CH ₃	H	CH ₂ COOH	>30
NHTP17	4,5-(O-CH ₃)C ₆ H ₃	H	H	CH ₂ -CH ₂ COOH	>30
NHTP18	H	Ph	CH ₃	CH- (CH ₂ NO)(COOH)	>30

Цікаво, що сполука NHTP7 (рис. 5.5, б), яка є аналогом досліджуваного раніше інгібітору ба (IC₅₀ = 0,1 мкМ) (рис. 5.5, а), виявилася не активною. Подібна

ситуація спостерігалася зі сполуками ННТР4 та 5e, показник IC_{50} яких становить >30 мкМ та 1,78 мкМ, відповідно.

Очікувалося, що як і у випадку з інгібіторами, описаними в підрозділі 5.1, найбільший вплив на активність досліджуваних сполук буде мати замісник R^4 . Справді, інгібувальну активність продемонстрували лише сполуки, в яких R^4 = пропіонова кислота (показник IC_{50} сполук ННТР2 та ННТР5 становить 9,5 мкМ та 16 мкМ, відповідно). Слід зауважити, що як і раніше (див. пункт 5.1.2) залишок цієї кислоти є оптимальнішим замісником, ніж залишок оцтової кислоти, що доводять пари сполук ННТР5 ($IC_{50}=16$ мкМ) - ННТР4 (> 30 мкМ) та ННТР2 ($IC_{50}=9,5$ мкМ) - ННТР1 (> 30 мкМ), відповідно.

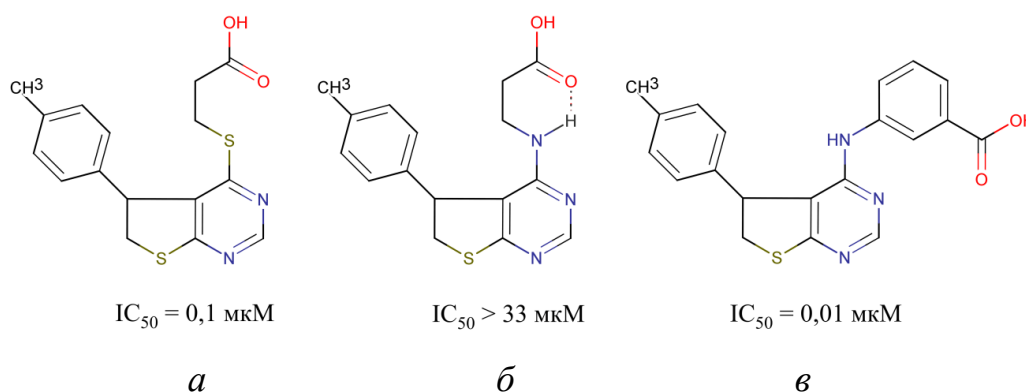


Рис. 5.5. Хімічна структура похідних (тієно[2,3-d]піримідин)карбонових кислот: *a* – сполука *ба* – похідне (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти, яка не здатна утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок, *б* – сполука ННТР7, яка, ймовірно, утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок, *в* – сполука ННТР23, що має замісник R^4 , який не може утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок

Для того щоб зрозуміти причину зникнення інгібувальної активності в похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти, які є структурними аналогами досліджених раніше інгібіторів СК2, було побудовано їх комплекси з АТФ-зв'язувальною кишеною ензиму (рис. 5.6) за допомогою методу молекулярного докінгу. Було встановлено, що досліджувані сполуки займають в

активному сайті СК2 положення, подібне до похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти (див. підрозділ 5.1.3, рис. 5.3). З отриманих комплексів видно, що основний внесок в їх стабілізацію вносить тієно[2,3-d]піримідинове ядро, яке розташовується в шарнірному регіоні кінрази та має гідрофобні контакти з п'ятьма амінокислотними залишками (Val53, Val66, Val116, Met163 та Ile174). Залишок карбонової кислоти орієнтується в напрямку фосфат-зв'язувальної ділянки активного сайту СК2 і утворює водневі зв'язки з Lys68 та/або Asp175.

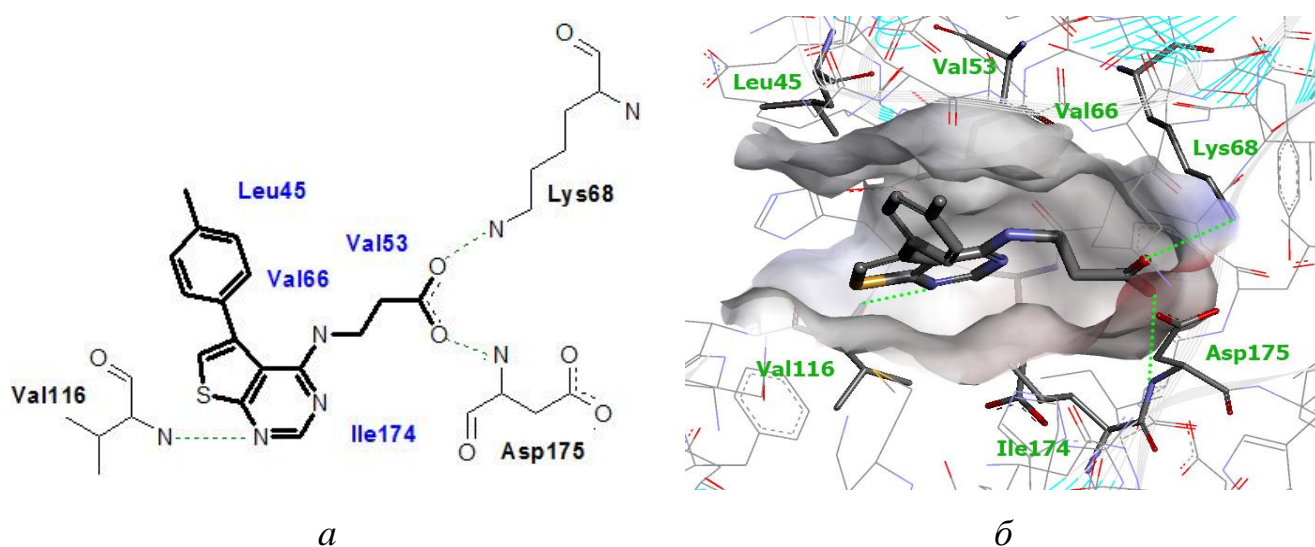


Рис. 5.6. Сполука ННТР7 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *а* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки); *б* – загальний вигляд комплексу «ННТР7 - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

Виходячи з аналізу побудованих комплексів лігандів із СК2 не вдалося пояснити, чому досліджувані похідні (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти є не активними порівняно зі своїми аналогами, які описані в підрозділі 5.1. Оскільки досліджувані карбоксилвмісні похідні 4-амінотієно[2,3-

d]піримідину відрізнялися від 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідинів лише одним атомом (Сірка була замінена на Нітроген) – було висунуто припущення, що причина зникнення інгібувальної активності сполук полягає в утворенні внутрішньомолекулярного водневого зв'язку між атомом Нітрогену та Оксигену карбоксильної групи залишку $-N-(CH_2)_n-COOH$ (рис. 5.5, б). Внаслідок формування цього зв'язку зменшується розмір молекули інгібітору і сполука втрачає здатність утворювати водневі зв'язки одночасно з Val116, Lys68 та/або Asp175, що і призводить до зменшення або зникнення її активності.

5.2.2. Хімічна оптимізація похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти. Для перевірки нашого припущення та подальшого дослідження сполук з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти, як інгібіторів протеїнкінази СК2, було одержано похідні амінотієно[2,3-d]піримідину з R^4 = карбоксифеніл (приклад, сполука NHTP23, рис. 5.5, в) та похідні 4-піперидин-1-іл-тієно[2,3-d]піримідину (загальну хімічну структуру сполук зображено на рис. 5.7). Сполуки з цими замісниками не здатні утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок. Крім цього, наявність циклічних замісників повинна сприяти кращій фіксації сполук в активному сайті СК2 між залишками Phe113 та Pe174.

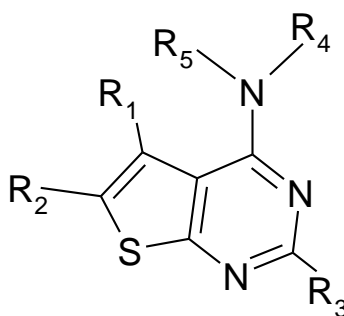


Рис. 5.7. Загальна хімічна структура розроблених похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти

В табл. 5.4 наведено структури замісників похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та результати біохімічних тестів *in vitro*.

Хімічні структури замісників похідних (тісно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонкової кислоти та результати біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ)

Сполука	Структура замісників				IC ₅₀ , мкМ
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
NHTP19	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -		H	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	>30
NHTP20	CH ₃	CH ₃	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	3,8
NHTP21	H	Ph	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	0,26
NHTP22	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	0,65
NHTP23	4-CH ₃ C ₆ H ₄	H	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	0,01
NHTP24	Ph	H	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	1,1
NHTP25	Ph	H	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	0,065
NHTP26	4-ClC ₆ H ₄	H	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	0,83
NHTP27	H	Ph	CH ₃	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	>30
NHTP28	H	Ph	CH ₃	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	1,5
NHTP29	CH ₃	COO-CH ₂ -CH ₃	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	6,5
NHTP30	Ph	CH ₃	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>p</i>	1,5
NHTP31	H	CH ₃	H	3,5-(COOH)C ₆ H ₃	>30
NHTP32	H	Ph	H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ - CH(COOH)-	>30
NHTP33	Ph	CH ₃	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	0,008
NHTP34	Ph	CH ₃	H	3-COOH-4-OH- C ₆ H ₃	0,31
NHTP35	H	Ph	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ - CH(COOH)-	>30
NHTP36	H	Ph	CH ₃	-CH ₂ -CH(COOH)- CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	>30
NHTP37	H	Ph	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ - CH(COOH)-CH ₂ - CH ₂ -	>30
NHTP38	CH ₃	COOH	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ - CH ₂ -CH ₂ -	>30
NHTP39	CH ₃	COOH	H	C ₆ H ₄ COOH- <i>m</i>	>30

Результати біохімічних тестів підтвердили наше припущення, оскільки більше половини отриманих похідних (тісно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти пригнічують активність СК2 в діапазоні від 0,008 мкМ до 10 мкМ. Кінетичні дослідження (рис. 5.8) найбільш активних сполук ННТР23, ННТР25 та ННТР33 показали, що вони є АТФ-конкурентними інгібіторами ($K_i = 4,5$ нМ, 12,7 нМ та 4 нМ, відповідно).

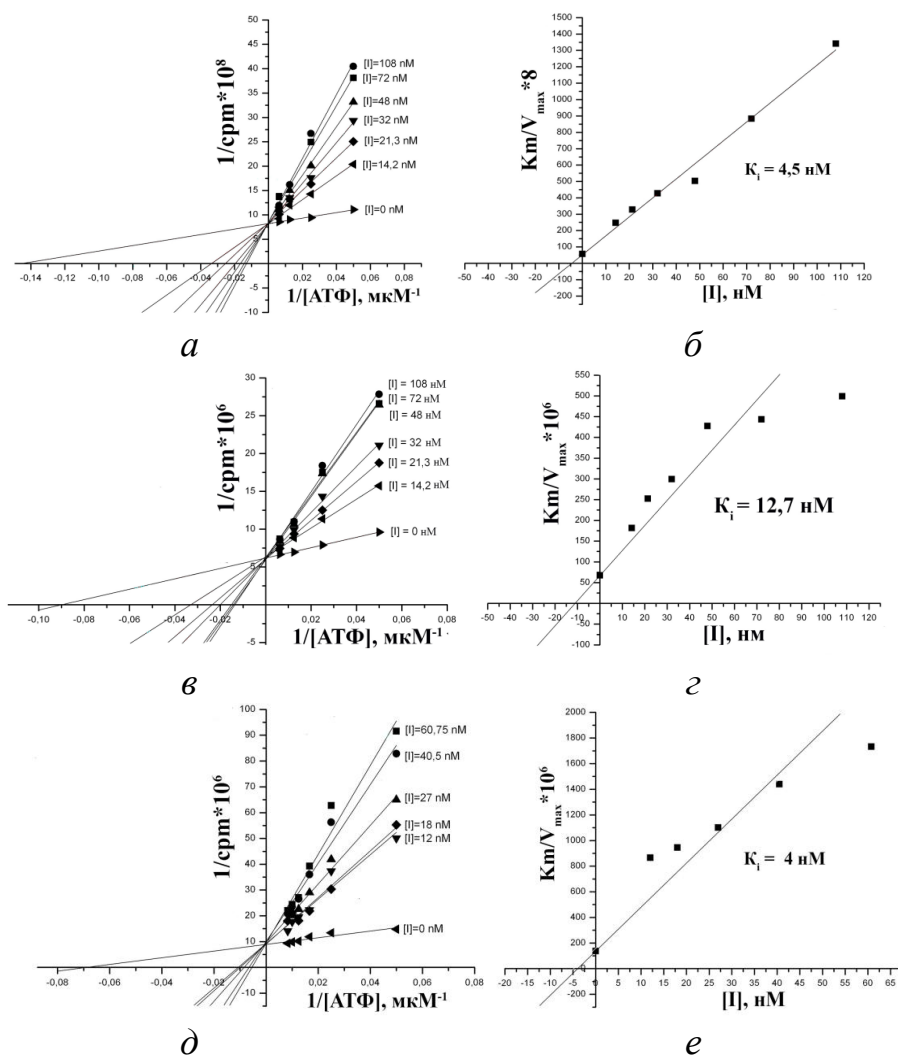


Рис. 5.8. Кінетичний аналіз утворення комплексів інгібіторів ННТР23, ННТР25 та ННТР33 з протеїнкіназою СК2. Показник K_i становить 4,5 нМ, 12,7 нМ та 4 нМ, відповідно: *a*, *в*, *д* – визначення K_m і v_{max} в обернених координатах Лайнуївера-Берка. Концентрацію інгібіторів змінювали від 0 нМ до 108 нМ (інгібітори ННТР23 та ННТР25) та від 0 нМ до 60,75 нМ (інгібітор ННТР33); *б*, *г*, *е* – розрахунок значення K_i

Для перевірки селективності знайдених інгібіторів щодо СК2, було досліджено *in vitro* вплив сполук NHTP23, NHTP25 та NHTP33 на ензиматичну активність чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Aurora A та Rock1) і трьох тирозинових протеїнкіназ (FGFR1, c-Met і Tie2). Результати експерименту представлено в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

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

Показано, що сполуки при концентрації 10 мкМ незначно пригнічують активність ензимів. Найбільшу інгібувальну активність виявлено проти Aurora A, проте вона є незначною порівняно з відсотком інгібування протеїнкінази СК2.

5.2.3. Аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та встановлення типу їх зв'язування з СК2. Аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» усіх похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти підтвердив припущення, що причина зникнення активності інгібіторів полягає в здатності залишку $-N-(CH_2)_n-COOH$ утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок. Про це свідчать сполуки NHTP20 ($R^4=C_6H_4COOH-m$), NHTP3 ($R^4=CH_2COOH$) і NHTP6 ($R^4=C_2H_4COOH$), показник IC_{50} яких становить 3,8 мкМ, >30 мкМ та >30 мкМ, відповідно та сполуки NHTP29 ($R^4=C_6H_4COOH-m$) і NHTP9 ($R^4=CH_2COOH$) із активністю 6,5 мкМ та >30 мкМ, відповідно. В структурах оптимізованих сполук значиму роль відіграє позиція карбоксильної групи в фенільному заміснику R^4 . При порівнянні похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти, які мають однакові R^1 , R^2 та R^3 виявилось, що найбільшу активність мають інгібітори з $R^4=C_6H_4COOH-m$.

Наприклад, сполука ННТР27 ($R^4 = C_6H_4COOH-p$) виявилась неактивною, тоді як ННТР28 ($R^4 = C_6H_4COOH-m$) має IC_{50} 1,5 мкМ. Сполука ННТР30 ($R^4 = C_6H_4COOH-p$) має активність майже в 200 разів меншу, ніж інгібітор ННТР33 ($R^4 = C_6H_4COOH-m$) (IC_{50} 1,5 мкМ та 0,008 мкМ, відповідно). На порядок вищу активність мають сполуки ННТР23 та ННТР25 із $R^4 = C_6H_4COOH-m$, порівняно з сполуками ННТР22 та ННТР24, в яких $R^4 = C_6H_4COOH-p$. Їх інгібувальні активності становлять 0,01 мкМ, 0,065 мкМ та 0,65 мкМ, 1,1 мкМ, відповідно. Слід зауважити, що додаткові замісники в карбоксифенільному радикалі, які вводилися до ароматичного кільця з метою підсилення кислотних властивостей карбоксильної групи, зменшують активність сполук. Наприклад, інгібітор ННТР34, який містить в карбоксифенільному заміснику додаткову гідроксильну групу має $IC_{50} = 0,31$ мкМ, тоді як сполука ННТР33 із $R^4 = C_6H_4COOH-m$ – 0,008 мкМ.

За допомогою аналізу комплексів похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти (ННТР19-ННТР40) із СК2 (рис. 5.9), побудованих методом молекулярного моделювання, вдалося пояснити, чому сполуки з карбоксифенільним замісником мають кращу інгібувальну активність порівняно з похідними (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та сполуками ННТР1-ННТР18. Як і очікувалося, ароматичне кільце замісника R^4 приймає участь в стекінг-взаємодії з Phe113, а його оптимальна довжина сприяє утворенню сполуками водневих зв'язків одночасно в двох протилежних ділянках активного сайту: з Val116 (шарнірна ділянка) та Lys68 і/або Asp175 (область зв'язування фосфатного залишка молекули АТФ).

Менш значний вплив на інгібувальну активність похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти продемонстрували замісники R^1 та R^2 . Залежність активності сполук від R^1 за умови, що $R^4 = C_6H_4COOH$, можна подати у вигляді: $C_6H_5 < 4-ClC_6H_4 \leq 4-CH_3C_6H_4$. Незначний вплив замісника R^2 на активність інгібіторів доводять сполуки ННТР24 ($R^2 = H$) та ННТР30 ($R^2 = CH_3$), що мають приблизно однакову інгібувальну активність – 1,1 мкМ та 1,5 мкМ, відповідно. Варто відмітити, що за даними докінгу замісники R^1 та R^2 орієнтовані

на вихід із АТФ-зв'язувального сайту та майже не приймають участь у міжмолекулярних взаємодіях, що і пояснює їх незначний вплив на здатність сполук пригнічувати активність СК2.

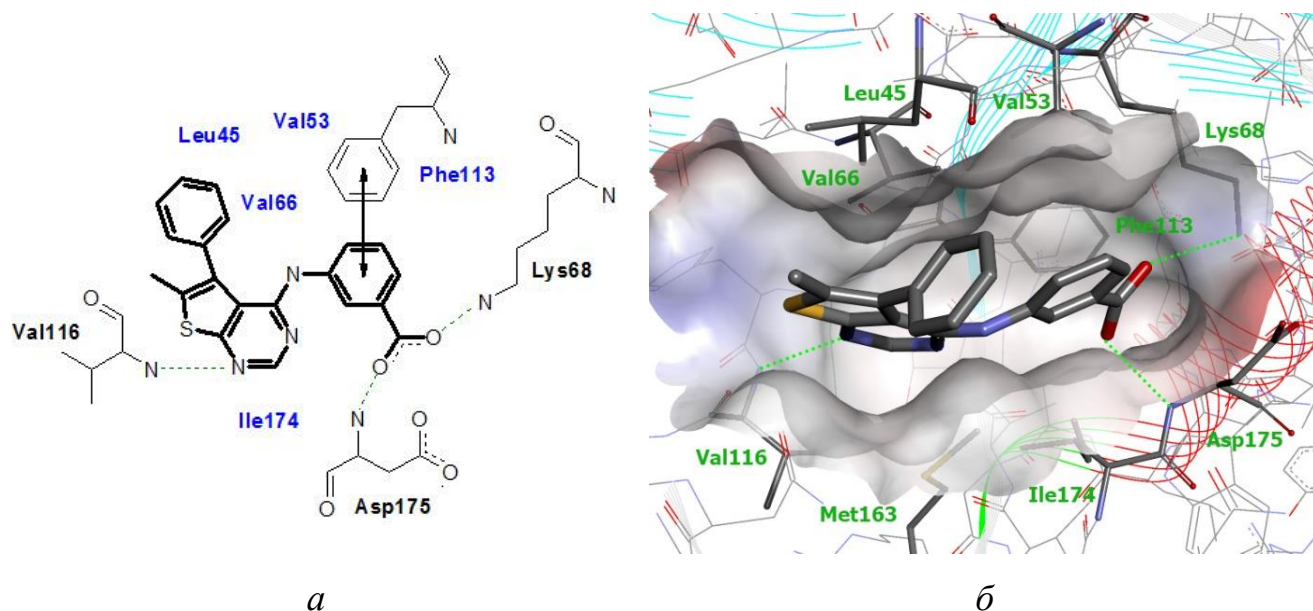


Рис. 5.9. Інгібітор NHTR33 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активним сайтом протеїнкінази СК2 (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *б* – загальний вигляд комплексу «NHTR33 - СК2» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією)

В якості замісника R^3 , що знаходиться в другій позиції тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу, всі сполуки містять водень або метильну групу. Варто відмітити, що присутність залишка метилу негативно впливає на активність лігандів, що видно при порівнянні інгібувальної активності сполук NHTR21 та NHTR28, показник IC_{50} яких становить 0,26 мкМ та 1,5 мкМ, відповідно. Оскільки замісник R^3 в комплексах із СК2 орієнтується в напрямку шарнірної ділянки

АТФ-зв'язувального сайту, то присутність навіть незначної за розмірами групи в цій позиції, може сприяти створенню стеричних перешкод для формування водневого зв'язку між лігандом та Val116, що може призвести до зменшення інгібувальної активності сполук. Більш об'ємні замісники R³, ймовірно, призведуть до цілковитої деактивації інгібіторів.

Отже, для похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти оптимальним замісником R⁴ є C₆H₄COOH-*m*. Цей замісник не лише запобігає утворенню внутрішньомолекулярних водневих зв'язків, що призводять до зменшення/зникнення інгібувальної активності сполук, а й утворює стекінг-взаємодію з Phe113, що сприяє кращій фіксації ліганду в АТФ-акцепторній кишені протеїнази СК2.

Висновки:

1. Досліджено 18 сполук з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти. Знайдено два інгібітори протеїнази СК2 з IC₅₀ 9,5 мкМ та 16 мкМ;

2. Проаналізовано залежність «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти та отримано комплекси сполук з СК2. Ґрунтуючись на отриманих результатах зроблено припущення щодо причини зникнення активності досліджуваних сполук порівняно з їх структурними аналогами – (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілітіо)карбоновими кислотами. Вона полягає в здатності похідних 4-амінотієно[2,3-d]піримідину з R⁴ = -N-(CH₂)_n-COOH утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок;

3. Завдяки проведеній хімічній оптимізації отримано 13 нових інгібіторів СК2. Показник IC₅₀ найактивнішого інгібітору ННТР33 становить 0,008 мкМ;

4. Досліджено кінетичні характеристики найбільш активних інгібіторів (ННТР23 (K_i = 4,5 нМ), ННТР25 (K_i = 12,7 нМ) та ННТР33 (K_i = 4 нМ)) та встановлено, що вони є селективними щодо СК2 на панелі з 7 протеїназ;

5. Встановлено тип зв'язування оптимізованих похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Стабілізація комплексів «ліганд - рецептор» відбувається за рахунок утворення гідрофобних контактів із амінокислотними залишками Val53, Val66, Ile95, Phe113, Val116, Met163 і Ile174 та водневим зв'язкам із Val116, Lys68 і Asp175;

6. Встановлено, що важливою умовою прояву інгібувальної активності сполук цього класу є наявність у четвертому положенні тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу *m*-амінобензойної кислоти, що може бути використано для подальшого дизайну інгібіторів СК2.

Основні результати розділу опубліковано в праці:

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-тієно[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. Ярмолюк (UA); заявник Ін-т мол. біол. і ген. НАНУ (UA). - № u201307516; заявл. 13.06.2013; опубл. 10.12.2013, Бюл. № 23 // Пат. UA86041, С07D215/00, А61Р35/00, 2013-12-10.

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 З РІЗНИХ ХІМІЧНИХ КЛАСІВ НА ЇЇ КАТАЛІТИЧНИХ СУБОДИНИЦЯХ СК2 α І СК2 α'

6.1. Визначення впливу інгібіторів протеїнкінази СК2 на активність її каталітичних субодиниць

Ця частина роботи присвячена визначенню інгібувальної активності сполук з різних хімічних класів на каталітичних субодиницях протеїнкінази СК2 (СК2 α та СК2 α'). Мета цього дослідження полягала в виявленні серед найефективніших з розроблених інгібіторів сполук, які специфічно взаємодіють з СК2 α або СК2 α' . Пошук ізоформно-специфічних інгібіторів СК2 є актуальним і перспективним, оскільки доведено, що окремі каталітичні субодиниці протеїнкінази мають різні функції в здоровому організмі та при патологіях (див. розділ 1 «Огляд літератури»).

Обрані для біохімічних тестів *in vitro* сполуки є попередньо розробленими інгібіторами з класів: 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазоли, 4'-гідроксифлаволи, 4'-карбоксифлавоноли, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонові кислоти, (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонові кислоти та інших відомих інгібіторів СК2 – похідних 4,5,6,7-тетрагалогено-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діону [194] і 3-карбокси-4(1H)-хінолону [195]). Всі досліджувані сполуки є АТФ-конкурентними інгібіторами, їх показник IC₅₀ становить 0,004-1 мкМ (табл. 6.1).

Тестування сполук *in vitro* проводили на рекомбінантних білках СК2 α та СК2 α' . Методи їх отримання та спосіб очищення описано в розділі 2 «Матеріали і методи досліджень». Чистоту отриманих білків підтверджено за допомогою гелъ-

електрофорезу (рис. 6.1, *a*, *б*). Варто відмітити, що на електрофореграммі для СК2 α субодиниці (рис. 6.1, *a*) ідентифіковано дві білкові смуги замість однієї, що вказує на протеоліз білка під час процедури очищення. Це відома характерна особливість рекомбінантної форми СК2 α , яку отримують в гетерологічних системах методом одностадійної хроматографії. Причини розпаду рекомбінантного білка СК2 α на класичний дуплет досліджено та детально описано в працях [204, 205]. Електрофореграмму, отриману для рекомбінантного білка СК2 α' наведено на рис. 6.1, *б*, подібні результати було одержано L. Vodenbach з колегами [56].

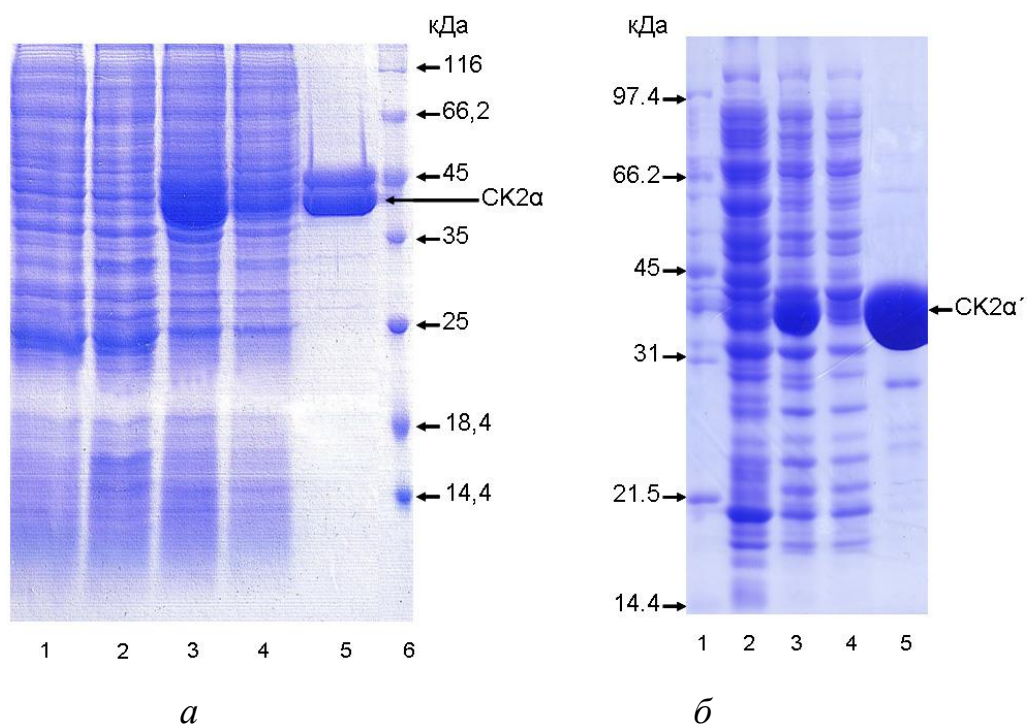


Рис. 6.1. Електрофореграмма рекомбінантних білків: *a* – СК2 α : 1 – фракція білків після лізису, що містить цільовий продукт; 2, 3 – білкові лізати клітин *E. coli* BL21 Rosetta (DE3), що культивували на середовищі LB без індуктора експресії (ШТГ) та з ним, відповідно; 4 – проскок; 5 – рекомбінантний білок після очищення; 6 – маркер. *б* – СК2 α' : 1 – маркер; 2, 3 – білкові лізати клітин *E. coli* BL21 Rosetta (DE3), що культивували на середовищі LB без індуктора експресії (ШТГ) та з ним, відповідно; 4 – проскок; 5 – рекомбінантний білок після очищення

Результати експерименту з визначення активності одержаних рекомбінантних білків каталітичних субодиниць СК2 зображено на рис. 6.2. Встановлено, що СК2 α' є майже в шість разів активнішою за СК2 α .

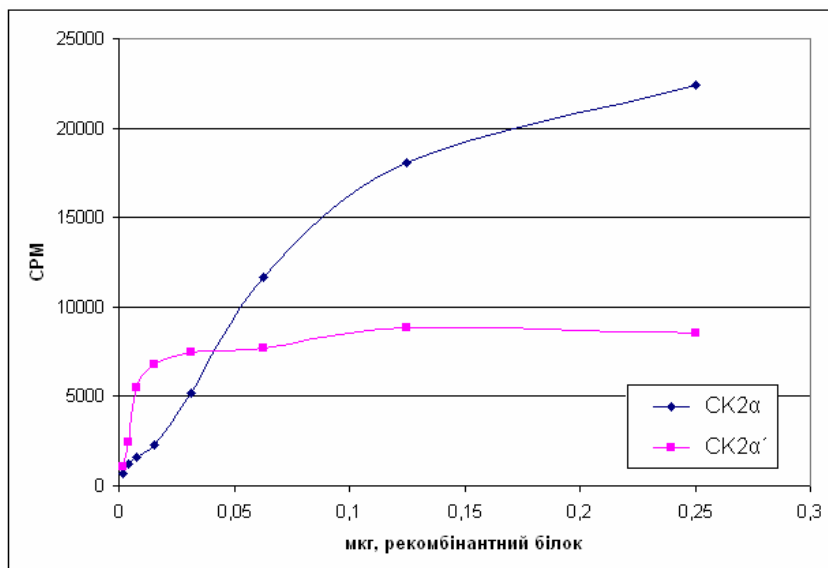
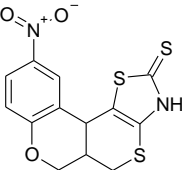
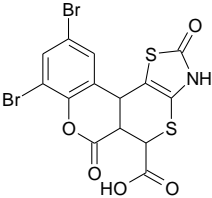
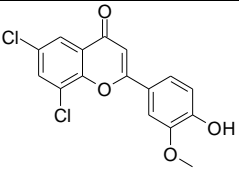
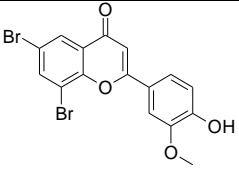
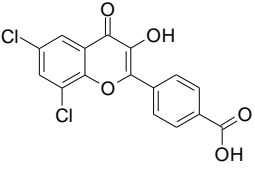
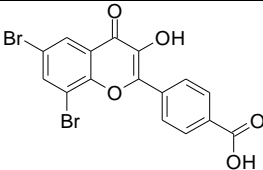
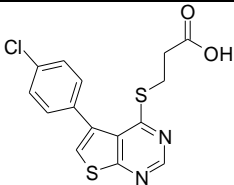
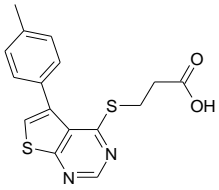
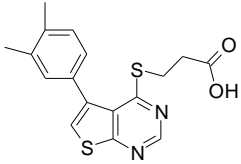
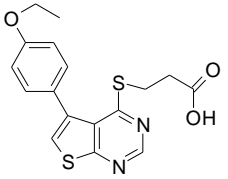
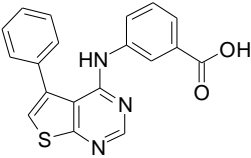
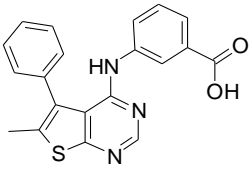
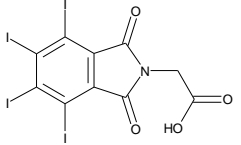
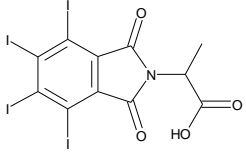
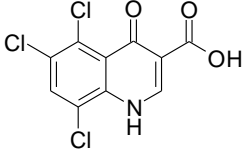


Рис. 6.2. Активність рекомбінантних білків СК2 α та СК2 α' (залежність ступеня фосфорилування субстрату від кількості білка)

Результати біохімічних тестів *in vitro* інгібіторів СК2 на холоензимі СК2 та каталітичних субодиницях (СК2 α та СК2 α') представлено в табл. 6.1. Встановлено, що інгібітори з класів 3-карбоксі-4(1H)-хінолону (сполука 7), 4,5,6,7-тетрагалогено-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діону (сполуки 43, 46) та (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонових кислот (сполуки 5p, 6a, 6b, 6d) краще пригнічують активність субодиниці СК2 α , тоді як похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу (сполуки ТТТ1, ТТТ5) та 4'-карбоксіфлавонолу (сполуки FLC21, FLC26) – активність СК2 α' . Для (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот (сполуки ННТР23, ННТР25, ННТР33) та 4'-гідроксифлавонів (сполуки FНН68, FНН79) ситуація виявилась не однозначною: одні сполуки краще пригнічують активність СК2 α , інші – СК2 α' . В цілому, показник IC₅₀ інгібіторів для каталітичних субодиниць СК2 відрізняється в 1,6-6,7 разів, найбільшу різницю продемонстрували похідні флавонолу.

Хімічні структури інгібіторів СК2 і результати їх біохімічного тестування (IC₅₀, мкМ) на холоензимі та СК2α та СК2α' каталітичних субодиницях

Інгібітор	Хімічна структура сполук	IC ₅₀ , мкМ		
		СК2 (ααββ)	СК2α	СК2α'
1	2	3	4	5
TTT1		1	3,3	1,48
TTT5		0,2	1,4	0,4
FNH68		0,01	0,005	0,003
FNH79		0,004	0,003	0,006
FLC21		0,04	0,016	0,003
FLC26		0,009	0,02	0,003
5p		0,175	0,08	0,2

1	2	3	4	5
6a		0,1	0,16	0,32
6b		0,175	0,07	0,25
6d		0,125	0,11	0,63
NHTP25		0,065	0,04	0,2
NHTP33		0,008	0,02	0,005
43		0,3	0,12	0,45
46		0,15	0,1	0,16
7		0,3	0,25	0,52

Однією з сполук, що виявилася найбільш ізоформно-селективною є 4-(6,8-дибromo-3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-2-іл)бензойна кислота (FLC26). Цей

інгібітор пригнічує активність СК2 α' в 6 разів краще, ніж активність СК2 α (показник IC₅₀ для СК2 α становить 0,02 мкМ, для СК2 α' – 0,003 мкМ).

6.2. Встановлення типу зв'язування інгібітору FLC26 з СК2 α та СК2 α'

З метою виявлення причини прояву різної інгібувальної активності однієї сполуки щодо різних каталітичних субодиниць СК2, було побудовано комплекси «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α' » методом молекулярного докінгу (рис. 6.3). Слід зазначити, що шарнірні ділянки АТФ-акцепторних сайтів цих ізоформ у людини відрізняються кількома амінокислотними залишками (СК2 α : His115–Val116; СК2 α' : Tyr116–Phe117) [48]. Утворення водневих зв'язків між лігандом і амінокислотами цієї області є передумовою прояву високих інгібувальних активностей сполуками [53].

В результаті аналізу отриманих комплексів «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α' » було встановлено, що відмінність в амінокислотних залишках активних сайтів каталітичних субодиниць СК2 не впливає на положення досліджуваних лігандів. Показано, що інгібітор FLC26 є комплементарним до АТФ-зв'язувальних кишень СК2 α та СК2 α' і утворює низку гідрофобних контактів та водневих зв'язків. В активному сайті СК2 α він має гідрофобні контакти з Leu45, Val66, Phe95, Phe113, Val116, Met163 та Phe174 (рис. 6.3, а, б). Крім цих взаємодій інгібітор утворює чотири міжмолекулярні водневі зв'язки. Перший – має місце між атомом Оксигену в четвертій позиції гетероциклу 4'-карбоксифлавонолу і Нітрогену головного ланцюга Val116 локалізованого в шарнірній ділянці АТФ-акцепторної кишені СК2 α . Другий водневий зв'язок утворюється між 3-гідроксильною групою інгібітору і основним ланцюгом Glu114. Третій та четвертий зв'язки формуються у фосфат-зв'язувальній ділянці активного сайту кінази завдяки атомам Оксигену СООН-групи ліганду і атомам Нітрогену бічного ланцюга Lys68 та головного ланцюга Asp175.

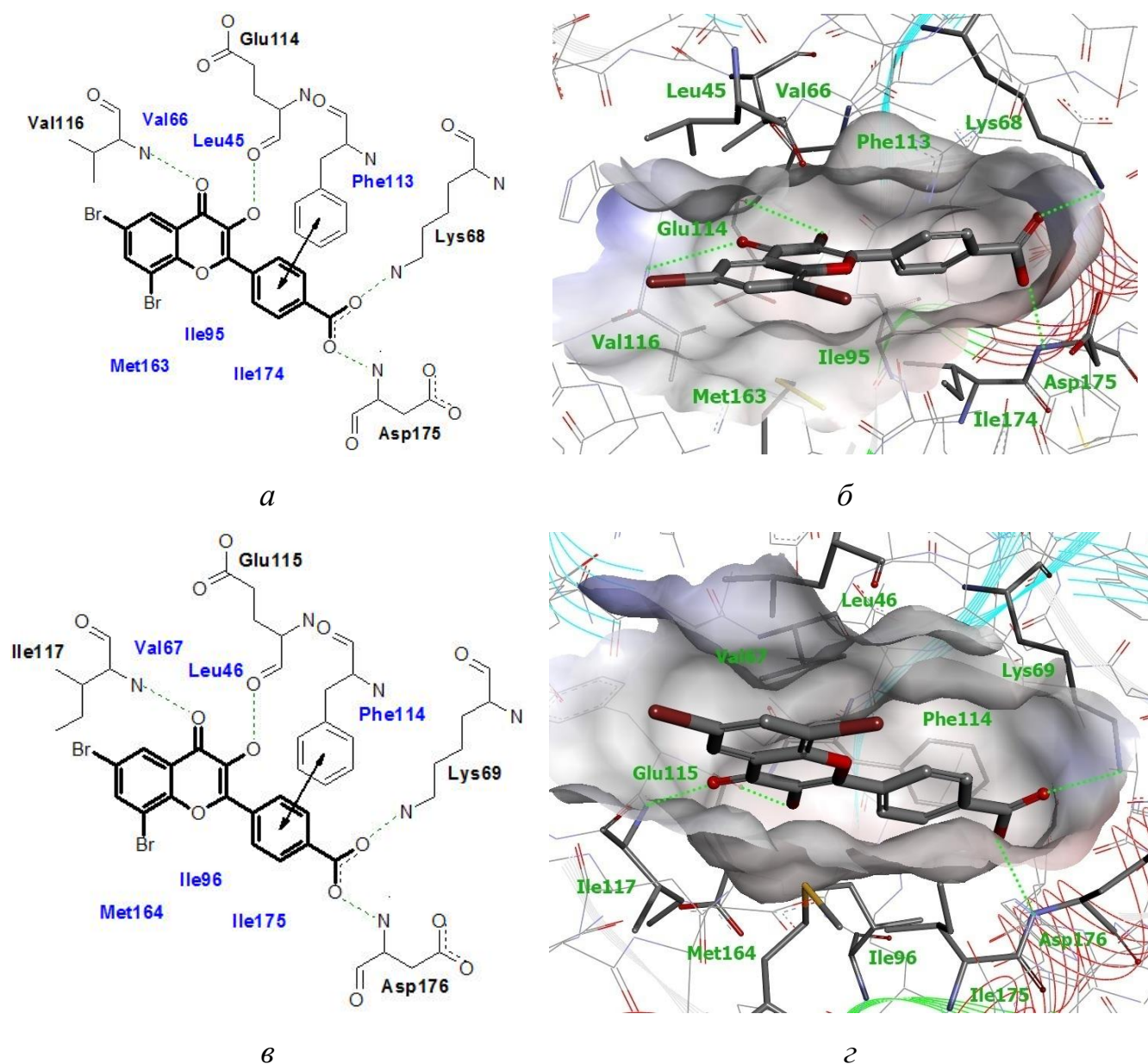


Рис. 6.3. Інгібітор FLC26 в АТФ-зв'язувальному сайті CK2α (*a*, *b*) та CK2α' (*c*, *d*) (модель комплексу отримано методом молекулярного докінгу): *a*, *c* – схематичне зображення типу зв'язування сполуки з активними сайтами каталітичних субодиниць (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію); *b*, *d* – загальний вигляд комплексів «інгібітор FLC26 - CK2α» та «інгібітор FLC26 - CK2α'» (водневі зв'язки зображено зеленою пунктирною лінією), відповідно

В активному сайті $CK2\alpha'$ інгібітор FLC26 фіксується за рахунок гідрофобних контактів із аналогічними амінокислотними залишками (Leu46, Val67, Ile96, Phe114, Ile117, Met164, Ile175) (рис. 6.3, в, з). Водневі зв'язки утворюються за участі амінокислотних залишків Ile117, Glu115, Lys69 та Asp176 із тими самими атомами ліганду, що і у випадку комплексу «інгібітор FLC26 - $CK2\alpha$ ».

6.3. Аналіз комплексів інгібітору FLC26 з АТФ-акцепторними сайтами $CK2\alpha$ та $CK2\alpha'$ методом молекулярної динаміки

Моделювання молекулярної динаміки комплексів «інгібітор FLC26 - $CK2\alpha$ » та «інгібітор FLC26 - $CK2\alpha'$ » проводили у водному оточенні протягом 10 нс. Криві, що відображають середньоквадратичне відхилення (СКВід) інгібітору FLC26 від стартової позиції свідчать про те, що обидва комплекси є стабільними, тенденцію до дисоціації не помічено (рис. 6.4).

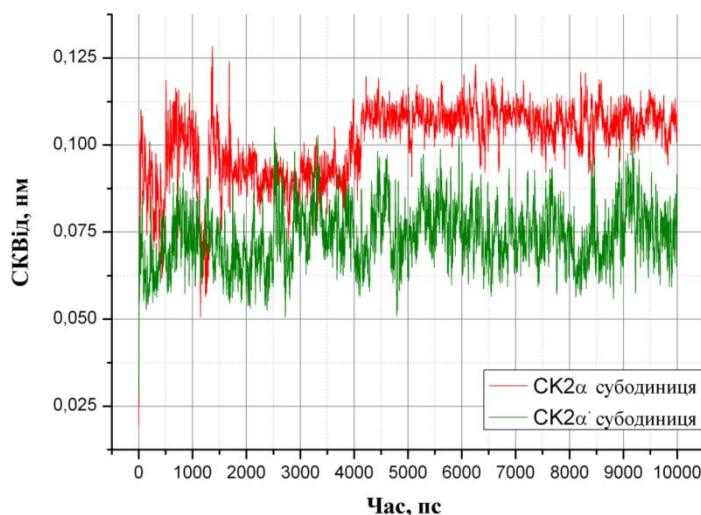


Рис. 6.4. Середньоквадратичне відхилення (СКВід) інгібітору FLC26 від стартової позиції в комплексі з $CK2\alpha$ (червоний колір) та $CK2\alpha'$ (зелений колір) протягом моделювання молекулярної динаміки (вирівнювання проводили за допомогою згладжувального фільтра Савицького-Голая, 13 кроків)

На рис. 6.5, *а* зображено еволюцію водневих зв'язків, сформованих між інгібітором FLC26 та СК2 α протягом моделювання молекулярної динаміки. Водневі зв'язки виникають між інгібітором і п'ятьма амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту каталітичної субодиниці, серед яких зв'язки з Val116, Lys68 та Asp175 є стабільними. В той час, зв'язки за участі атомів Оксигену карбонільної групи в 4-му положенні хроменоного гетероциклу ліганду і Оксигену головного ланцюга Glu114 та Оксигену в 3-й позиції і Оксигену бічного ланцюга Ser51 виникають періодично на кілька пс.

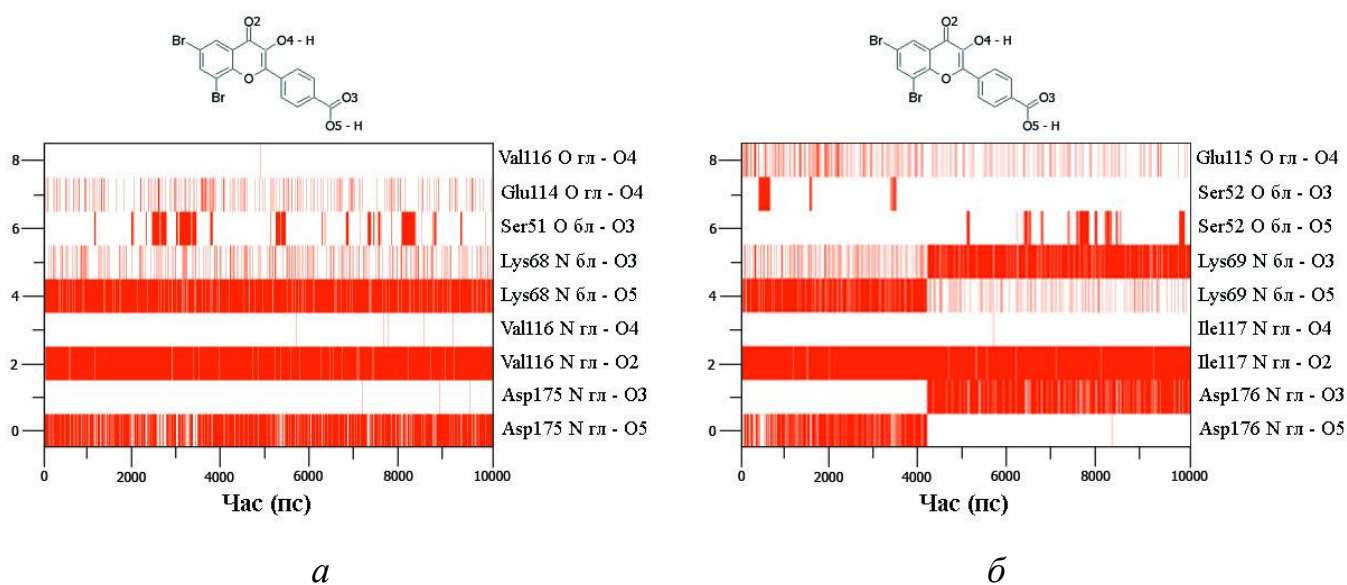


Рис. 6.5. Карта наявності міжмолекулярних водневих зв'язків: *а* – комплекс «інгібітор FLC26 – СК2 α »; *б* – комплекс «інгібітор FLC26 – СК2 α' ». Білим кольором відмічено відсутність водневого зв'язку, червоним – присутність водневого зв'язку, гл – головний ланцюг амінокислотного залишку, бл – бічний ланцюг амінокислотного залишку

Дещо відмінна ситуація спостерігається для молекулярної динаміки комплексу «інгібітор FLC26 - СК2 α' » (рис. 6.5, *б*). На початку динаміки відбувається формування водневих зв'язків між п'ятим атомом Оксигену ліганду та атомами Нітрогену головного ланцюга Asp176 і бічного ланцюга Lys69. Однак, починаючи приблизно з 4100 пс відбувається обертання карбоксильної групи і

утворення двох нових зв'язків (O3 - Asp176(N) та O3 - Lys69(N)), які зберігаються до кінця динаміки. Зв'язок із атомом Нітрогену Pe117 та атомом Оксигену хроменону є стабільним протягом усього часу. Водневі зв'язки ліганду з Glu115 та Ser52 мають поведінку подібну до зв'язків із Glu114 та Ser51 комплексу «сполука FLC26 - СК2 α '».

Описана мережа водневих зв'язків (рис. 6.5, *a*, *б*) добре корелює з кривими сумарних енергій електростатичних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій (рис. 6.6, *a*, *б*). Значні зниження кривих енергії взаємодії інгібітору FLC26 із СК2 α та СК2 α ' субодинацями (до -375 кДж/Моль) протягом моделювання молекулярної динаміки, ймовірно, пов'язане з виникненням та розривом водневих зв'язків між атомами Оксигену карбоксильної групи ліганду та амінокислотними залишками Ser51 (СК2 α) та Ser52 (СК2 α '), відповідно. Ці дані свідчать про важливу роль цього міжмолекулярного водневого зв'язку в існуванні комплексів «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α '».

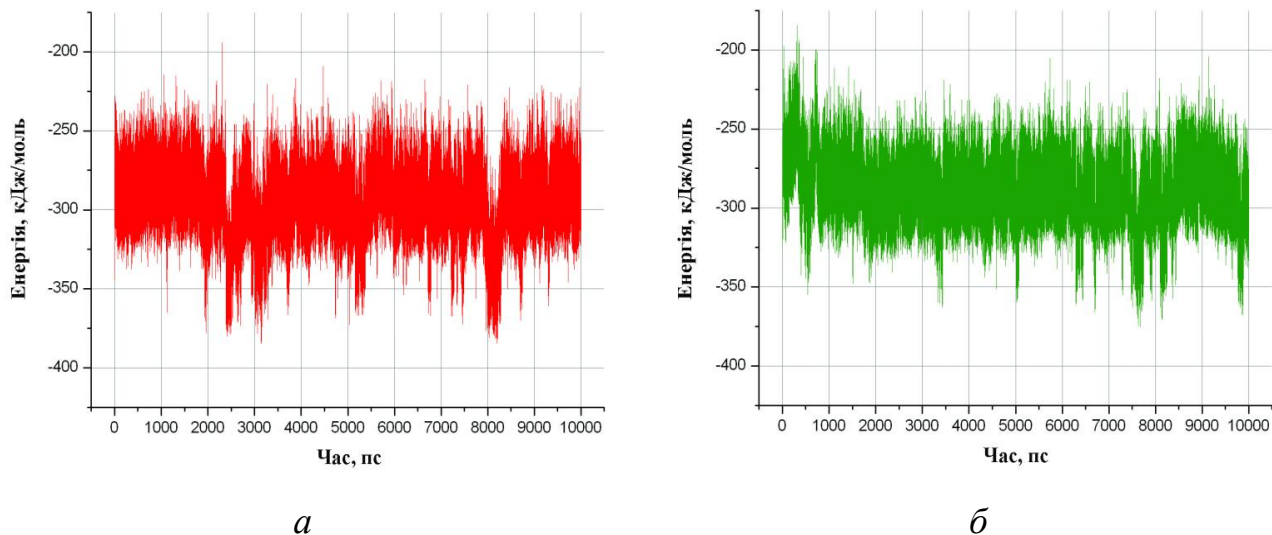


Рис. 6.6. Сума енергій електростатичних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій протягом моделювання молекулярної динаміки (вирівнювання проводили за допомогою згладжувального фільтра Савицького-Голая, 13 кроків): *a* – комплекс «інгібітор FLC26 – СК2 α »; *б* – комплекс «інгібітор FLC26 – СК2 α '»

Тип зв'язування інгібітору FLC26 з активними сайтами CK2 α та CK2 α' , розрахований за допомогою молекулярної динаміки (рис. 6.7, *a*, *б*) має незначні відмінності порівняно з типом зв'язування, отриманим за допомогою докінгу (рис. 6.3). У комплексах «інгібітор FLC26 – CK2 α » та «інгібітор FLC26 – CK2 α' » молекулярна динаміка ідентифікувала додаткові водневі зв'язки із амінокислотними залишками Ser51 та Ser52, відповідно.

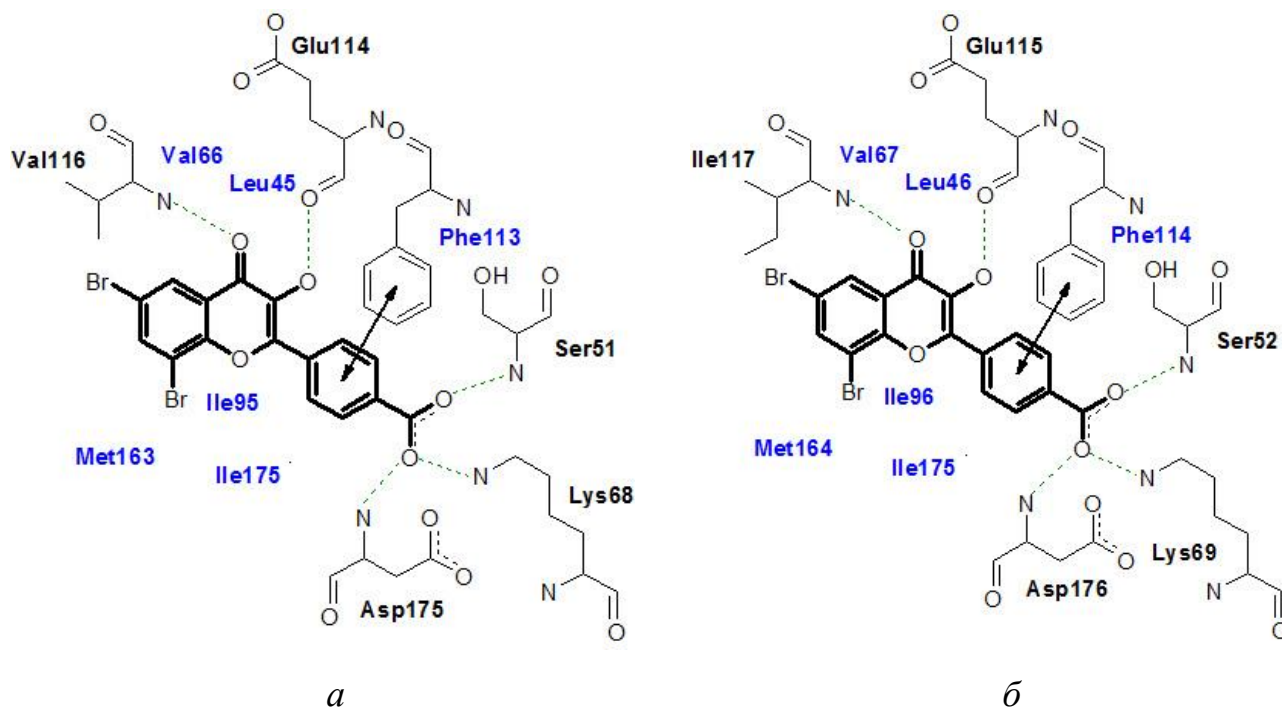


Рис. 6.7. Тип зв'язування інгібітору FLC26 із АТФ-зв'язувальними сайтами каталітичних субодиниць CK2 α (*a*) та CK2 α' (*б*), отриманий за допомогою моделювання молекулярної динаміки (синім кольором відмічено амінокислотні залишки, які приймають участь в утворенні гідрофобних контактів; чорним кольором – амінокислотні залишки, з якими ліганд формує водневі зв'язки; зеленою пунктирною лінією – водневі зв'язки; стрілкою – стекінг-взаємодію)

Отже, відмінність в амінокислотних залишках каталітичних субодиниць CK2 не призводить до зміни положення інгібітору FLC26 в активних сайтах CK2 α та CK2 α' чи до утворення водневих зв'язків з різними амінокислотними залишками, що було підтверджено методами молекулярного моделювання.

Висновки:

1. Одержано рекомбінантні білки СК2 α та СК2 α' каталітичних субодиниць. Отримані ензими є активними, при цьому СК2 α' субодиниця є майже в шість разів активнішою за СК2 α ;

2. Досліджено здатність найефективніших з розроблених інгібіторів СК2 специфічно пригнічувати активність СК2 α та СК2 α' . Найбільш ізоформно-селективним інгібітором є похідне 4'-карбоксифлавонолу (FLC26), він пригнічує активність СК2 α' в 6 разів краще, ніж активність СК2 α (показник IC₅₀ для СК2 α становить 0,02 мкМ, для СК2 α' – 0,003 мкМ);

3. Отримано комплекси «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α' » за допомогою молекулярного докінгу. Встановлено, що цей інгібітор є комплементарним до активних сайтів обох ізоформ та займає в них подібне положення. Стабілізація комплексів відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій з Leu45, Val66, Ile95, Phe113, Val116, Met163, Ile174 (СК2 α) та Leu46, Val67, Ile96, Phe114, Ile117, Met164, Ile175 (СК2 α'). Також інгібітор утворює чотири міжмолекулярні водневі зв'язки з Val116, Glu114, Lys68, Asp175 (СК2 α) та Ile117, Glu115, Lys69, Asp176 (СК2 α');

4. Досліджено комплекси «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α' » за допомогою молекулярної динаміки протягом 10 нс. Цим методом вдалося ідентифікувати додаткові водневі зв'язки між досліджуваним лігандом і амінокислотними залишками Ser51 (СК2 α) та Ser52 (СК2 α').

Основні результати розділу опубліковано в праці:

Вплив інгібіторів протеїнкінази СК2 на її каталітичні субодиниці СК2 α та СК2 α' / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук // Biotech. Acta. – 2014. – Т. 7, № 6. – С. 29-39.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ

Одним з ефективних підходів для вивчення ролі протеїнкіназ у внутрішньомолекулярному сигналінгу є розробка селективних інгібіторів. Це складний багатостадійний процес, який поєднує в собі досягнення в галузі комп'ютерних технологій, біоінформатики, хімії, фізики та медицини. Розроблені інгібітори не лише дозволяють вивчати функції білків-мішеней, проти яких вони спрямовані, а й можуть використовуватися для створення нових фармацевтичних препаратів для лікування патологічних станів, виникнення яких пов'язане зі змінами в нормальному функціонуванні тої чи іншої протеїнкінази.

До числа перших досліджених протеїнкіназ (відкрита понад 60 років тому) належить СК2 (казеїнкіназа). Цей ензим зустрічається в усіх еукаріотичних організмах та задіяний в регуляції великої кількості біохімічних функцій (на сьогодні описано понад 400 субстратів для СК2). СК2 бере участь у передачі сигналів, контролі клітинного циклу, має велике значення для життєздатності клітини і залучена в такі глобальні процеси, як синтез мРНК, тРНК і рРНК, виживання клітин, контроль клітинного росту, морфогенез та апоптоз [1]. Окрім того, значна кількість експериментальних даних вказує на те, що СК2 причетна до розвитку низки захворювань. Аномально високий рівень експресії СК2 характерний для таких типів пухлин, як аденокарцинома легені, меланома, колоректальна карцинома, рак молочної залози, простати, мозку і нирок [3]. Також СК2 задіяна у розвитку нейродегенеративних захворювань та захворювань судин, патофізіології скелетних м'язів і кісткової тканини, гіпертрофії серця та причетна до виникнення запальних і аутоімунних процесів [2] та ін.

Пошук ефективних інгібіторів протеїнкінази СК2 ведеться вже більше 20 років. Відомо, що її активність пригнічують сполуки, які належать до наступних

класів: бензімідазолу і бензотриазолу [8, 9], антрахінону [10], флуоренону [11], кумарину [12], флавоноїду [13], дибензофурандіолу [14], хіноліну [154], триазину [155], амінопіримідинону [156], азнафталіну [157], тієнопіримідинону [158], піразолотриазину [159] та ін. Останнім часом, актуальним стає пошук інгібіторів, які є специфічними до каталітичних субодиниць цього ензиму, оскільки з'являється все більше доказів того, що ці дві ізоформи мають різні функції в клітині та приймають незалежну одна від одної участь у розвитку окремих патологічних станів.

Тому, основна частина цієї роботи була присвячена пошуку та розробці нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 із застосуванням сучасних методів комп'ютерного моделювання. Завершальним етапом дослідження було перевірити найефективніші з розроблених інгібіторів на їх здатність специфічно пригнічувати активність СК2 α і СК2 α' каталітичних субодиниць.

Для розробки нових ефективних інгібіторів протеїнкінази СК2 було використано універсальний алгоритм (рис. 7.1). Він включав наступні етапи: рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторних бібліотек низькомолекулярних органічних сполук з різних хімічних класів; скринінг відібраних сполук *in vitro* та визначення їх показника IC₅₀ за допомогою біохімічних методів із використанням [γ -³²P]АТФ та люциферазної реакції; побудову та дослідження комплексів активних сполук із протеїнкіназою СК2 за допомогою методів молекулярного моделювання; встановлення взаємозв'язку між хімічною структурою та інгібувальною активністю знайдених інгібіторів; розробку моделі взаємодії знайдених низькомолекулярних інгібіторів із АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 на основі результатів аналізу комплексів «ліганд - СК2» та взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність»; вироблення рекомендацій для проведення хімічної оптимізації інгібіторів; визначення інгібувальної активності оптимізованих сполук; побудову та дослідження комплексів сполук-лідерів із активним сайтом СК2. Додатково проводилися кінетичні дослідження сполук та перевірялася їх здатність селективно

пригнічувати активність протеїнкінази СК2 на панелі з чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Aurora A та Rock1) та трьох тирозинових протеїнкіназ (FGFR1, c-Met і Tie2).

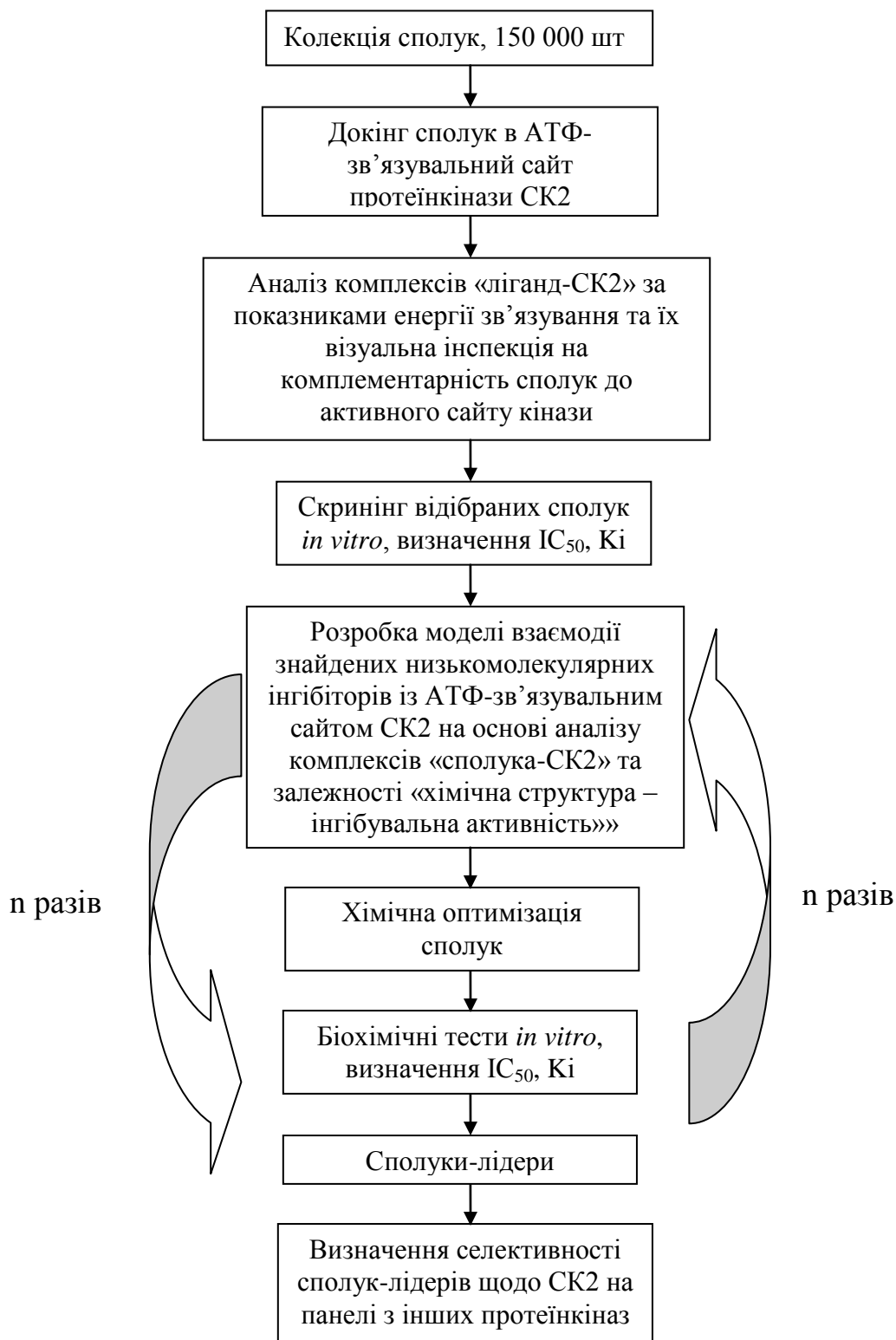


Рис. 7.1. Блок-схема процесу розробки інгібіторів протеїнкінази СК2

Отже, на першому етапі дисертаційного дослідження було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторних бібліотек низькомолекулярних органічних сполук (150 000 сполук) з різних хімічних класів за допомогою методу гнучкого докінгу. Докінг сполук було здійснено в АТФ-зв'язувальну кишеню каталітичної субодиниці СК2 людини (Protein Data Bank ID: 1JWH_A). В результаті віртуального скринінгу було ідентифіковано декілька перспективних класів сполук.

Спочатку було досліджено похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу. Ці сполуки привернули увагу, оскільки мають значний протипухлинний потенціал [187] і не заявлені як інгібітори протеїнкінази СК2. Для визначення інгібувальної активності *in vitro* було відібрано сім сполук. Біохімічні тести проводили за допомогою методу непрямой детекції протеїнкіназної активності (люциферазна реакція) [152]. Показник IC_{50} досліджуваних сполук становив 0,2-24,5 мкМ. Найактивнішою виявилась сполука ТТТ5 з $IC_{50} = 0,2$ мкМ.

Проведений аналіз залежності «хімічна структура - інгібувальна активність» похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу показав, що введення великих за розміром замісників в будь-яку позицію тіопіранотіазолового гетероциклу призводило до значного зменшення інгібувальної активності сполук.

При дослідженні комплексів інгібіторів із рецептором за допомогою методу молекулярного докінгу було показано, що стабілізація сполук в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 відбувалася за рахунок низки гідрофобних контактів і водневих зв'язків. Гідрофобні взаємодії виникали між лігандом та амінокислотними залишками Val53, Val66, Met163, Ile174 і Phe113 (стекінг-взаємодія), водневий зв'язок утворювався з Lys68, що знаходився в глибині сайту зв'язування АТФ. Кілька інгібіторів (сполуки ТТТ3 і ТТТ4) утворювали додатковий водневий зв'язок з амінокислотним залишком Leu45. Незважаючи на це, вони мали найменшу інгібувальну активність щодо СК2. Цей факт можна пояснити іншим положенням цих сполук в АТФ-зв'язувальному сайті, що спричинене їх більшим розміром порівняно з іншими досліджуваними лігандами. Це, в свою чергу, призводило до порушення гідрофобних контактів між

інгібіторами TTT3 і TTT4 та амінокислотними залишками Met163, Val66, а також до зникнення стекінг-взаємодії з Phe113. Найкращу інгібувальну активність сполуки TTT5, ймовірно, можна пояснити тим, що цей інгібітор має більшу афінність до активного сайту протеїнкінази СК2 завдяки двом атомам Брому.

Під час проведеного рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу комбінаторних бібліотек було ідентифіковано перспективні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних флавонолу. Ці сполуки привернули нашу увагу, оскільки є природними низько-токсичними речовинами з широким спектром біологічної активності [188]. Серед флавонолів відомі сполуки (апігенін, кверцетин, мірецетин, хризин, морин, фізетин тощо), які пригнічують активність протеїнкінази СК2 [13], але вони також ефективно взаємодіють із великою кількістю інших білків. Тому, основний інтерес було спрямовано на дослідження та розробку синтетичних похідних флавонолу, структуру яких можна змінювати в ході хімічної оптимізації. В результаті цього, активність та селективність сполук по відношенню до обраної мішені може бути значно покращено.

Для біохімічного скринінгу *in vitro* із використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, було відібрано 49 похідних флавонолу. Результати експерименту показали, що 19 сполук пригнічували активність протеїнкінази СК2 при концентрації менше ніж 30 мкМ. Найактивнішими виявились сполуки, які містили в 4' положенні флавонолу гідроксильну групу (FNH12, FNH13, FNH16 та FNH28). При цьому, інгібітор FNH28 (2-(4-гідрокси-3-метокси-феніл)-6,8-диметил-хромен-4-он, $\text{IC}_{50} = 0,1$ мкМ) пригнічував активність ензиму в 3 рази краще, ніж фізетин (найбільш активний інгібітор СК2 серед похідних флавонолу природного походження з $\text{IC}_{50} 0,35$ мкМ). Цей факт спонукав нас до подальшої оптимізації ідентифікованих похідних флавонолу.

Хімічну оптимізацію похідних флавонолу проводили з урахуванням результатів, отриманих в ході дослідження їх комплексів із СК2 та аналізу залежності «хімічна структура – інгібувальна активність». На основі цих даних було розроблено модель взаємодії сполук із АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази. Було показано, що стабілізації комплексів «ліганд - СК2» сприяє

низка гідрофобних контактів, які виникали між сполуками і 7-ма амінокислотними залишками (Leu45, Val53, Val66, Ile 95, Phe113, Met163 та Ile174) та два міжмолекулярні водневі зв'язки з Val116 та Lys68. Також нами було передбачено утворення додаткового водневого зв'язку між 4' гідроксильною групою флавону та головним ланцюгом Asp175. Ця взаємодія можлива за умови сприятливої локалізації відповідних донору та акцептору водню.

За даними молекулярного моделювання, здатність до утворення міжмолекулярних водневих зв'язків в глибині активного сайту СК2, продемонстрували сполуки з ОН-групою як в 4', так і в 3' позиціях. Тому, для з'ясування, яка з цих позицій є переважною для подальшої оптимізації, було додатково одержано і протестовано *in vitro* шість гідроксилвмісних похідних флавону. Після вивчення впливу замісників на інгібувальну активність отриманих сполук, для оптимізації було обрано структуру 4'-гідроксифлавону. З метою покращення афінності лігандів до АТФ-зв'язувального сайту СК2 вводили додаткові гідрофобні замісники в кільця А та В сполук. Також проводили підбір замісників в кільці В для підсилення кислотних властивостей 4'-гідроксильної групи флавону.

В результаті було розроблено 28 нових інгібіторів протеїнкінази СК2, 26 з них мали активність в субмікромольному діапазоні концентрацій. Найактивніші сполуки FNN68 та FNN79 мали АТФ-конкурентний тип зв'язування з активним сайтом ензиму (K_i 3,5 нМ та 1,8 нМ, відповідно) і продемонстрували селективність щодо СК2 на панелі з семи протеїнкіназ.

Проведений аналіз взаємозв'язку «хімічна структура - інгібувальна активність» та комплексів похідних 4'-гідроксифлавону з СК2 показав, що найбільшу активність мали інгібітори, в яких R^6 та $R^8 = Cl, Br$ та/або CH_3 . Ці замісники сприяли утворенню міцних гідрофобних контактів із амінокислотними залишками Leu45 та Val66. Сполуки, які мали замісники в *орто*-положенні до ОН-групи фенільного замісника, також краще пригнічували активність СК2: за участі цих груп похідні флавону утворювали водневі зв'язки з Lys68 та/чи Asp175 або гідрофобні контакти з Ile95 та Ile174. Стабілізації флавонового кору в

активному сайті протеїнкінази сприяли гідрофобні контакти з Val53, Ile95, Phe113, Met163, Ile174 та водневий зв'язок з Val116.

Варто зауважити, що розроблений в ході цього етапу досліджень інгібітор FNH79 є майже в сто разів активнішим за фізетин (найактивніший природний інгібітор з класу флавонів відомий на сьогодні).

За результатами рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, як перспективні інгібітори СК2, також було відібрано 13 карбоксилвмісних похідних флавону. В ході біохімічних тестів із використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, було встановлено, що активність протеїнкінази пригнічували сполуки з карбоксильною групою в 4' позиції. Їх показник IC_{50} знаходився в межах 0,6-8 мкМ. Ґрунтуючись на результатах, отриманих при дослідженні комплексів «сполука FLC - СК2» та аналізу залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», було розроблено модель зв'язування карбоксилвмісних похідних флавону з АТФ-акцепторним сайтом ензиму. Встановлено, що найбільш важливими замісниками в структурі досліджуваних сполук є гідроксильна група в 3-му положенні хроменону та 4'-карбоксильна група фенільного замісника, що приймали участь в утворенні водневих зв'язків із Val116 та Lys68 і/чи Asp175, відповідно. На цій підставі для подальшої оптимізації було обрано структуру 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонолу до якої вводили гідрофобні замісники.

В результаті оптимізації було одержано 13 похідних 4'-карбоксифлавонолу з $\text{IC}_{50} < 1$ мкМ. За допомогою кінетичних досліджень двох найактивніших похідних FLC21 та FLC26 було доведено АТФ-конкурентний тип зв'язування інгібіторів. Відповідні показники K_i становили 13 нМ та 2,5 нМ. Дослідження цих інгібіторів на селективність щодо СК2 показало, що протестовані сполуки здатні пригнічувати активність протеїнкіназ FGFR1, c-Met та Aurora A, щоправда не в такій мірі як активність СК2.

Аналізуючи дані тестів *in vitro* та структури замісників, було зроблено висновок, що найбільше на інгібувальну активність похідних 4'-карбоксифлавонолу впливає ступінь гідрофобності замісників в 6-й та 8-й позиції кільця А. Ці замісники сприяють додатковій стабілізації комплексів «інгібітор -

СК2» за рахунок утворення гідрофобних контактів із Leu45 та Val66. Окрім того, похідні 4'-карбоксіфлавонолу здатні утворювати водневі зв'язки одночасно з чотирма амінокислотними залишками (Val116, Glu114, Lys68 та Asp175), що знаходяться в протилежних ділянках активного сайту протеїнкінази.

Отже, завдяки виробленим рекомендаціям для хімічної оптимізації, активність ідентифікованих карбоксилвмісних похідних флавону вдалося покращити більш ніж у 50 разів.

Далі проводилося дослідження похідних тієно[2,3-d]піримідину. Відомо, що сполуки з цього класу проявляють імуномодулюючу, противірусну, нейротропну, протизапальну, анальгетичну, антиалергічну, протипухлинну, антибактеріальну, фунгіцидну дії [200] і пригнічують активність протеїнкіназ ErbB, PDGF, VEGFR-2, FLT3 та Tie2 [201-203]. Як інгібітори СК2 ці сполуки не зазначені. Оскільки, як неодноразово згадувалося вище, велика кількість інгібіторів протеїнкінази СК2 містить в своїй структурі COOH-групу [194, 195, 197, 198], мета подальших досліджень полягала в розробці активних і селективних інгібіторів СК2 на основі (тієно[2,3-d]піримідин)карбонової кислоти.

Спочатку вивчалися похідні (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти. За допомогою біохімічних тестів було встановлено, що 19 з 28 синтезованих *de novo* сполук пригнічували активність ензиму більше 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). Селективність сполук ба та бd щодо СК2 було встановлено *in vitro* на панелі з семи протеїнкіназ.

Вплив окремих замісників 4-меркаптотієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу на здатність сполук пригнічувати активність СК2 досліджували за допомогою аналізу залежності «хімічна структура - інгібувальна активність». Було встановлено, що найбільший вплив на інгібувальну активність похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти мав замісник R⁴. При цьому оптимальним було, коли в цій позиції знаходився залишок пропіонової кислоти.

В ході дослідження комплексів похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти з СК2 отриманих методом молекулярного докінгу, було встановлено, що всі сполуки з $IC_{50} < 1$ мкМ займали подібне положення в АТФ-зв'язувальній кишені ензиму. Ключовими взаємодіями, які сприяли фіксації лігандів в активному сайті СК2 були сили Ван-дер-Вальса, які виникали між інгібітором та низкою амінокислотних залишків (Leu45, Val53, Val66, Val116 та Ile174). На додаток, сполуки утворювали три міжмолекулярні водневі зв'язки з Val116, Lys68 та Asp175.

Висока інгібувальна активність досліджених похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти спонукала нас до розробки нових інгібіторів СК2 на основі похідних (тієно[2,3-d]піримідин)карбонової кислоти. Спочатку, одержали сполуки, які були структурними аналогами інгібіторів з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти, в яких залишок меркаптокарбонової кислоти замінено на залишок амінокарбонової кислоти. За допомогою біохімічних тестів *in vitro* було встановлено, що лише 2 інгібітори з 18 пригнічували активність СК2. Це – ННТР2 ($IC_{50} = 9,5$ мкМ) та ННТР5 ($IC_{50} = 16$ мкМ). При цьому, сполука ННТР7, яка була аналогом досліджуваної раніше сполуки 6a ($IC_{50} = 0,1$ мкМ), виявилася взагалі не активною.

Проведений аналіз комплексів похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти із АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 не надав пояснення причині відсутності інгібувальної активності одержаних сполук. Всі досліджувані ліганди розташовувалися в активному сайті протеїнкінази подібно до активних аналогів з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти.

Було висунуто припущення, що причина зникнення інгібувальної активності сполук полягала в утворенні внутрішньомолекулярного водневого зв'язку між атомом Нітрогену та Оксигену карбоксильної групи залишку $-N-(CH_2)_n-COOH$. Для перевірки запропонованої гіпотези одержали сполуки з замісником R^4 , структура якого не формувала внутрішньомолекулярний зв'язок, а саме: похідні (тієно[2,3-d]піримідину-4-іламіно)бензойної кислоти та 4-піперидин-1-іл-тієно[2,3-d]піримідину. Результати проведених біохімічних тестів *in vitro*

підтвердили висунуте припущення, оскільки більше половини отриманих сполук мали IC_{50} в діапазоні від 0,008 мкМ до 10 мкМ. За допомогою кінетичних досліджень найефективніших інгібіторів NHTP23, NHTP25 та NHTP33 було встановлено, що їх інгібувальна активність є результатом конкурентного зв'язування з молекулою АТФ в активному сайті протеїнкінази СК2 ($K_i = 4,5$ нМ, 12,7 нМ та 4 нМ, відповідно). Також ці сполуки продемонстрували селективність щодо СК2 на панелі з 7 протеїнкіназ.

За допомогою аналізу комплексів розроблених похідних (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти з АТФ-акцепторним сайтом СК2 було встановлено, що замісник $R^4 = C_6H_5COOH$ приймав участь у стекінг-взаємодії з Phe113 та мав оптимальну довжину для утворення сполуками водневих зв'язків з амінокислотними залишками одночасно в двох протилежних ділянках активного сайту ензиму. На інгібувальну активність сполук також впливала позиція карбоксильної групи у фенільному заміснику. Найбільшу активність продемонстрували сполуки з $R^4 = C_6H_4COOH-m$. Менший вплив на активність сполук мали замісники R^1 та R^2 . За даними докінгу вони орієнтувалися на вихід із АТФ-зв'язувальної кишені та майже не приймали участі в міжмолекулярних взаємодіях. Замісник R^3 розташовувався в напрямку шарнірної ділянки АТФ-зв'язувального сайту, тому його розмір може значно впливати на інгібувальні властивості сполук.

На кінцевому етапі дослідження було вивчено специфічність найактивніших з розроблених інгібіторів СК2 щодо СК2 α та СК2 α' . Тестування сполук *in vitro* проводили на рекомбінантних білках СК2 α та СК2 α' , які були власноручно отримані та очищені. За допомогою біохімічних тестів було встановлено, що активність субодиниці СК2 α ефективніше пригнічували сполуки з класу (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонові кислоти, тоді як активність СК2 α' – сполуки з класів 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу та 4'-карбоксифлавонолу. Для (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот та 4'-гідроксифлавонів ситуація виявилась не однозначною: одні сполуки краще інгібували СК2 α , інші – СК2 α' . В цілому, показник IC_{50} інгібіторів на окремих

каталітичних субодиницях СК2 відрізнявся в 1,6-6,7 разів. Однією зі сполук, що виявилася найбільш ізоформно-специфічною, була 4-(6,8-дибромо-3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)бензойна кислота (FLC26). Цей інгібітор пригнічував активність СК2 α' в 6 разів ефективніше порівняно з СК2 α (IC₅₀ для СК2 α становив 0,02 мкМ, для СК2 α' – 0,003 мкМ).

Для інгібітору FLC26 було отримано комплекси з СК2 α та СК2 α' за допомогою молекулярного докінгу. В ході їх вивчення було встановлено, що відмінність в амінокислотних залишках активних сайтів каталітичних субодиниць (СК2 α : His115–Val116; СК2 α' : Tyr116–Ile117) не впливала на положення досліджуваних лігандів. Всі інгібітори були комплементарними до АТФ-зв'язувальних кишень СК2 α і СК2 α' та утворювали низку гідрофобних контактів і водневих зв'язків. Зокрема, сполука FLC26 в активному сайті СК2 α мала гідрофобні контакти з Leu45, Val66, Ile95, Phe113, Val116, Met163 та Ile174. Окрім цих взаємодій інгібітор утворював чотири міжмолекулярні водневі зв'язки з Val116, Glu114, Lys68 та Asp175. В активному сайті СК2 α' сполука FLC26 фіксувалася за рахунок гідрофобних контактів із аналогічними амінокислотними залишками (Leu46, Val67, Ile96, Phe114, Ile117, Met164 та Ile175). Водневі зв'язки утворювалися за участі Ile117, Glu115, Lys69 та Asp176 із тими самими атомами ліганду, що і у випадку комплексу «інгібітор FLC26 - СК2 α' ».

Далі комплекси «інгібітор FLC26 - СК2 α » та «інгібітор FLC26 - СК2 α' » аналізували за допомогою моделювання молекулярної динаміки у водному оточенні протягом 10 нс. Було встановлено, що ці комплекси є стабільними в часі, тенденцію до дисоціації не помічено. Тип зв'язування інгібітору FLC26 з активними сайтами СК2 α та СК2 α' , розрахований за допомогою молекулярної динаміки, мав незначні відмінності порівняно з типом зв'язування, отриманим за допомогою докінгу. У комплексах «інгібітор FLC26 – СК2 α » та «інгібітор FLC26 – СК2 α' » молекулярна динаміка ідентифікувала додаткові водневі зв'язки із амінокислотними залишками Ser51 та Ser52, відповідно.

Проаналізувавши тип зв'язування всіх розроблених інгібіторів із АТФ-акцепторним сайтом СК2 можна зробити висновок, що найбільший енергетичний

внесок у стабілізацію комплексів «ліганд – рецептор» здійснювали гідрофобні взаємодії та сили Ван-дер-Ваальса, які залучали гідрофобну поверхню АТФ-акцепторної кишені СК2, сформовану залишками Leu85, Val95, Phe113, Ile174 (гідрофобний регіон I), Val53, Ile66, Val116, Met163 (аденін-зв'язувальний регіон) та Val45 (гідрофобний регіон II). Водневі зв'язки виникали між лігандами і шарнірною ділянкою (Glu114 і Val116) та/чи найглибшою частиною активного сайту протеїнкінази (Lys68 і Asp175).

Отже за допомогою методів комп'ютерного моделювання та біохімічних тестів *in vitro* було розроблено та охарактеризовано низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, 4'-гідроксифлавонолу, 4'-карбоксіфлавонолу, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілатіо)карбонової кислоти та (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонової кислоти. Найбільш активні інгібітори було перевірено на специфічність щодо каталітичних субодиниць СК2 – СК2 α та СК2 α' .

Показники K_i розроблених інгібіторів (FNH68, $K_i = 3,5$ нМ; FNH79, $K_i = 1,8$ нМ; FLC26, $K_i = 2,5$ нМ; NHTP23, $K_i = 4,5$ нМ та NHTP33, $K_i = 4$ нМ) мають значення наближене до константи інгібування інгібітору CX-4945 ($K_i = 0,38$ нМ), який знаходиться на II стадії клінічних досліджень. Отже, ці інгібітори можуть бути ефективними інструментами для вивчення ролі протеїнкінази СК2 і/або її каталітичних субодиниць в мережі сигнальних шляхів клітини та використовуватися як попередники фармацевтичних препаратів.

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_{50} 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_{50} =0,004-0,79 мкМ) на основі похідних флавону. Встановлено, що передумовою прояву високої інгібувальної активності сполук є наявність гідроксильної групи у 4' позиції флавону.

3. Ідентифіковано й оптимізовано нові інгібітори СК2 – 4'-карбоксифлавоноли. 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'-карбоксильної груп, які утворюють водневі 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-ілтіо)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-іламіно)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 α та СК2 α' . Найбільш ізоформно-специфічним інгібітором є похідне 4'-карбокифлавонолу FLC26, що пригнічує активність СК2 α' ($IC_{50}=0,003$ мкМ) у 6,7 раза ефективніше, ніж СК2 α ($IC_{50}=0,02$ мкМ).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Litchfield D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death / Litchfield. // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 369, № 1. – P. 1–15.
2. Guerra B. Protein kinase CK2 in human diseases / B. Guerra, O. Issinger. // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, № 19. – P. 1870–1886.
3. Protein kinase CK2 signal in neoplasia / S. Tawfic, S. Yu, H. Wang [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2001. – Vol. 16, № 2. – P. 573–582.
4. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors / S. Sarno, S. Moro, F. Meggio [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2002. – Vol. 93, № 2-3. – P. 159–168.
5. Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors / S. Sarno, M. Salvi, R. Battistutta [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1754, № 1-2. – P. 263–270.
6. ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update / S. Sarno, E. Papinutto, C. Franchin [et al.] // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 11, № 11. – P. 1340–1351.
7. Cozza G. Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review / G. Cozza, L. A. Pinna, S. Moro // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2012. – Vol. 22, № 9. – P. 1081–1097.
8. Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources / R. Szyszka, N. Grankowski, K. Felczak, D. Shugar // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 208, № 1. – P. 418–424.
9. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromobenzotriazole / R. Battistutta, E. De Moliner, S. Sarno [et al.] // *Protein Sci.* – 2001. – Vol. 10, № 11. – P. 2200–2206.

10. Yim H. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *rheum palmatum* selectively inhibits the activity of casein kinase II as competitive inhibitor / H. Yim, Y. Lee, S. K. Lee // *Planta Med.* – 1999. – Vol. 65, №1. – P. 9–13.

11. Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An in vitro and in vivo study / F. Meggio, M. A. Pagano, S. Moro [et al.] // *Biochem.* – 2004. – Vol. 43, № 40. – P. 12931–12936.

12. Coumarin as attractive casein kinase 2 (CK2) inhibitor scaffold: an integrate approach to elucidate the putative binding motif and explain structure-activity relationships / A. Chilin, R. Battistutta, A. Bortolato [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 21, №4. – P. 752–759.

13. Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight / G. Lolli, G. Cozza, M. Mazzorana [et al.] // *Biochem.* – 2012. – Vol. 51, №31. – P. 6097–6107.

14. Identification of a novel potent, selective and cell permeable inhibitor of protein kinase CK2 from the NIH/NCI Diversity Set Library / B. Guerra, J. Hochscherf, N. B. Jensen, O. G. Issinger // *Mol. Cell. Biochem.* – 2015. – doi: 10.1007/s11010-015-2433-z.

15. Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer / F. Pierre, P. C. Chua, S. E. O'Brien [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011. – Vol. 356, №1-2. – P. 37–43.

16. The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies / H. J. Chon, K. J. Bae, Y. Lee, J. Kim // *Front. Pharmacol.* – 2015. – doi: 10.3389/fphar.2015.00070.

17. Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution / K. Niefind, B. Guerra, L. A. Pinna [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17, № 9. – P. 2451–2462.

18. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme / K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, O. G. Issinger // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20, № 19. – P. 5320–5331.

19. Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners / D. W. Litchfield, D. G. Bosc, D. A. Canton [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 227, № 1-2. – P. 21–29.

20. A novel casein kinase 2 alpha-subunit regulates membrane protein traffic in the human hepatoma cell line HuH-7 / X. Shi, B. Potvin, T. Huang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 3. – P. 2075–2082.

21. The DNA sequence of human chromosome 22 / I. Dunham, N. Shimizu, B. A. Roe [et al.] // *Nature.* – 1999. – Vol. 402, № 6761. – P. 489–495.

22. Vertebrate pseudogenes / A. J. Mighell, N. R. Smith, P. A. Robinson, A. F. Markham // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 468, № 2-3. – P. 109–114.

23. Translated Alu sequence determines nuclear localization of a novel catalytic subunit of casein kinase 2 / P. Hilgard, T. Huang, A. W. Wolkoff, R. J. Stockert // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2002. – Vol. 283, № 2. – P. 472–483.

24. Cloning, expression and properties of the alpha' subunit of casein kinase 2 from zebrafish (*Danio rerio*) / M. Antonelli, J. L. Daniotti, D. Rojo [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – Vol. 241, № 1. – P. 272–279.

25. Chester N. Identification and characterization of protein kinase CKII isoforms in HeLa cells. Isoform-specific differences in rates of assembly from catalytic and regulatory subunits / N. Chester, I. J. Yu, D. R. Marshak // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 13. – P. 7501–7514.

26. Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity / E. Valero, S. De Bonis, O. Filhol [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 14. – P. 8345–8352.

27. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the α and α' subunits of casein kinase II / F. J. Lozeman, D. W. Litchfield, C. Piening [et al.] // *Biochemistry.* – 1990. – Vol. 29, № 36. – P. 8436–8447.

28. Subunit structure of casein kinase II from bovine testis: demonstration that the α and α' subunits are distinct polypeptides / D. W. Litchfield, F. J. Lozeman, C. Piening [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, № 13. – P. 7638–7644.

29. Casein kinase II. cDNA sequences, developmental expression and tissue distribution of mRNAs for α , α' and β subunits of the chicken enzyme / G. Maridor, W. Park, W. Krek, E. A. Nigg // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 4. – P. 2362–2368.

30. Glover III C. V. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae* / Glover III. // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 59. – P. 95–133.

31. Xu X. Murine protein kinase CK2 α' : cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping / X. Xu, E. S. Rich, D. C. Seldin // *Genomics.* – 1998. – Vol. 48, № 1. – P. 79–86.

32. A majority of CK2 α subunit is tightly bound to intranuclear compounds but not to the β subunit / J. Stigare, N. Buddelmeier, A. Pigon, E. Egyhazi // *Mol. Cell. Biol.* – 1993. – Vol. 129, № 1. – P. 77–85.

33. Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles / B. Guerra, S. Siemer, F. Boldyreff, O. G. Issinger // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 462, № 3. – P. 353–357.

34. Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes / M. Faust, J. Günther, E. Morgenstern [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59, № 12. – P. 2155–2164.

35. Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus / M. Faust, M. Jung, J. Günther [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011. – Vol. 227, № 1-2. – P. 73–80.

36. Особливості структури і функцій каталітичних субодиниць протеїнкінази CK2 – CK2 α і CK2 α' / О. В. Остринська, О. П. Кухаренко, В. Г. Бджола [та ін.] // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 38–58.

37. The human gene (CSNK2A1) coding for the casein kinase II subunit α is located on chromosome 20 and contains tandemly arranged Alu repeats / U. Wirkner, H. Voss, P. Lichter [et al.] // *Genomics.* – 1994. – Vol. 19, № 2. – P. 257–265.

38. Assignment of the human casein kinase II alpha' subunit gene (CSNK2A1) to chromosome 16 p13.2-p13.3 / T. L. Yang-Feng, T. Naiman, I. Kopatz [et al.] // *Genomics*. – 1994. – Vol. 19, № 1. – P. 173.
39. The protein kinase complement of the human genome / G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5600. – P. 1912–1934.
40. Cozza G. How druggable is protein kinase CK2? / G. Cozza, A. Bortolato, S. Moro // *Med. Res. Rev.* – 2010. – Val. 30, № 3. – P. 419–462.
41. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains / H. Yu, J. K. Chen, S. Feng [et al.] // *Cell*. – 1994. – Vol. 76, № 5. – P. 933–945.
42. Cohen G. B. Modular binding domains in signal transduction proteins / G. B. Cohen, R. Ren, D. Baltimore // *Cell*. – 1995. – Vol. 80, № 2. – P. 237–248.
43. Guerra B. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology / B. Guerra, O. G. Issinger // *Electrophoresis*. – 1999. – Vol. 20, № 2. – P. 391–408.
44. Penner C. G. Expression and localization of epitope-tagged protein kinase CK2 / C. G. Penner, Z. Wang, D. W. Litchfield // *J. Cell. Biochem.* – 1997. – Vol. 64, № 4. – P. 525–537.
45. The catalytic subunit of human protein kinase CK2 structurally deviates from its maize homologue in complex with the nucleotide competitive inhibitor emodin / J. Raaf, K. Klopffleisch, O. G. Issinger, K. Niefind // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 377, № 1. – P. 1–8.
46. Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit / I. Ermakova, B. Boldyreff, O. G. Issinger, K. Niefind // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 330, № 5. – P. 925–934.
47. Phosphorylation of casein kinase II by p34^{cdc-2}. Identification of phosphorylation sites using phosphorylation site mutants in vitro / D. G. Bosc, E. Slominski, C. Sichler, D. W. Litchfield // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 43. – P. 25872–25878.

48. Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis / M. K. Tarrant, H. S. Rho, Z. Xie [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 262–269.

49. Structure of human protein kinase CK2 alpha 2 with a potent indazole-derivative inhibitor / T. Nakaniwa, T. Kinoshita, Y. Sekiguchi [et al.] // *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2009. – Vol. 65. – P. 75–79.

50. Nelson J. Structure and function in cell signalling / Nelson. – England: John Wiley & Sons, Inc, 2008. – 377 p.

51. Pinna L. A. Protein kinase CK2 / Pinna. – England: John Wiley & Sons, Inc, 2013. – 484 p.

52. Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors / D.Fabbro, S. W. Cowan-Jacob, H. Mobitz, G. Martiny-Baron // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 795. – P. 1–34.

53. Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition / A. Backes, B. Zech, B. Felber [et al.] // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. 1409–1425.

54. The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules / R. Battistutta, M. Mazzorana, L. Cendron [et al.] // *Chembiochem.* – 2007. – Vol. 8, № 15 – P. 1804–1809.

55. Ghavidel A. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery / A. Ghavidel, M. C. Schultz // *Cell.* – 2001. – Vol. 106, № 5. – P. 575–584.

56. Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (alpha, alpha' and beta), site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme / L. Bodenbach, J. Fauss, A. Robitzki [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 220, № 1. – P. 263–273.

57. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells / C. Guo, S. Yu, A. T. Davis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 8. – P. 5992–5999.

58. Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint / K. E. Winkler, K. I. Swenson, S. Kornbluth, A. R. Means // *Science*. – 2000. – Vol. 287, № 5458. – P. 1644–1647.

59. Immunocytochemical localization of casein kinase II during interphase and mitosis / I. J. Yu, D. L. Spector, Y. S. Bae, D. R. Marshak // *J. Cell. Biol.* – 1991. – Vol. 114, № 6. – P. 1217–1232.

60. Cell growth stimulation by EGF: inhibition through antisense ligodeoxynucleotides demonstrates important role of casein kinase II / R. Pepperkok, P. Lorenz, R. Jakobi [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 1991. – Vol. 197, № 2. – P. 245–253.

61. Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit beta demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling / P. Lorenz, R. Pepperkok, W. Ansorge, W. Pyerin // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 4. – P. 2733–2739.

62. Casein kinase II is required for transition of G₀/G₁, early G₁, and G₁/S phases of the cell cycle / R. Pepperkok, P. Lorenz, W. Ansorge, W. Pyerin // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 9. – P. 6986–6991.

63. Molecular cloning of casein kinase II alpha subunit from *Dictyostelium discoideum* and its expression in the life cycle / U. Kikkawa, S. K. Mann, R. A. Firtel, T. Hunter // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 12, № 12. – P. 5711–5723.

64. Birnbaum M. J. The phosphotransferase activity of casein kinase II is required for its physiological function in vivo / M. J. Birnbaum, C. C. Glover // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – Vol. 181, № 2. – P. 524–528.

65. Ahmed K. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2 / K. Ahmed, D. A. Gerber, C. Cochet // *Trends Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 12, № 5. – P. 226–230.

66. Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae* / R. Padmanabha, J. L. Chen-Wu, D. E. Hanna, C. V. Glover // *Mol. Cell. Biol.* – 1990. – Vol. 10, № 8. – P. 4089–4099.

67. Inducible expression of protein kinase CK2 in mammalian cells. Evidence for functional specialization of CK2 isoforms / G.Vilk, R. B. Saulnier, R. St Pierre, D. W. Litchfield // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 20. – P. 14406–14414.

68. Inhibition of protein kinase CK2 expression and activity blocks tumor cell growth / D.Zhu, J. Hensel, R. Hilgraf, M. Abbasian // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 333, № 1-2. – P. 159–167.

69. Filhol O. Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex / O. Filhol, J. L. Martiel, C. Cochet. // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 351–355.

70. Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation / J. A. McElhinny, S. A. Trushin, G. D. Bren [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 16, № 3. – P. 899–906.

71. Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit / T. A. Bird, K. Schooley, S. K. Dower [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 51. – P. 32592–32597.

72. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II / D.Wang, S. D. Westerheide, J. L. Hanson, A. J. Baldwin // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 42. – P. 32592–32597.

73. Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity / S. A. Armstrong, D. A. Barry, R. W. Leggett, C. R. Mueller // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 21. – P. 13489–13495.

74. Borden P. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases / P. Borden, R. A. Heller // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7, № 1-2. – P. 159–178.

75. Casein kinase II induces c-fos expression via the serum response element pathway and p67SRF phosphorylation in living fibroblasts / C. Gauthier-Rouvière, M. Basset, J. M. Blanchard [et al.] // *EMBO J.* – 1991. – Vol. 10, № 10. – P. 2921–2930.

76. Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity / A. Lin, J. Frost, T. Deng [et al.] // *Cell.* – 1992. – Vol. 70, № 5. – P. 777–789.

77. Interferon-gamma stimulates the expression of the inducible cAMP early repressor in macrophages through the activation of casein kinase 2. A potentially novel pathway for interferon-gamma-mediated inhibition of gene transcription / J. R. Mead, T. R. Hughes, S. A. Irvine [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 20. – P. 17741–17751.

78. Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis / M. Yamada, S. Katsuma, T. Adachi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102, № 21. – P. 7736–7741.

79. A novel role of Sp1 and Sp3 in the interferon- γ -mediated suppression of macrophage lipoprotein lipase gene transcription / T. R. Hughes, T. S. Tengku-Muhammad, S. A. Irvine, D. P. Ramji // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 13. – P. 11097–11106.

80. Jones S. Casein kinase II (protein kinase CK2) regulates serotonin 5-HT(3) receptor channel function in NG108-15 cells / S. Jones, J. L. Yakel // *Neuroscience.* – 2003. – Vol. 119, № 3. – P. 629–634.

81. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2 / D. Boehning, C. Moon, S. Sharma [et al.] // *Neuron.* – 2003. – Vol. 40, № 1. – P. 129–137.

82. Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes / M. Quadroni, E. L. L'Hostis, C. Corti [et al.] // *Biochem.* – 1998. – Vol. 37, № 18. – P. 6523–6532.

83. Spinal CK2 regulates nociceptive signaling in models of inflammatory pain / X. Li, X. Shi, D. Y. Liang, J. D. Clark // *Pain.* – 2005. – Vol. 115, № 1-2. – P. 182–190.

84. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system / R. C. Axtell, L. Xu, S. R. Barnum, C. Raman // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 12. – P. 8542–8549.

85. Acceleration of lpr lymphoproliferative and autoimmune disease by transgenic protein kinase CK2 alpha / I. R. Rifkin, P. L. Channavajhala, H. L. Kiefer [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, № 10. – P. 5164–5170.

86. Wiemann C. Antibodies to casein kinase II in sera of patients with mixed connective tissue disease: evaluation with recombinant proteins / C. Wiemann, L. Bodenbach, W. Pyerin // *Clin. Chem.* – 1993. – Vol. 39, № 12. – P. 2492–1494.

87. Characterization of secretory type IIA phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the GL-induced inhibition of the CK-II-mediated stimulation of sPLA2-IIA activity in vitro / Y. Shimoyama, R. Sakamoto, T. Akaboshi [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2001. – Vol. 24, № 9. – P. 1004–1008.

88. The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor / N. Morvaknin, A. Punturieri, K. Sitwala [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 26, № 24. – P. 9484–9496.

89. Blanquet P. R. Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system / Blanquet. // *Prog. Neurobiol.* – 2000. – Vol. 60, № 3. – P. 211–246.

90. Martín M. E. Subcellular and regional distribution of casein kinase II and initiation factor 2 activities during rat brain development / M. E. Martín, A. Alcázar, M. Salinas // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 1990. – Vol. 8, № 1. – P. 47–54.

91. Meggio F. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? / F. Meggio, L. A. Pinna // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, № 3 – P. 349–368.

92. Aberrant casein kinase II in Alzheimer's disease / D. S. Iimoto, E. Masliah, R. DeTeresa [et al.] // *Brain Res.* – 1990. – Vol. 507, № 2. – P. 273–280.

93. Casein kinase II alteration precedes tau accumulation in tangle formation / E. Masliah, D. S. Iimoto, M. Mallory [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1992. – Vol. 140, № 2. – P. 263–268.

94. Localization of CKII subunits in Lewy bodies of Parkinson's disease / M. Y. Ryu, D. W. Kim, K. Arima [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2008. – Vol. 266, № 1-2. – P. 9–12.

95. The decreased level of casein kinase 2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients / M. V. Aksenova, G. S. Burbaeva, K. V. Kandror [et al.] // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 279, № 1. – P. 55–57.

96. Casein kinase II is associated with neurofibrillary tangles but is not an intrinsic component of paired helical filaments / L. Baum, E. Masliah, D. S. Iimoto [et al.] // *Brain Res.* – 1992. – Vol. 573, № 1. – P. 126–132.

97. Protein kinase CK2 is an inhibitor of the neuronal Cdk5 kinase / A. C.Lim, Z. Hou, C. P. Goh, R. Z. Qi // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 45. – P. 46668–46673.

98. Hughes B. R. Casein kinase II activity in the postischemic rat brain increases in brain regions resistant to ischemia and decreases in vulnerable areas / B. R. Hughes, T. Wieloch // *J. Neurochem.* – 1993. – Vol. 60, № 5. – P. 1722–1728.

99. Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization / A. V. Ljubimov, S. Caballero, A. M. Aoki [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45, № 12. – P. 4583–4591.

100. Expression of protein kinase CK2 in astroglial cells of normal and neovascularized retina / A. A. Kramerov, M. Saghizadeh, H. Pan [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 168, № 5. – P. 1722–1736.

101. Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia / U. S. Kayyali, C. Donaldson, H. Huang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 17. – P. 14359–14365.

102. Casein kinase 2 inhibition decreases hypoxia-inducible factor-1 activity under hypoxia through elevated p53 protein level / A. Hubert, S. Paris, J. P. Piret [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2006. – Vol. 119, № 16. – P. 3351–3362.

103. Phosphorylation of glycogen synthase by cyclic AMP-independent casein kinase-2 from rabbit skeletal muscle / K. P.Huang, E. Itarte, T. J. Singh, A. Akatsuka // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, № 6. – P. 3236–3242.

104. Phosphorylation of troponin and myosin light chain by cAMP-independent casein kinase-2 from rabbit skeletal muscle / T. J.Singh, A. Akatsuka, K. R. Blake, K. P. Huang // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1983. – Vol. 220, № 2. – P. 615–622.

105. The identification of the phosphorylated 150/160-kDa proteins of sarcoplasmic reticulum, their kinase and their association with the ryanodine receptor / V. Shoshan-Barmatz, I. Orr, S. Weil [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – Vol. 1283, № 1. – P. 89–100.

106. McConville J. Diseases of the neuromuscular junction / J. McConville, A. Vincent // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 2, №3. – P. 296–301.

107. Casein kinase 2-dependent serine phosphorylation of MuSK regulates acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction / T. Cheusova, M. A. Khan, S. W. Schubert [et al.] // *Genes. Dev.* – 2006. – Vol. 20, №13. – P. 1800–1816.

108. Protein kinase CK2 links extracellular growth factor signaling with the control of p27(Kip1) stability in the heart / L. Hauck, C. Harms, J. An [et al.] // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14, №3. – P. 315–324.

109. Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles / C. Medina-Palazon, H. Gruffat, F. Mure [et al.] // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81 № 21. – P. 11850–11860.

110. Conner J. The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in *Escherichia coli* / Conner. // *J. Gen. Virol.* – 1999. – Vol. 80, № 6. – P. 1471–1476.

111. High phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro / M. Enomoto, Y. Sawano, S. Kosuge [et al.] // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, № 3. – P. 894–899.

112. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome / N.Franck, J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo, L. Erdtmann // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 5. – P. 2700–2708.

113. Protein kinase activities associated with the virions of pseudorabies and herpes simplex virus / W. S. Stevely, M. Katan, V. Stirling [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1985. – Vol. 66, №4. – P. 661–673.

114. O'Reilly D. A single serine residue at position 375 of VP16 is critical for complex assembly with Oct-1 and HCF and is a target of phosphorylation by casein kinase II / D. O'Reilly, O. Hanscombe, P. O'Hare // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16, № 9. – P. 2420–2430.

115. Zhi Y. Analysis of the phosphorylation sites of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 / Y. Zhi, R. M. Sandri-Goldin // *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73, № 2. – P. 3246–3257.

116. The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2 / S. Wadd, H. Bryant, O. Filhol [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 41. – P. 28991–28998.

117. CK2 protein kinase is stimulated and redistributed by functional herpes simplex virus ICP27 protein / M. D. Koffa, J. Kean, G. Zachos [et al.] // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 7. – P. 4315–4325.

118. CK2 inhibitors enhance the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells through inhibition of stat3 activation / Y. C. Lin, M. S. Hung, C. K. Lin [et al.] // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2011. – Vol. 26, № 3. – P. 381–388.

119. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis / E. Landesman-Bollag, R. Romieu-Mourez, D. H. Song [et al.] // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20, № 25. – P. 3247–3257.

120. Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2 α) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer / M. Laramas, D. Pasquier, O. Filhol [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 928–934.

121. Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors / G. Stalter, S. Siemer, E. Becht [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 202, № 1. – P. 141–147.

122. Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes / J. Zou, H. Luo, Q. Zeng [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2011. – doi: 10.1186/1479-5876-9-97.

123. Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways / F. Piazza, S. Manni, M. Ruzzene [et al.] // *Leukemia.* – 2012. – Vol. 26, № 6. – P. 1174–1179.

124. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland / E. Landesman-Bollag, D. H. Song, R. Romieu-Mourez [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 227, № 1-2. – P. 153–165.

125. Allende C. C. Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2 / C. C. Allende, J. E. Allende // *J. Cell. Biochem. Suppl.* – 1998. – № 30-31. – P. 129–136.

126. Heriche J. Protein kinase CK2alpha is a target for the Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases / J. Heriche, E. M. Chambaz // *Oncogene.* – 1998. – № 17. – P. 13–18.

127. Coussens L. M. Inflammation and cancer / L. M. Coussens, Z. Werb // *Nature.* – 2002. – Vol. 420, № 6917. – P. 860–867.

128. Balkwill F. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease / F. Balkwill, K. A. Charles, A. Mantovani // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 7, № 3. – P. 211–217.

129. Kelliher M. A. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase II alpha / M. A. Kelliher, D. C. Seldin, P. Leder // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15, № 19. – P. 5160–5166.

130. p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice / E. Landesman-Bollag, P. L. Channavajhala, R. D. Cardiff, D. C. Seldin // *Oncogene.* – 1998. – Vol. 16, № 23. – P. 2965–2974.

131. Channavajhala P. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis / P. Channavajhala, D. C. Seldin // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, № 34. – P. 5280–5288.

132. Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy / J. H. Trembley, Z. Chen, G. Unger [et al.] // *Biofactors.* – 2010. – Vol. 36, № 3. – P. 187–195.

133. Perez D. I. Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases / D. I. Perez, C. Gil, A. Martinez // *Med. Res. Rev.* – 2010. – Vol. 31, № 6. – P. 924–954.

134. Seldin D. C. Casein kinase II alpha transgene-induce murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle / D. C. Seldin, P. Leder // *Science.* – 1995. – Vol. 267, № 5199. – P. 894–897.

135. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis / A. I. Riker, S. A. Enkemann, O. Fodstad [et al.] // *BMC Med. Genomics*. – 2008. – doi: 10.1186/1755-8794-1-13.

136. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung / M. E. Garber, O. G. Troyanskaya, K. Schluens [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98, № 24. – P. 13784–13789.

137. Overexpression of nuclear protein kinase CK2 α catalytic subunit (CK2 α) as a poor prognosticator in human colorectal cancer / K. Y. Lin, C. Tai, J. C. Hsu [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – doi: 10.1371/journal.pone.0017193.

138. Comparative analysis of CK2 expression and function in tumor cell lines displaying sensitivity vs. resistance to chemical induced apoptosis / G. Di Maira, F. Brustolon, K. Tosoni [et al.] // *Mol. Cell. Biochem*. – 2008. – Vol. 316, № 1-2. – P. 155–161.

139. Yarmoluk S. M. Rational design of protein kinase inhibitors / S. M. Yarmoluk, A. Y. Nyporko, V. G. Bdzhola // *Biopolym. Cell*. – 2013. – Vol. 29, №4. – P. 339–347.

140. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // *Adv. Drug. Deliv. Rev*. – 2001. – Vol. 46, № 1-3. – P. 3–26.

141. Використання drug-like характеристик у пошуку нових біологічно активних сполук з ряду 2-меркаптоарила(гетерил)акрилових кислот та споріднених гетероциклічних систем / Д. В. Камінський, І. В. Драпак, Б. С. Зіменковський [та ін.] // *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. – 2011. – № 1/2. – С. 182–189.

142. Вступ до медичної хімії [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://lnu.edu.ua/lessons/files/medicinal_chemistry.pdf.

143. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng [et al.] // *J Med Chem*. – 2002. – Vol. 45, №12. – P. 2615–2623.

144. Pardridge W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: Biology and methodology / W.M. Pardridge // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 1995. – Vol. 15, № 1-3. – P. 5–36.

145. Sun H. Pharmacophore-based virtual screening / Sun. // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, № 10. – P. 1018–1024.

146. Ewing T. J. A. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening / T. J. A. Ewing, I. D. Kuntz // *J. Comput. Chem.* – 1996. – Vol. 18, № 9. – P. 1175-1189.

147. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function / G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 1998. – Vol. 19, № 14. – P. 1639–1662.

148. Neves M. C. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement / M. C. Neves, M. Totrov, R. Abagyan // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2012. – Vol. 26, № 6. – P. 675–686.

149. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking / B. D. Bursulaya, M. Totrov, R. Abagyan, C. L. Brooks III // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2003. – Vol. 17, №11. – P. 755–763.

150. Волинець Г.П. Методи структурної біоінформатики. / Г. П. Волинець, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолюк // *Біотехнологія.* – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 9-19.

151. Hastie C. J. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol / C. J. Hastie, H. J. McLauchlan, P. Cohen // *Nature Protocols.* – 2006. – Vol. 1, № 2. – P. 968–971.

152. Koresawa M. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase / M. Koresawa, T. Okabe // *Assay Drug Dev Technol.* – 2004. – Vol. 2, № 2. – P. 153–160.

153. Binder K. Molecular dynamics simulations / K. Binder, J. Horbach, W. Kob // *J. Phys.: Condens. Matter.* – 2004. – № 16. – P. 429.

154. Пошук інгібіторів протеїнкінази CK2 серед похідних 3-карбетокси-4-амінохіноліну / В. М. Сапелкін, А. Г. Голуб, О. Я. Яковенко [та ін.] // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2005. – Т. 2, № 1. – С. 28-32.

155. Structure-based design, synthesis, and study of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as potent inhibitors of protein kinase CK2 / Z. Nie, C. Perretta, P. Erickson [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17, № 15. – P. 4191–4195.

156. Design, synthesis and biological evaluation of 2-aminopyrimidinones and their 6-aza-analogs as a new class of CK2 inhibitors / M. O. Chekanov, O. V. Ostrynska, S. S. Tarnavskiy [et al.] // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 29, № 5. – P. 639–646.

157. Moucadel V. Antitumoral activity of allosteric inhibitors of protein kinase CK2 / V. Moucadel, R. Prudent, C. F. Sautel // *Oncotarget.* – 2011. – Vol. 2, № 12. – P. 997–1010.

158. Котей І. М. Синтез і біологічне визначення тієнопіримідинонів як інгібіторів протеїнкінази CK2 / І. М. Котей, А. О. Баланда, В. Г. Бджола // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2008. – Vol. 6, № 2. – С. 3–9.

159. Structure-based design and synthesis of novel macrocyclic pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine compounds as potent inhibitors of protein kinase CK2 and their anticancer activities / Z. Nie, C. Perretta, P. Erickson [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18, № 2. – P. 619–623.

160. Meggio F. Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1 / F. Meggio, D. Shugar, L. A. Pinna // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol. 187, № 1. – P. 89–94.

161. Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2 / A. Gianoncelli, G. Cozza, A. Orzeszko [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17, № 20. – P. 7281–7289.

162. The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update / M. A. Pagano, J. Bain, Z. Kazimierczuk [et al.] // *Biochem. J.* – 2008. – № 415. – P. 353–365.

163. Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2 / G. Cozza, V. Mazzorana, E. Papinutto [et al.] // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 421, № 3. – P. 387–395.

164. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application / G. Cozza, P. Bonvini, E. Zorzi [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49, №8. – P. 2363–2366.

165. Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer / R. Battistutta, G. Cozza, F. Pierre [et al.] // *Biochem.* – 2011. – Vol. 50, № 39. – P. 8478–8488.

166. CK2 α and CK2 α' subunits differ in their sensitivity to 4,5,6,7-tetrabromo- and 4,5,6,7-tetraiodo-1H-benzimidazole derivatives / M. Janeczko, A. Orzeszko, Z. Kazimierzuk [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 47, № 1. – P. 345–350.

167. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit / X.Xu, P. A. Toselli, L. D. Russell, D. C. Seldin // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol. 23, № 1. – P. 118–121.

168. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases / T. J.Ewing, S. Makino, A. G. Skillman, I. D. Kuntz // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2001. – Vol. 15, № 5. – P. 411–428.

169. Lindahl E. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis / E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel // *J. Mol. Mod.* – 2001. – Vol. 7, № 8. – P. 306–317.

170. Structural insight into human CK2alpha in complex with the potent inhibitor ellagic acid / Y. Sekiguchi, T. Nakaniwa, T. Kinoshita [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 19, № 11. – P. 2920–2923.

171. Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2 α' and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2 β / N. Bischoff, B. Olsen, J. Raaf [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 407, № 1. – P. 1–12.

172. The new method of distribution integrals evaluations for high throughput virtual screening / O. Yakovenko, A. A. Oliferenko, A. G. Golub [et al.] // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 52–62.

173. Kirchhoff atomic charges fitted to multipole moments: Implementation for a virtual screening system / O. Yakovenko, A. A. Oliferenko, V. G. Bdzhola [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2008. – Vol. 29, № 8. – P. 1332–1343.

174. Evaluation of 4H-4-chromenone derivatives as inhibitors of protein kinase CK2 / A. O. Prykhod'ko, O. Y. Yakovenko, A. G. Golub [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2005. – Vol. 21, №3. – P. 287–292.

175. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. / C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, № 13. – P. 1656–1676.

176. Волинець Г. П. Дизайн інгібіторів протеїнкінази ASK1 in silico: дис. канд. біол. наук: 03.00.20 / Волинець Галина Петрівна. – К., 2012. – 140 с.

177. Lindahl E. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis / E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel // *J Mol Model.* – 2001. – № 7. – P. 306–317.

178. Miyamoto S. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models / S. Miyamoto, P. A. Kollman // *J. Comp. Chem.* – 1992. – Vol. 13, № 8. – P. 952–962.

179. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations / B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije // *J. Comp. Chem.* – 1997. – Vol. 18, № 12. – P. 1463–1472.

180. Molecular dynamics with coupling to an external bath / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 1984. – Vol. 81, № 8. – P. 3684–3690.

181. Humphrey W. VMD - Visual Molecular Dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *J. Mol. Graph.* – 1996. – Vol. 14, № 1. – P. 133-138.

182. Wallace A. C. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions / A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton // *Protein Eng.* – 1995. – Vol. 8, № 2. – P. 127–134.

183. Birnboim H. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H. C. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513–1523.

184. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli. // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.

185. Guiochon G. Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography / G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi. – USA: Academic Press, 2006. – 990 p.

186. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford. // *Anal Biochem.* – 1976. – № 72. – P. 248–254.

187. Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних 3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолу / А. П. Крищишин, Б. С. Зіменковський, Л. Запрутко, Р. Б. Лесик // *Орг. та фарм. хімії.* – 2010. – Т. 8, № 1 (29). – С. 37–43.

188. Kandaswami C. C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer / Kandaswami // *The flavonoids—Advances in research since 1986* / Kandaswami. – London, U.K.: Chapman & Hall, 1994. – (676). – P. 619–652.

189. Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis in vitro and in vivo / Y. C. Chen, S. C. Shen, J. M. Chow [et al.] // *Int J Oncol.* – 2004. – Vol. 25, № 3. – P. 661–670.

190. Effects of baicalein, a flavonoid, and other anti-inflammatory agents on glyoxalase-I activity / M. Ito, S. Ishimoto, Y. Nishida [et al.] // *Agric. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 50, № 4. – P. 1073–1074.

191. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity / N. D. Meyer, A. Haemers, L. Mishra [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1991. – Vol. 34, № 2. – P. 736–746.

192. Plant antimutagenic agents, 2. Flavonoids / M. E. Wall, M. C. Wani, G. Manikumar [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 1988. – Vol. 51, № 6. – P. 1084–1091.

193. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers / H. Edziri, M. Mastouri, M. A. Mahjoub [et al.] // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, № 6. – P. 7284–7293.

194. Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer / F. Pierre, P. C. Chua, S. E. O'Brien [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 54, № 2. – P. 635–654.

194. Evaluation of 4,5,6,7-tetrahalogeno-1H-isoindole-1,3(2H)-diones as inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, O. Y. Yakovenko, A. O. Prykhod'ko [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1784, № 1. – P. 143–149.

195. Evaluation of 3-carboxy-4(1H)-quinolones as inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, O. Y. Yakovenko, V. G. Bdzhola [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49, № 22. – P. 6443–6450.

196. Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking / E. Vangrevelinghe, K. Zimmermann, J. Schoepfer [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 46, № 13. – P. 2656–2662.

197. Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors / M. A. Pagano, G. Poletto, G. Di Maira [et al.] // *Chembiochem.* – 2007. – Vol. 8, № 1. – P. 129–139.

198. Biochemical and three-dimensional structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-Oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA) / S. Sarno, E. De Moliner, M. Ruzzene [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 374. – P. 639–646.

199. Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2 / A. D. Ferguson, P. R. Sheth, A. D. Basso [et al.] // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 585, № 1. – P. 104–110.

200. Hafez H. N. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new nonsteroidal anti-inflammatory derived from 3-aminobenzothieno[2,3-d]pyrimidines / H. N. Hafez, O. K. Al-Duaij, A. A. El-Gazzar // Int. J. Org. Chem. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 110–118.

201. Ethynylthieno[3,2-d]- and 6-ethynylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-anilines as tunable covalent modifiers of ErbB kinases / I. R. Woods, L. M. Shewchuk, B. Ellis, P. Brignola // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 2773–2778.

202. Design and SAR of thienopyrimidine and thienopyridine inhibitors of VEGFR-2 kinase activity / M. J. Munchhof, J. S. Beebe, J. M. Casavant, B. A. Cooper // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 21–24.

203. Thienopyrimidine ureas as novel and potent multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors / Y. Dai, R. R. Guo, Z. Frey [et al.] // J. Med. Chem. – 2005. – Vol. 48, № 49. – P. 6066–6083.

204. Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis / S. Sarno, P. Vaglio, F. Meggio [et al.] // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 18. – P. 10595–10601.

205. C-terminal region of protein kinase CK2 alpha: How the structure can affect function and stability of the catalytic subunit / E. Grasselli, V. Tomati, M. V. Bernasconi [et al.] // J. Cell. Biochem. – 2004. – Vol. 92, № 2. – P. 270–284.