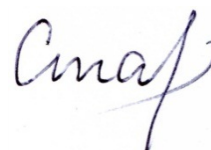


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології і генетики

Старосила Сергій Анатолійович



УДК 577.322

**РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНИХ МОДЕЛЕЙ ТА ІНГІБІТОРІВ
ПРОТЕЇНКІНАЗ ASK1, FGFR1 І CK2**

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2017

Дисертацією є рукопис.

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
старший науковий співробітник
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України, заступник директора з
наукової роботи;

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

Захист відбудеться 28 лютого 2017 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

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

Автореферат розіслано 27 січня 2017 року.

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



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підвищена активність протеїнкіназ ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), CK2 (Casein kinase 2) і FGFR1 (Epidermal growth factor receptor 1) спостерігається при низці хвороб людини. Тому розробка низькомолекулярних інгібіторів цих ензимів-молекулярних мішеней є важливим завданням.

Для підвищення ефективності дизайну інгібіторів протеїнкіназ широко застосовуються обчислювальні методи. Серед них – фармакофорне моделювання. Воно включає в себе кілька послідовних етапів: розробку фармакофорних моделей, їх оптимізацію і валідацію, фармакофорний скринінг колекції хімічних сполук відносно цих моделей та аналіз результатів скринінгу. Для успішного знаходження активних сполук найбільш важливим складником цього методу є розробка якісних фармакофорних моделей – сукупності стеричних і електронних особливостей сполук, що є необхідними для їх оптимальної взаємодії з молекулярною мішенню.

Для ASK1 та CK2 не запропоновано фармакофорних моделей інгібіторів цих кіназ. Для FGFR1 розроблено фармакофорну модель інгібіторів, проте сполуки, знайдені скринінгом відносно неї, погано інгібували цю протеїнкіназу. Таким чином, на сьогодні розробка фармакофорних моделей інгібіторів цих протеїнкіназ є актуальним завданням.

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: «Мішень-орієнтований пошук новітніх протимікробних, противірусних і протипухлинних засобів» (номер державної реєстрації – 0112U000254, 2012–2016 рр.) та «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є побудова фармакофорних моделей і розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2. Для досягнення цієї мети було поставлено й розв'язано такі завдання:

1. Побудувати фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази ASK1.
2. Провести віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук для пошуку нових інгібіторів ASK1; виконати біохімічне тестування відібраних сполук; дослідити залежність інгібувальної активності інгібіторів від їх хімічної структури; проаналізувати способи їх взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом ASK1 *in silico*.
3. Побудувати фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази CK2.
4. Виконати віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази CK2; провести скринінг *in vitro* відібраних сполук; дослідити залежність інгібувальної активності сполук від їх хімічної структури; проаналізувати способи взаємодії інгібіторів з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази CK2.
5. Побудувати фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази FGFR1.

6. Зробити віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук з метою пошуку нових інгібіторів протеїнкінази FGFR1; провести біохімічне тестування відібраних сполук; дослідити залежність інгібувальної активності інгібіторів від їх хімічної структури; проаналізувати способи їх взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом FGFR1.

7. Розробити алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу.

Об'єкт дослідження: інгібувальна активність низькомолекулярних органічних сполук відносно протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2 людини.

Предмет дослідження: протеїнкінази ASK1, FGFR1 і CK2, фармакофорні моделі, інгібітори.

Методи дослідження: фармакофорне моделювання, гнучкий молекулярний докінг, біохімічне тестування активності протеїнкіназ із використанням АТФ, міченого ізотопом фосфору ³²P.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Уперше побудовано і валідовано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази ASK1 людини.

2. Знайдено й охарактеризовано новий клас низькомолекулярних інгібіторів ASK1 – 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-они.

3. Побудовано та експериментально валідовано рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази CK2 людини.

4. Знайдено й охарактеризовано два нові класи низькомолекулярних інгібіторів CK2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они та тетраоло[1,5-с]хіназоліни.

5. Побудовано та експериментально валідовано рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази FGFR1 людини.

6. Знайдено й охарактеризовано три нові класи низькомолекулярних інгібіторів FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини, піридин-3-карбонітрили.

7. Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу, що поєднує оптимізацію радіусів фармакофорних точок моделі та використання концепції ваг фармакофорних точок (ваги вказують на ступінь важливості конкретних точок моделі) і молекулярних дескрипторів (підхід QSAR).

Практичне значення одержаних результатів.

1. Розроблені фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2 можуть застосовуватися для знаходження інгібіторів цих ензимів.

2. Знайдені нові інгібітори протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2 можуть використовуватися для з'ясування функцій цих кіназ на рівні мережі сигнальних шляхів клітини. Вони можуть бути використані з метою розробки фармацевтичних препаратів для терапії низки захворювань, пов'язаних із порушеннями функціонування цих кіназ.

3. Досліджені способи взаємодії інгібіторів з ASK1, FGFR1 та CK2 можуть бути основою для розробки нових більш активних і селективних інгібіторів цих протеїнкіназ.

4. Розроблений алгоритм дає змогу покращувати якісні характеристики фармакофорних моделей і, відповідно, знаходити більше активних сполук при фармакофорному скринінгу.

Особистий внесок здобувача. Автором власноручно проведено експерименти, пов'язані з молекулярним моделюванням і біохімічним тестуванням сполук. Побудовано фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2 і проведено фармакофорний скринінг відносно них. Виконано напівгнучкий докінг бібліотек низькомолекулярних сполук, проаналізовано молекулярні комплекси, отримані докінгом. Запропоновано моделі взаємодії розроблених інгібіторів з активними сайтами кіназ, висунуто пропозиції щодо їх хімічної оптимізації. Розроблено концепцію й математичний апарат алгоритму оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу, написано програмний код алгоритму мовою програмування Java.

Постановку наукових завдань та інтерпретацію отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником д.х.н., проф. С. М. Ярмолюком. Віртуальний скринінг і розробку інгібіторів протеїнкінази ASK1 проведено спільно з к.б.н., н.с. Г. П. Волинець. Кореляційні залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» для низки досліджуваних хімічних сполук встановлено спільно з к.х.н. В. Г. Бджолою. Біологічне тестування сполук *in vitro* здійснено спільно з к.б.н. О. П. Кухаренком.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на XI Українському біохімічному з'їзді (м. Київ, Україна, 6-10 жовтня 2014), Конференції-конкурсу молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015», присвяченій 90-річчю заснування Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна (м. Київ, Україна, 23-24 квітня 2015), IX Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 160-річчю з Дня народження Кащенко Миколи Феофановича (м. Київ, Україна, 26 травня 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 праць, з них 8 статей у наукових фахових журналах, 1 свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір і 4 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у п'яти розділах, аналізу й узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який нараховує 144 найменування. Дисертація містить 31 рисуноків і 15 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 137 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури присвячений аналізу фармакофорних моделей інгібіторів різних серин-треонінових і тирозинових протеїнкіназ.

Матеріали та методи досліджень. Ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів ASK1 побудовано програмою «Pharmagist» на основі двох навчальних вибірок, що налічували відповідно 19 та 10 відомих інгібіторів ASK1. Програму було параметризовано, щоб вона максимально точно відтворювала конформації зв'язування для інгібіторів ASK1, узятих із кристалічних структур. У результаті встановлено такі основні параметри: HB-direction-threshold – 50, aromatic-ring-normal-angle-match-tolerance – 40, feature-center-distance-match-tolerance – 0,8, cluster-feature-center-distance-match-tolerance – 0,9 та aromatic-feature-center-distance-match-tolerance – 1,2. Для ідентифікації катіонів і аніонів, крім застосування fFLASH алгоритму, встановлено set charge definition = 1 для присвоєння часткових атомних зарядів.

Валідаційні скринінги відносно моделей і відбір кращої моделі проводили програмою «Pharmagist» на тестовій вибірці із 43 сполук (16 з високою інгібувальною активністю ($\leq 5 \mu\text{M}$), 7 – із середньою активністю (від 5 до 40 μM), 20 сполук були неактивні).

Для розробки рецепторно-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів FGFR1 та CK2 за основу було взято просторові структури цих протеїнкіназ з інгібіторами, що мали найкращі роздільні здатності. PDB ID для FGFR1 – 4WUN, 3RHX, 4F64, для CK2 – 4ANM. Фармакофорні моделі генерувалися програмою «Pharmer» та модифікувалися в програмі «Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0». Для скринінгу за допомогою пакета програм «Open Vabel» було згенеровано конформери для сполук скринінгових баз. Скринінг проводили за допомогою програми «Pharmer». Результати фільтрували за значеннями середньоквадратичних відхилень (RMSD, Å) між фармакофорними точками досліджуваної сполуки та фармакофорної моделі й аналізували візуально на предмет збігу із фармакофорними точками моделей.

Для рецепторно-орієнтованого напівгнучкого докінгу використовували пакети програм «DOCK 4.0» і «AutoDock 4.2.6». Підготовку молекул лігандів для DOCK 4.0 проводили за допомогою програми «SCREENER». Для AutoDock 4.2.6 ліганди готували програмою «MGL Tools».

Візуальний аналіз комплексів сполук в АТФ-зв'язувальних сайтах, отриманих докінгом, проводили в програмі «Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0».

Просторові структури каталітичних субодиниць ASK1, CK2 та FGFR1 узято з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 2CLQ, 3NSZ, 3GQI).

Тестування ефективності інгібіторів проводили *in vitro*. Використовували очищені рекомбінантні протеїни каталітичних доменів ASK1 (субстрат MBP), FGFR1 (субстрат IGR-IRtide), CK2 (субстрат RRREEETEEE), Aurora A (субстрат Kemptide), JNK3 (субстрат ATF2, амінокислотні залишки 19-96), Tie2 (субстрат Poly(Glu₄-Tyr)), експресовані в клітинах Sf9 (Upstate/Millipore). Одночасно з інкубацією проби з інгібітором готували суміш розчину Mg²⁺/АТФ із додаванням

АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P , з розрахунку 0,05 μCi на пробу. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 μM . Рівень радіоактивного сигналу виміряли за допомогою сцинтиляційного лічильника «PerkinElmer Tri-Carb 2800-TR». Ступінь інгібування протеїнкінази визначали за співвідношенням включення ^{32}P при додаванні інгібітора та за його відсутності. Для визначення IC_{50} було використано низку концентрацій інгібітора й отримано титрувальні криві.

Аналіз активних сайтів протеїнкіназ, для яких розроблено фармакофорні моделі. Програмою «Clustal X» було проведено вирівнювання амінокислотних послідовностей 16 тирозинових і серин-треонінових протеїнкіназ, для яких уже розроблені фармакофорні моделі. Встановлено, що фосфат-зв'язувальні ділянки є більш консервативними, на відміну від гідрофобних кишень I та II, які мало подібні. Таким чином, фармакофорні точки, локалізовані у фосфат-зв'язувальній ділянці, не забезпечують селективності для сполук-хітів, проте можуть забезпечувати афінність. Аналогічно точки, визначені в аденін- і цукор-зв'язувальних ділянках, теж будуть впливати лише на афінність, оскільки вони подібні в усіх кіназах. Гідрофобні кишень I та II мають дуже різний амінокислотний склад у різних протеїнкіназ, тому коректно передбачені гідрофобні або ароматичні точки в них можуть бути корисними для покращення селективності інгібіторів.

Розробка фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1 і пошук низькомолекулярних інгібіторів цього ензиму.

Побудова фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1 на основі відомих інгібіторів із різних хімічних класів. Ліганд-орієнтовану фармакофорну модель протеїнкінази ASK1 було згенеровано за допомогою програми «Pharmagist». Для цього обрали 19 відомих інгібіторів цієї кінази як навчальну вибірку. Цю вибірку було додатково кластеризовано на основі відстані Танімото між фінгерпринтами сполук FCFP4 – так отримали меншу вибірку з 10 інгібіторів. Метою проведення кластеризації було зменшення кількості сполук у численних класах інгібіторів протеїнкінази ASK1.

Фармакофорні моделі будували на основі обох навчальних вибірок двома різними шляхами. Деякі моделі були згенеровані на основі вручну вибраних молекул-зразків, узятих із кристалічних структур ASK1 (ID: 4BHN, 4BID, 3VW6, 4BIC, 4BIB, 4BIE). Інші моделі згенеровані в результаті послідовного використання всіх лігандів як зразків та автоматичного вибору кращих моделей.

У результаті отримано вісім фармакофорних моделей. Валідаційні скринінги показали, що найбільш точною є модель **16.1** (табл. 1). Крім того, ця модель є структурно простішою, ніж інші. Її було використано для наступних досліджень. Вона містила 12 фармакофорних точок. Pharmagist автоматично розраховує вагу цих точок, що вказує на їх важливість для взаємодії з активним сайтом ензиму (табл. 2).

З метою більш детально дослідити релевантність отриманої фармакофорної моделі було здійснено скринінг комерційно доступної колекції, що налічувала 106529 органічних низькомолекулярних сполук, включаючи 24 високоактивні інгібітори ASK1. Виявилося, що ця модель високоспецифічна до двох класів інгібіторів. Тому її було оптимізовано – видалено декілька фармакофорних точок (Cat, Acc3 та Hyd1-3). Остаточну модель подано на рис. 1.

Результати валідаційних скринінгів відносно згенерованих фармакофорних моделей інгібіторів ASK1

Модель	Середня кількість спільних точок	Загальна кількість передбачених активних сполук, %	Кількість передбачених високоактивних лігандів, %	Кількість передбачених лігандів із середньою активністю, %	Кількість передбачених неактивних лігандів, %
8.2	2,5	86,96	56,25	0	85
8.3	3,5	82,61	62,5	14,3	80
8.11	2,3	100	56,25	0	100
16.1	3,3	82,61	62,5	28,6	80
16.2	2,5	91,3	50	0	90
16.3.1	3,5	78,26	56,25	14,3	75
16.3.2	3,2	69,57	56,25	14,3	65
16.11	2,8	82,61	56,25	0	80

У результаті скринінгу відносно оптимізованої моделі 15 високоактивних сполук із трьох хімічних класів потрапили в топ 0,5% сполук із найвищим скором.

Кореляційний коефіцієнт Метьюса для валідації моделі становив 0,67. Z-скори для активних сполук, знайдених неоптимізованою моделлю, знаходилися в межах від 9,217 до 22,394, а оптимізованою – від 16,86 до 39,135. Це означає, що скори Pharmagist високоактивних сполук, які були передбачені оптимізованою моделлю, мали вище позитивне відхилення від середнього значення вибірки, що свідчить про кращу передбачувальну здатність моделі.

Розроблена фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази ASK1 узагальнює в собі кілька типів взаємодії різних класів інгібіторів з цією кіназою. Вона може бути застосована для пошуку нових інгібіторів ASK1.

Таблиця 2
Параметри моделі 16.1

Точка	Вага	Радіус, Å
Don	4	0,8
Acc1	2,82843	0,8
Acc2	4,3589	0,8
Acc3	4	0,8
Cat	4	0,8
Ar1	3,16228	1,2
Ar2	4,3589	1,2
Ar3	4,3589	1,2
Ar4	4	1,2
Hyd1	2,44949	0,8
Hyd2	3,87298	0,8
Hyd3	3,87298	0,8

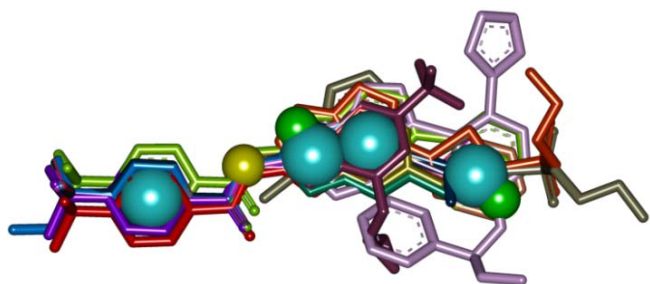


Рис. 1. Остаточна фармакофорна модель інгібіторів ASK1. Кольорами позначено: блакитним – ароматичні точки, зеленим – акцептори водневого зв'язку, жовтим – донор водневого зв'язку

Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1. Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази ASK1 було використано комбінацію методів комп'ютерного моделювання та тестування *in vitro*. Пакет програм «DOCK» використовували для проведення напівгнучкого докінгу колекції близько 270000 органічних сполук в АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази ASK1. У результаті віртуального скринінгу з наступною візуалізацією комплексів сполук з активним центром ASK1, що мали найкращі показники скору, було відібрано 186 найбільш перспективних речовин для тестування в кіназній реакції *in vitro*. Біохімічні експерименти продемонстрували, що сполука 5-(4-хлорофеніл)-4-(фуран-2-карбоніл)-3-гідрокси-1-(6-метоксибензотіазол-2-іл)-1,5-дигідропірол-2-он інгібувала ASK1 зі значенням $IC_{50}=4,2 \mu\text{M}$.

З метою вивчення залежності активності сполук цього класу від їх хімічної структури було додатково синтезовано й протестовано 33 похідних 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (рис. 2). Найбільш активною виявилася сполука ВРyO-34 зі значенням $IC_{50}=520 \text{ nM}$ (рис. 3).

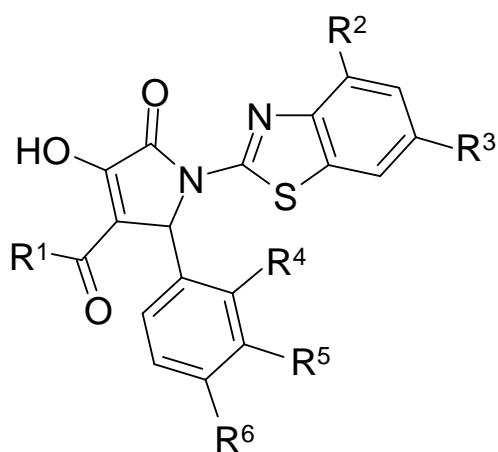


Рис. 2. Загальна хімічна структура похідних бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону

Також сполуки утворюють гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками в гідрофобній кишені I АТФ-зв'язувального сайту, зокрема, з His729, Val738, Tyr740, Phe752 та Met754 (рис. 3).

У процесі аналізу даних біохімічного тестування було встановлено залежності інгібувальної активності інгібіторів від хімічної структури їх замісників. В залежності від гідрофобності замісника R^1 активність у цілому зростала в ряду фуран < 4-метоксифеніл < 4-хлорофеніл < 4-етоксифеніл < феніл < тіофен < 4-метилфеніл \leq 2,3-дигідробензо[1,4]діоксин < 4-флуорофеніл < 2-метилфуран < 2-метил-2,3-дигідробензофуран.

При збільшенні гідрофобності замісника R^3 активність сполук зростала: етокси > метокси > метил. Хімічна структура замісників R^4 , R^5 та R^6 у фенільному кільці не мала значного впливу на активність досліджуваних сполук.

Встановлено, що всі сполуки цього класу мають подібний тип зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом ASK1. Згідно з результатами молекулярного моделювання, бензотіазол залучений до гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Leu686, Val757 і Leu810 в аденін-зв'язувальній ділянці. Окрім того, цей гетероцикл формує π -сульфід-взаємодію з карбонільною групою Val757, розташованою в шарнірній ділянці. Було виявлено, що атом Оксигену 3-гідрокси-1,5-дигідропірол-2-ону утворює водневий зв'язок з аміногрупою Val757.

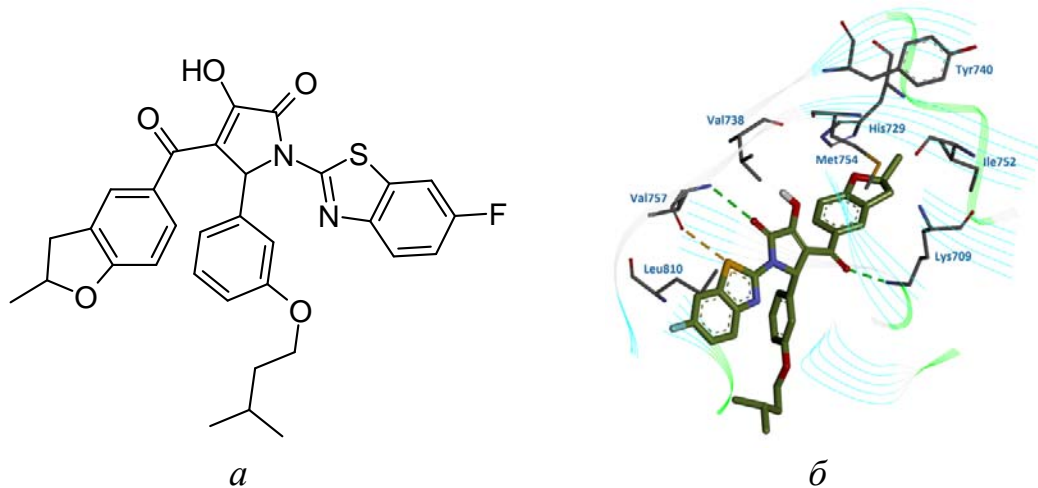


Рис. 3. Хімічна структура (а) і тип зв'язування сполуки **4.34** (ВРyO-34) в активному сайті каталітичної субодиниці протеїнкінази ASK1 (б). Водневі зв'язки показано зеленими пунктирними лініями, π -сульфід-взаємодію – жовтою пунктирною лінією

Селективність найбільш активних інгібіторів ASK1 вивчали *in vitro* на трьох серин-треонінових (CK2, JNK3 та Aurora A) і двох тирозинових протеїнкіназах (FGFR1 та endothelial TEK tyrosine kinase (Tie2)). Результати дослідження показали, що сполуки **4.27** і **4.34** значно активніші по відношенню до ASK1, ніж до інших протеїнкіназ (табл. 3). Ці інгібітори можуть застосовуватися для подальшого вивчення ASK1 та розробки фармацевтичних препаратів для терапії низки захворювань, пов'язаних із порушеннями функціонування цієї кінази.

Таблиця 3

Залишкова активність протеїнкіназ (%)
за присутності інгібітора ASK1 у концентрації 10 μ M

Сполука	ASK1	CK2	FGFR1	Tie2	JNK3	Aurora A
4.1	39,11	73,94	46,36	66,4	96,78	48,06
4.10	32,61	68,3	92,71	100	100	100
4.14	27,02	79,93	88,69	83,16	100	45,41
4.15	27,56	71,5	74,42	63,51	89,87	28,11
4.17	16,2	79,32	65,69	62,79	100	36,45
4.19	23,47	97,78	40,33	100	100	52,03
4.26	43	81,78	22,63	99,2	79,98	49,55
4.27	12,26	83,56	46,81	92,46	100	52,93
4.28	19,72	89,68	18,01	78,83	100	28,83
4.29	19,8	85,64	58,09	94,23	100	20,52
4.31	15,75	99,34	36,17	100	100	35,16
4.32	13,16	90	25,53	59,9	92,49	28,11
4.33	18,07	92,59	26,85	68,4	100	28,41
4.34	13,97	83,36	100	100	100	44,67

Розробка фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1 і пошук низькомолекулярних інгібіторів цього ензиму.

Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1. Для побудови фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було зроблено суперпозицію трьох комплексів цієї кінази з її інгібіторами (PDB ID: 4WUN, 3RHX, 4F64). Комплекси порівнювали на основі стеричних та електростатичних особливостей молекул у рівному співвідношенні (по 50 %). Потім для накладених комплексів за допомогою програми «Pharmer» було згенеровано первинні фармакофорні моделі (рис. 4).

Наступним кроком було геометричне усереднення фармакофорних точок одного типу. Спочатку були видалені одинарні точки – гідрофобна точка й акцептор водневого зв'язку. Також було видалено донор водневого зв'язку, сформований на основі двох первинних донорів, та ароматичну точку, розміщену біля сукупності донорів і акцептора.

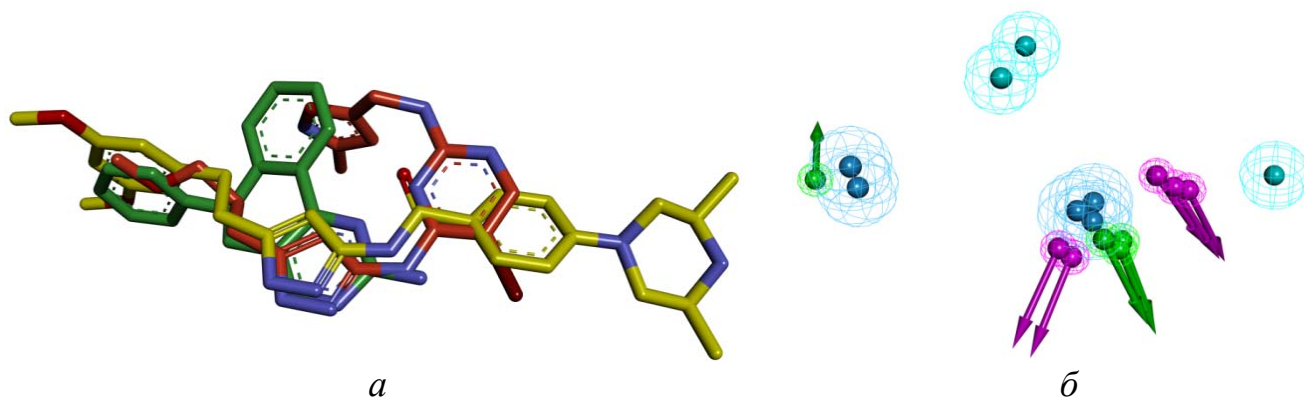


Рис. 4. Суперпозиція інгібіторів FGFR1 (а) та рецепторно-орієнтовані фармакофорні моделі, згенеровані за допомогою програми «Pharmer» (б). Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Це було зроблено для того, щоб не перевантажувати фармакофорну модель, оскільки в невеликій ділянці було б розміщено чотири точки, а це, у свою чергу, значно б звужувало результати скринінгу. Радіуси для точок були встановлені стандартні для Pharmer: 1,1 Å для ароматичної точки, 1 Å для гідрофобної точки, 0,5 Å для донора й акцептора водневого зв'язку. Остаточну фармакофорну модель зображено на рис. 5. Вона містила ароматичну точку, що відповідає гідрофобній ділянці I АТФ-зв'язувального сайту FGFR1, гідрофобну точку в гідрофобній кишені II, донор і акцептор водневого зв'язку, направлені до шарнірної ділянки кінази.

З метою пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено фармакофорний скринінг колекції, що налічувала майже 180000 низькомолекулярних органічних сполук. Для кожної сполуки було згенеровано не більше 250 конформерів. Для кожного конформера програма «Pharmer» робить фармакофорне представлення, тобто визначає всі потенційні фармакофорні точки, які прирівнюються до моделі. При цьому програма обраховує середньоквадратичне

відхилення (RMSD, Å) між фармакофорними точками досліджуваної сполуки і моделі. Чим менше RMSD, тим краще й точніше сполука прирівнюється до точок моделі. Відповідно до значень RMSD та візуального аналізу сполук за збігом із фармакофорною моделлю було відібрано й протестовано *in vitro* 61 сполуку.

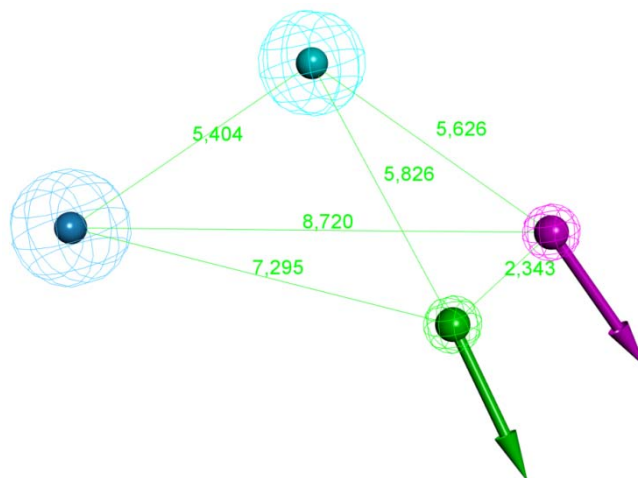


Рис. 5. Рецепторно-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази FGFR1, що була використана для фармакофорного скринінгу. Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Ідентифіковано два хімічні класи інгібіторів протеїнкінази FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини та низку інших сполук-хітів. Активні інгібітори мали значення IC_{50} від 1,4 до 16 μ M. Найбільш активну сполуку, знайдену при скринінгу, показано на рис. 6.

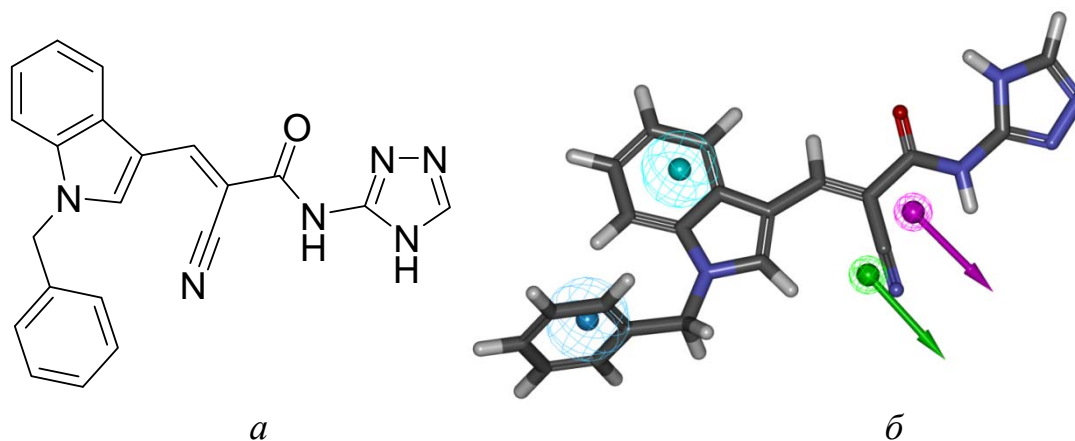


Рис. 6. Хімічна структура найбільш активного інгібітора FGFR1, знайденого при скринінгу (а), та його збіг із фармакофорною моделлю інгібіторів FGFR1 (б). Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Знайдені інгібітори є сполуками-хітами й експериментально підтверджують дієздатність розробленої фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1. Вони можуть

використовуватися як у біохімічних експериментах у ході вивчення ролі FGFR1 на рівні сигнальних шляхів клітини, так і бути основою для подальшої оптимізації до лідерних сполук.

Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази FGFR1. Для пошуку інгібіторів FGFR1 програмою «AutoDock 4.2.6» був проведений напівгнучкий молекулярний докінг бібліотеки з 1257 низькомолекулярних органічних сполук в АТФ-акцепторний сайт FGFR1. Для біохімічного тестування було відібрано 12 сполук із найкращими скорями, розрахованими при докінгу.

У результаті було знайдено нові інгібітори протеїнкінази FGFR1 – піридин-3-карбонітрили. Активні сполуки мали значення IC_{50} 1,58 μ M (сполука **5.16**), 4 μ M (сполука **5.17**) і 6,9 μ M (сполука **5.18**) (рис. 7).

Усі три сполуки мали подібний механізм зв'язування з активним центром кінази – утворювали водневі зв'язки із шарнірною ділянкою, гідрофобні взаємодії в аденін-зв'язувальній ділянці, водневі й електростатичні зв'язки та гідрофобні взаємодії з ключовими амінокислотними залишками фосфат-зв'язувального регіону.

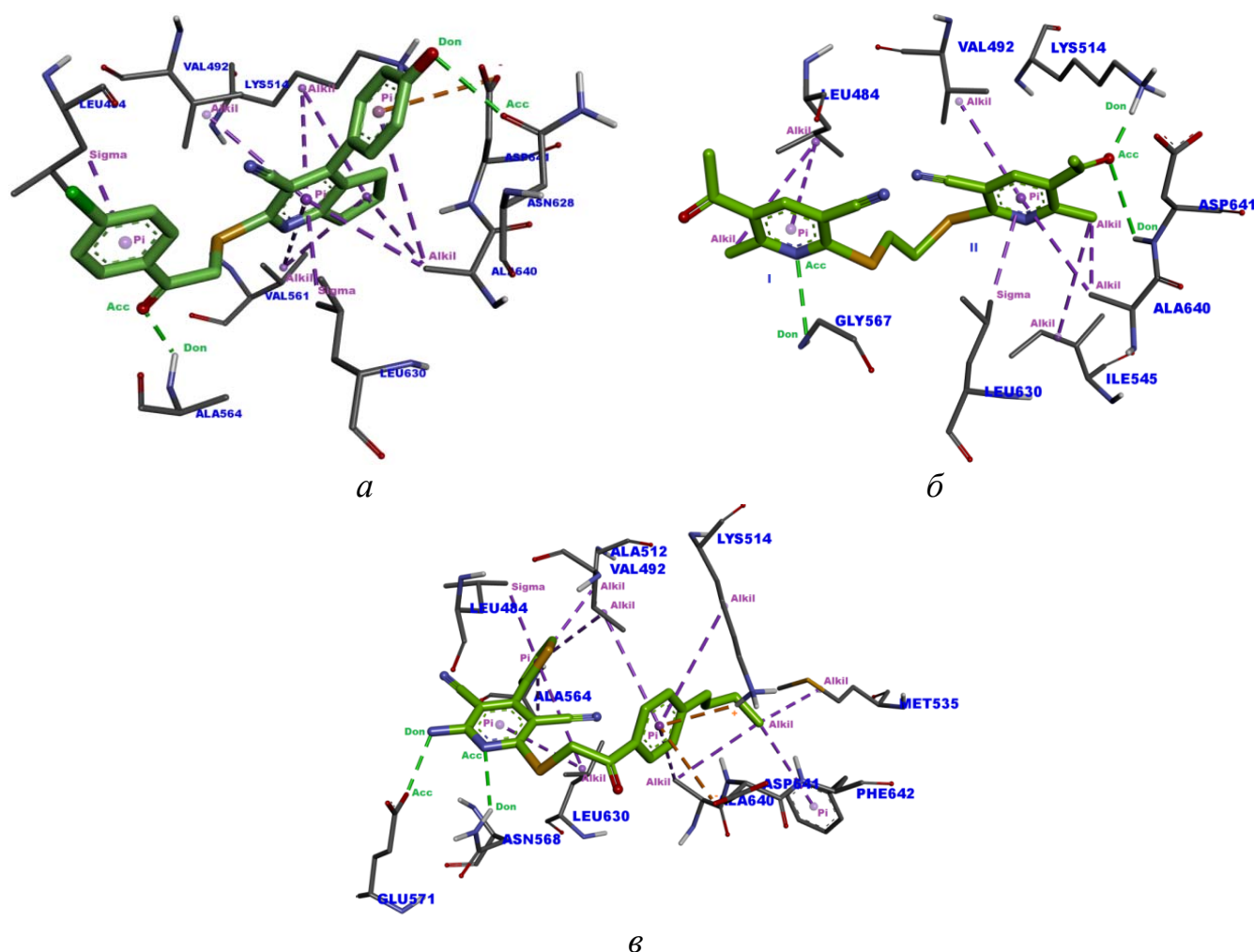


Рис. 7. Механізми зв'язування сполук **5.16** (а), **5.17** (б), **5.18** (в) з активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні, оранжевими – електростатичні; Pi – π -електронна хмара, Sigma – електронна пара типу δ , Alkil – алкіл

Ці інгібітори є перспективними для подальшої оптимізації і можуть слугувати основою для розробки більш активних і селективних інгібіторів FGFR1.

Розробка фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази CK2 та пошук низькомолекулярних інгібіторів цього ензиму.

Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази CK2. Для побудови фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази CK2 за основу було взято просторову структуру каталітичної субодиниці з інгібітором CDC7 із бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 4ANM).

Трициклічний фрагмент інгібітора CDC7 утворює низку гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази CK2 (Val53, Ile66, Lys68, Val116, Met163 та Ile174). Програма «Pharmer» ідентифікувала ці взаємодії і згенерувала три гідрофобні точки з центрами в геометричних центрах ароматичних кілець інгібітора зі стандартними радіусами 1 Å та одну гідрофобну точку на атомі Брому. Також було згенеровано акцептор водневого зв'язку на кетогрупі інгібітора, якому відповідає водневий зв'язок із Lys68 і донор водневого зв'язку на гідроксильній групі, якому відповідає водневий зв'язок з Asn161 (рис. 8а).

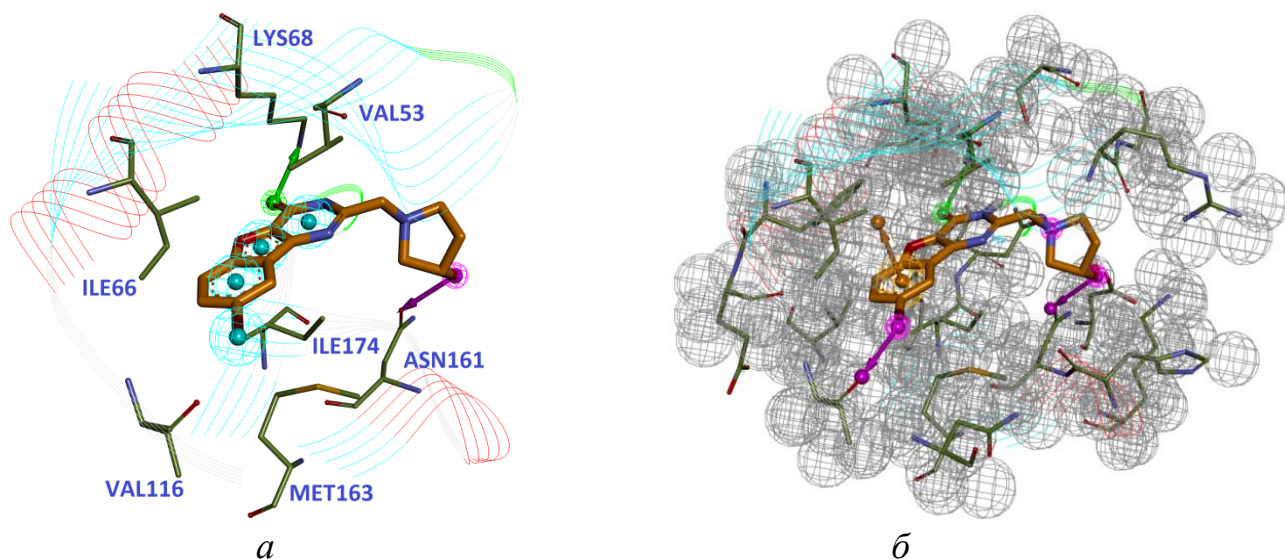


Рис. 8. Первинна рецепторно-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази CK2, згенерована за допомогою програми «Pharmer» (а) та оптимізована модель (б). Кольорами позначено: блакитним – гідрофобні точки, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донори водневого зв'язку, сірим – виключені об'єми

Першу гідрофобну точку, що знаходиться найближче до шарнірної ділянки протеїнкінази CK2, було змінено на ароматичну. Для неї було задано направлений вектор, перпендикулярний до площини циклу, оскільки положення циклу в цій ділянці важливе для утворення гідрофобних взаємодій. Радіус заданий стандартний для Pharmer – 1,1 Å. Другу гідрофобну точку залишено без змін. Третю було видалено, оскільки вона відіграє найменшу роль для зв'язування з кіназою.

Донор і акцептор водневого зв'язку було залишено без змін. Гідрофобну точку

на атомі Брому змінили на донор водневого зв'язку з вектором, направленим до кетогрупи Val116. Наявність донора в цій позиції більш важлива, ніж гідрофобної точки. Атом Брому утворює галогеновий зв'язок із Val116, проте програма «Pharmer» не розпізнає такої взаємодії. Додатково було визначено ще один донор водневого зв'язку на атомі Нітрогену в піролідіновому циклі з направленням до карбоксильної групи Asp175. Радіуси для донорів й акцептора водневого зв'язку становили 0,5 Å.

Модель доповнили виключеними об'ємами. Було вибрано всі атоми Гідрогену активного центру протеїнкінази в радіусі 5 Å і згенеровано для них виключені об'єми, які практично повністю покривають активний центр ензиму. Такі об'єми роблять модель значно точнішою – вони не дають змоги вибирати сполуки при скринінгу, що потенційно будуть перекриватися з амінокислотними залишками активного центру. Радіус виключених об'ємів становив 1,2 Å, що відповідає ван-дер-ваальсовому радіусу атома Гідрогену. В результаті фармакофорна модель містила шість фармакофорних точок – ароматичну і гідрофобну, три донори й один акцептор водневого зв'язку та 193 виключених об'ємів (рис. 8б).

Відносно цієї моделі проведено фармакофорний скринінг бібліотеки з майже 180000 низькомолекулярних сполук. Відповідно до значень середньоквадратичного відхилення (RMSD, Å) та візуального аналізу сполук за збігом із фармакофорною моделлю, було відібрано й протестовано *in vitro* 55 сполук. Найактивніші сполуки пригнічували активність протеїнкінази СК2 зі значеннями IC₅₀ 250, 170, 150 і 150 nM, відповідно. Таким чином було ідентифіковано новий клас інгібіторів СК2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они (рис. 9).

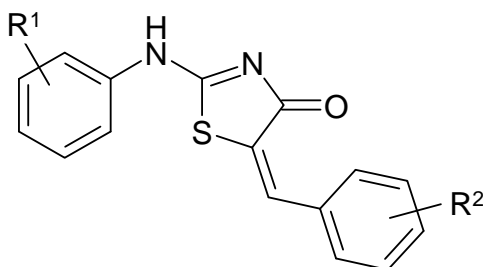


Рис. 9. Загальна хімічна структура похідних 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-ону

Згідно з даними комп'ютерного моделювання, усі похідні 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-ону утворюють водневі зв'язки з каталітичним лізином та амінокислотними залишками в шарнірній ділянці, гідрофобні взаємодії в гідрофобній кишені II та аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувального сайту СК2.

Цей новий хімічний клас інгібіторів СК2 є експериментальним підтвердженням дієздатності розробленої фармакофорної моделі інгібіторів СК2. Знайдені нами інгібітори можна використовувати для вивчення СК2, вони є хорошою основою для розробки фармацевтичних препаратів від захворювань, пов'язаних із надмірною активністю кінази СК2.

Розробка низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2. Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 був проведений молекулярний докінг бібліотеки органічних сполук, що налічувала 1520 речовин. Для біохімічного тестування було відібрано 9 сполук із найкращими скорями, отриманими при докінгу. Активність проявили тетразоло[1,5-с]хіназоліни: сполука **6.56** мала IC_{50} 5,3 μ M, сполука **6.57** – 4,9 μ M (рис. 10).

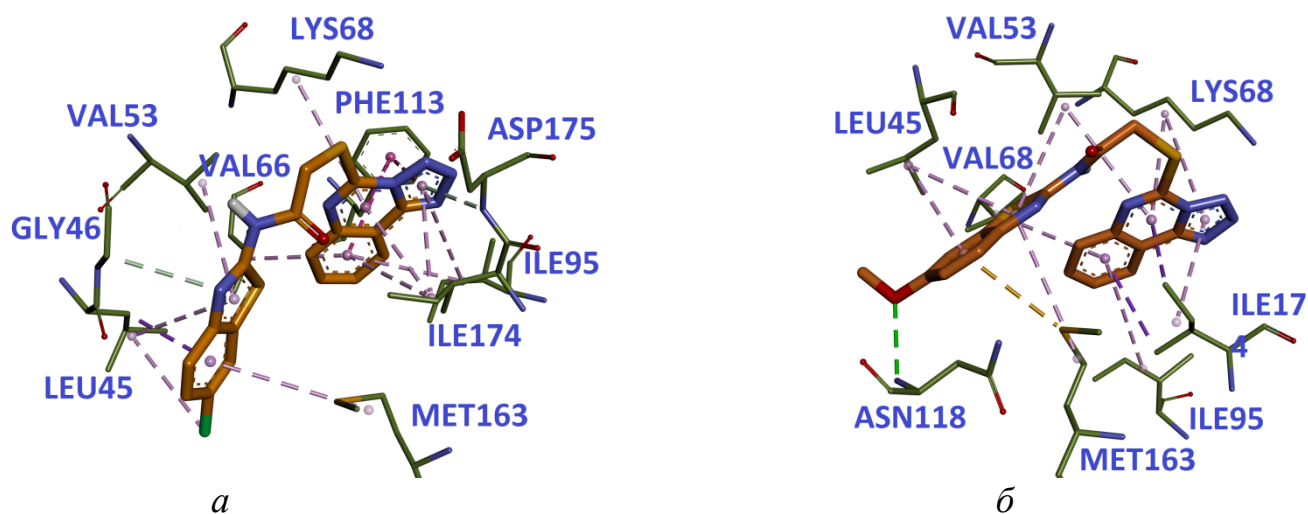


Рис. 10. Механізм зв'язування сполук **6.56** (а) та **6.57** (б) з активним центром протеїнкінази СК2. Оливковими пунктирними лініями показано неklasичні водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні π - δ -взаємодії, блідо-рожевими – гідрофобні π -алкіл-взаємодії, рожевими – гідрофобні π - π -взаємодії, зеленими – класичні водневі зв'язки, жовтою – π -сульфід-взаємодію

Ці сполуки є перспективними для подальшої оптимізації й розробки більш активних та селективних інгібіторів. Із цією метою було ретельно вивчено комплекси сполук **6.56** і **6.57** з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2, отримані при молекулярному докінгу.

Сполука **6.56** утворює зв'язки з ключовими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту СК2. 6-Хлоро-1,3-бензотіазоловий замісник утворює гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Leu45, Glu46 та Val53. Тетразоло[1,5-с]хіназоліновий гетероцикл утворює гідрофобні взаємодії з Val66, Lys68, Phe113, Ile174, Ile95 і неklasичний водневий зв'язок з Asp175 (між π -хмарою тетразолу й амідною групою амінокислотного залишку) (рис. 10а).

Сполука **6.57** мала подібний до сполуки **6.56** механізм зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом СК2. Інгібітор зміщений у бік шарнірної ділянки, з якою є водневий зв'язок між Оксигеном метоксигрупи ліганду й аміногрупою Asn118. Зникли π - π -зв'язки між тетразоло[1,5-с]хіназоліновим гетероциклом і Phe113, з'явилися нові гідрофобні взаємодії з Lys68 та зв'язок між π -хмарою 6-метокси-1,3-бензотіазолового замісника й сульфуром Met163. Ці взаємодії, зокрема водневий зв'язок із шарнірною ділянкою, вплинули на поліпшення активності сполуки **6.57** (рис. 10б).

Розробка алгоритму оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. Спираючись на фармакофорну модель інгібіторів FGFR1, було розроблено новий підхід для пошуку інгібіторів протеїнкіназ із використанням програми «Pharmer» – алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. Алгоритм реалізований мовою програмування Java, має графічний інтерфейс та систему розпаралелення роботи. Перевагою цього алгоритму є поєднання оптимізації радіусів фармакофорних точок моделі, використання концепції ваг фармакофорних точок (ваги вказують на ступінь важливості конкретних точок моделі) і молекулярних дескрипторів (підхід QSAR).

Як скринінговий інструмент в алгоритмі використовується програма «Pharmer». Модуль «Obabel» з програмного пакета «OpenBabel» використовується для протонування лігандів, генерування молекулярних дескрипторів і напрацювання конформерів.

Як вхідні дані потрібні суперпозиція набору комплексів «рецептор – ліганд» до певної молекулярної мішені, валідаційна вибірка з активних і неактивних сполук для цієї ж мішені, а також колекція сполук для скринінгу. Спочатку відбувається усереднення фармакофорних точок моделей, згенерованих для кожного комплексу із суперпозиції, і розрахунок ваг точок у відповідному програмному модулі – так формується первинна неоптимізована модель. Для валідаційної вибірки в спеціальному для цього модулі обраховуються молекулярні дескриптори, їх середні значення, відхилення й корегувальні коефіцієнти (формується два набори таких параметрів – для активних і неактивних сполук окремо). Ці параметри, валідаційна вибірка і, власне, неоптимізована модель є вхідними даними для роботи модуля оптимізації фармакофорної моделі, що складається з блоків оптимізації радіусів фармакофорних точок, їх ваг і скорів за замовчуванням (для кожного типу фармакофорної точки). У результаті роботи цього модуля отримується оптимізована за всіма цими параметрами модель, готова до скринінгу.

Далі проводиться фармакофорний скринінг колекції сполук відносно оптимізованої моделі. Для цієї колекції також розраховуються молекулярні дескриптори. Результати скринінгу піддаються рескорингу у відповідному модулі – для досліджуваних сполук обраховується спеціальний скор (незалежний, не на основі показників *gmsd*, які дає Pharmer), який базується на перерахунку комплексів «ліганд – модель» з урахуванням ваг фармакофорних точок моделі та молекулярних дескрипторів (молекулярні дескриптори кожного ліганду зіставляються з параметрами, розрахованими для валідаційної вибірки).

Формула розрахунку скору при рескорингу:

$$S = \sum_i w(f_i) * S_{def}(f_i) * \frac{(t-d)}{t},$$

де S – скор, $w(f_i)$ – вага фармакофорної точки, $S_{def}(f_i)$ – скор за замовчуванням для певного типу фармакофорної точки, t – радіус фармакофорної точки, d – відстань між точками ліганду і моделі, що збіглися.

Цей скор домножується на корегувальний коефіцієнт, який розраховується за наведеною нижче схемою.

Спочатку формуються корегувальні коефіцієнти кожного конкретного

дескриптора:

$$k(d) = \pm \frac{1 - \text{dev}(d)/\text{aver}(d)}{\sum_i 1 - \frac{\text{dev}(i)}{\text{aver}(i)}}$$

де $k(d)$ – корегувальний коефіцієнт конкретного дескриптора, $\text{dev}(d)$ – його середнє відхилення, $\text{aver}(d)$ – його середнє значення, $\text{dev}(i)$ та $\text{aver}(i)$ – середнє відхилення та середнє значення i -того дескриптора.

У результаті формується таблиця параметрів, в якій для кожного дескриптора внесено його середнє відхилення, середнє значення та корегувальний коефіцієнт.

Схема розрахунку коефіцієнта, на який буде помножений ваговий скор при рескорингу, має такий вигляд:

1. $K = 1$;
2. $\text{descr}(i) > \text{aver}(i) - \text{dev}(i) \wedge \text{descr}(i) < \text{aver}(i) + \text{dev}(i) \Rightarrow K := K + k(i) * 3$;
3. $\text{descr}(i) \leq \text{aver}(i) - \text{dev}(i) \vee \text{descr}(i) \geq \text{aver}(i) + \text{dev}(i) \Rightarrow K := K - k(i)$

де K – коефіцієнт, на який буде помножений ваговий скор, $\text{descr}(i)$ – значення i -того дескриптора досліджуваного ліганду, $\text{aver}(i)$ – середнє значення цього дескриптора, узятє з таблиці параметрів, $\text{dev}(i)$ – середнє відхилення цього дескриптора, узятє з таблиці параметрів, $k(i)$ – корегувальний коефіцієнт цього дескриптора, узятий з таблиці параметрів.

Загальна схема роботи алгоритму представлена на рис. 11.

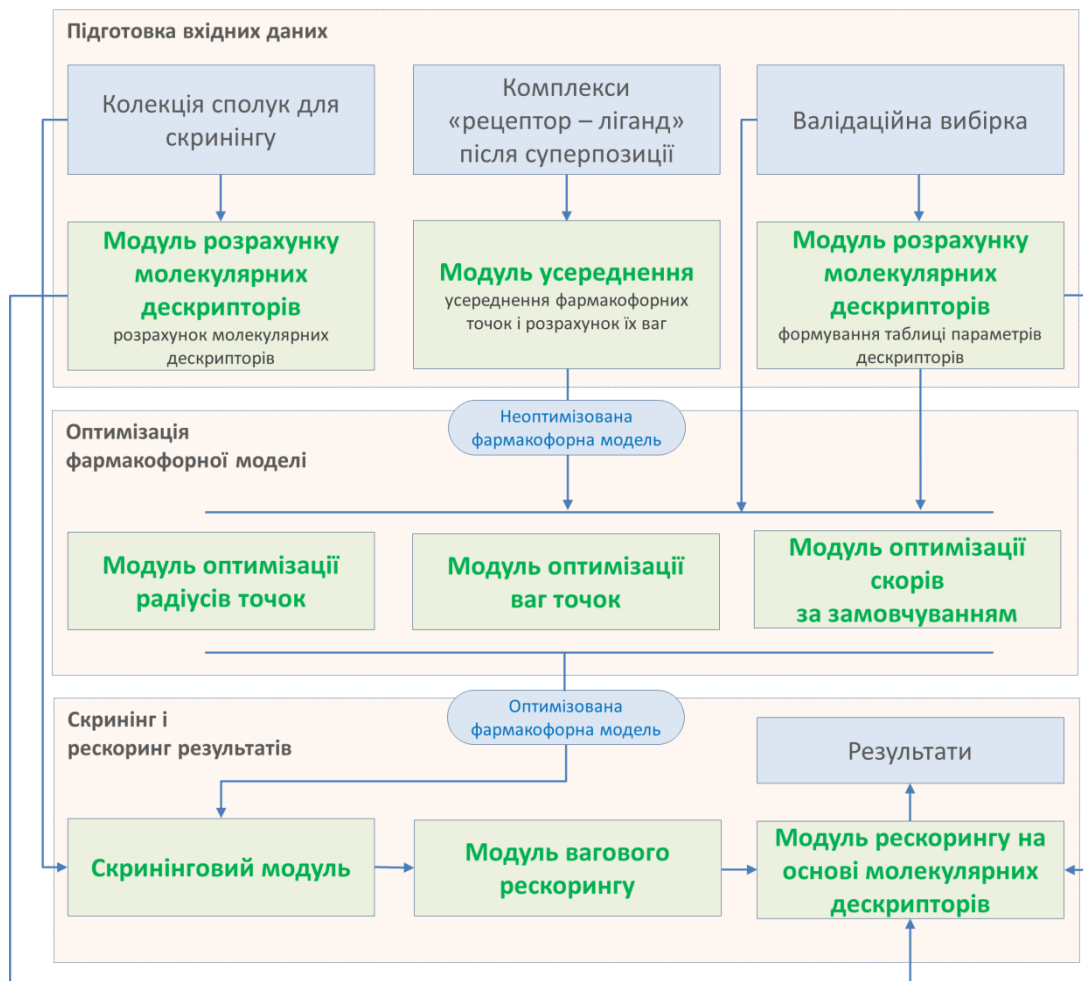


Рис. 11. Загальна схема роботи алгоритму

Оптимізація фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1 за допомогою цього алгоритму дала змогу збільшити кількість знаходження активних сполук при скринінгу валідаційної вибірки з 21 до 43 і покращити відсоток правильно знайдених активних сполук із 38 до 60 %. Оптимізація фармакофорної моделі інгібіторів СК2 дала змогу збільшити кількість знаходження активних сполук при скринінгу валідаційної вибірки з 12 до 39 і покращити відсоток правильно знайдених активних сполук із 58 до 74 %.

ВИСНОВКИ

Побудовано і валідовано фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та СК2. Знайдено нові інгібітори цих протеїнкіназ. Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу.

1. Створено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази СК2. Віртуальним скринінгом відносно цієї моделі знайдено інгібітори СК2 з активністю в наномолярному діапазоні.

2. Знайдено два нові класи інгібіторів СК2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они та тетраоло[1,5-с]хіназоліни. Значення IC_{50} активних сполук було в межах від 150 нМ до 5,3 мМ. Показано, що гетероциклічний фрагмент у структурі цих інгібіторів направлений до шарнірної ділянки кінази і визначає їх активність.

3. Розроблено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази FGFR1 на основі трьох комплексів каталітичної субодиниці FGFR1 із інгібіторами. Віртуальним скринінгом відносно цієї моделі знайдено інгібітори FGFR1 з активністю в мікромолярному діапазоні.

4. Знайдено три нові класи інгібіторів FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини, піридин-3-карбонітрили та низку інших сполук-хітів. Активні сполуки мали значення IC_{50} від 1,4 до 16 мМ. Показано, що активність інгібіторів FGFR1 визначають гідрофобні замісники цих сполук, які розташовані в обох гідрофобних кишнях I і II АТФ-зв'язувального сайту цієї протеїнкінази.

5. Побудовано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази ASK1. При валідаційному скринінгу колекції з 106529 сполук відносно цієї моделі 15 із 24 інгібіторів ASK1 було знайдено серед 500 лігандів із найвищим скором.

6. Знайдено новий клас інгібіторів протеїнкінази ASK1 – 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-они. Найактивніша сполука ВРyO-34 мала значення IC_{50} 520 нМ. Показано, що активність інгібіторів ASK1 зростає зі збільшенням гідрофобності замісника в четвертому положенні 1,5-дигідропірол-2-ону, що взаємодіє з гідрофобною ділянкою I АТФ-зв'язувального сайту ASK1.

7. Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. При скринінгу з використанням оптимізованих алгоритмом фармакофорних моделей кількість знаходження

активних сполук порівняно з неоптимізованими моделями збільшилася для FGFR1 з 21 до 43 і для СК2 – з 12 до 39, а відсоток правильно знайдених активних сполук покращився для FGFR1 з 38 до 60 % і для СК2 – з 58 до 74 %.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Похідні піридин-3-карбонітрилів як нові інгібітори протеїнкінази FGFR1 / С. А. Старосила, М. В. Протопопов, І. В. Дяченко, А. О. Баланда, В. Д. Дяченко, С. М. Ярмолук // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 32–37. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» піридин-3-карбонітрилів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази FGFR1, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

2. Pharmacophore approaches in protein kinase inhibitors design / S. A. Starosyla, G. P. Volynets, V. G. Bdzhola, A. G. Golub, S. M. Yarmoluk // *World Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 3, № 4. – P. 162–173. *Особистий внесок здобувача – аналіз фармакофорних моделей серин-треонінових і тирозінових протеїнкіназ, вирівнювання їх амінокислотних послідовностей та його аналіз.*

3. ASK1 pharmacophore model derived from diverse classes of inhibitors / S. A. Starosyla, G. P. Volynets, V. G. Bdzhola, A. G. Golub, M. V. Protopopov, S. M. Yarmoluk // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2014. – Vol. 24. – P. 4418–4423. *Особистий внесок здобувача – побудова ліганд-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1, її валідація та оптимізація. Власноруч написано основну частину статті.*

4. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 за допомогою фармакофорного моделювання / С. А. Старосила, Г. П. Волинець, М. В. Протопопов, В. Г. Бджола, С. В. Дзядевич, О. В. Боровиков, В. І. Матюшок, С. М. Ярмолук // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 23–34. *Особистий внесок здобувача – побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1, фармакофорний скринінг, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

5. Похідні тетразоло[1,5-с]хіназолінів як нові інгібітори протеїнкінази СК2 / С. А. Старосила, М. В. Протопопов, О. Ю. Воскобойнік, І. С. Носуленко, Л. М. Антипенко, О. М. Антипенко, І. М. Фесун, С. І. Коваленко, С. М. Ярмолук // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 12–17. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» тетразоло[1,5-с]хіназолінів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

6. Identification of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) inhibitors among the derivatives of benzothiazol-2-yl-3-hydroxy-5-phenyl-1,5-dihydro-pyrrol-2-one / S. A. Starosyla, G. P. Volynets, S. S. Lukashov, O. B. Gorbatiuk, A. G. Golub, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23. – P. 2489–2497.

Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування активного класу сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази ASK1, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.

7. Розробка інгібіторів протеїнкінази FGFR1 за допомогою фармакофорного моделювання / С. А. Старосила, Г. П. Волинець, М. В. Протопопов, В. Г. Бджола, С. В. Дзядевич, О. В. Боровиков, Л. В. Плетньова, С. М. Ярмолюк // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 13–20. *Особистий внесок здобувача – побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази SK2, фармакофорний скринінг, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

8. The development of algorithm for pharmacophore model optimization and rescoring of pharmacophore screening results / S. A. Starosyla, G. P. Volynets, M. V. Protopopov, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 24–34. *Особистий внесок здобувача – розробка концепції і математичного апарату алгоритму оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу, написання програмного коду алгоритму мовою програмування Java. Власноруч написано основну частину статті.*

9. Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 69413. Комп'ютерна програма «PharmDeveloper» – програма оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу («PharmDeveloper») / С. А. Старосила (UA), Г. П. Волинець (UA), В. Г. Бджола (UA), С. М. Ярмолюк (UA). – № 70098; заявл. 28.10.2016; опублік. 26.12.2016. *Особистий внесок здобувача – розробка концепції і математичного апарату та програмного коду алгоритму оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу.*

10. Пошук інгібіторів протеїнкінази ASK1 серед похідних 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону / С. А. Старосила, Г. П. Волинець, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолюк // *Тези XI Українського біохімічного конгресу*, 6–10 жовтня 2014 року, м. Київ, Україна. – *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – № 86. – С. 8470. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-онів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази ASK1, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

11. Раціональний дизайн низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1 / С. А. Старосила, М. В. Протопопов, С. С. Лукашов, Г. П. Волинець, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолюк // *Тези доповідей конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015», присвяченої 90-річчю заснування Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна, 23–24 квітня 2015 року.* – 2015. – С. 61. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування активного класу сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази ASK1, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

12. Похідні піридин-3-карбонітрилів як нові інгібітори протеїнкінази FGFR1 / М. В. Протопопов, С. А. Старосила, С. М. Дяченко, С. М. Ярмолюк // Тези доповідей конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015», присвяченої 90-річчю заснування Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна, 23–24 квітня 2015 року. – 2015. – С. 57. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування активного класу сполук в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази FGFR1, біохімічне тестування.*

13. Rational discovery of apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibitors / G. P. Volynets, S. A. Starosyla, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // Abstract of FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course «Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools», May 27th – June 1st, 2016, Spetses Island, Greece. – 2016. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування інгібіторів в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази ASK1, біохімічне тестування.*

АНОТАЦІЯ

Старосила С. А. Розробка фармакофорних моделей та інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена розробці фармакофорних моделей та низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2 людини методами комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування. Уперше побудовано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів ASK1 і валідовано її *in silico*; розроблено й охарактеризовано новий клас інгібіторів цієї кінази – 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-они, найактивніша сполука якого – ВРyO-34 – мала значення IC_{50} 520 nM. Побудовано рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази CK2 та експериментально її валідовано; розроблено й охарактеризовано два нових класи інгібіторів цього ензиму – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они і тетразоло[1,5-с]хіназоліни, сполуки яких мали значення IC_{50} від 150 nM до 5,3 μ M. Побудовано рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів FGFR1 та експериментально її валідовано; розроблено й охарактеризовано три нові класи інгібіторів цієї кінази – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини, піридин-3-карбонітрили і низку інших сполук-хітів, що мали значення IC_{50} від 1,4 до 16 μ M. Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу та протестовано його на фармакофорних моделях інгібіторів FGFR1 і CK2. Алгоритм дав змогу суттєво покращити їх якісні характеристики.

Ключові слова: фармакофорна модель, скринінг, протеїнкіназа, інгібітор, ASK1, FGFR1, CK2.

SUMMARY

Starosyla S. A. Development of pharmacophore models and inhibitors of protein kinases ASK1, FGFR1 and CK2. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the development of pharmacophore models and low-molecular inhibitors for human protein kinases ASK1, FGFR1 and CK2 using methods of computer modeling and biochemical testing.

We have developed and validated for the first time ligand-based pharmacophore model of ASK1 inhibitors. The utility of our pharmacophore model on the library containing 106529 compounds showed that the model is able to accurately differentiate the inhibitors of ASK1 with various activities. Therefore, this pharmacophore model can be helpful in designing novel ASK1 inhibitors.

Using molecular modeling techniques we have identified novel chemical class of ASK1 inhibitors, namely benzothiazol-2-yl-3-hydroxy-5-phenyl-1,5-dihydro-pyrrol-2-ones. It was found that the most active compound 1-(6-fluoro-benzothiazol-2-yl)-3-hydroxy-5-[3-(3-methyl-butoxy)-phenyl]-4-(2-methyl-2,3-dihydro-benzofuran-5-carbonyl)-1,5-dihydro-pyrrol-2-one (BPyO-34) inhibits ASK1 with IC_{50} of 0.52 μM *in vitro* in kinase assay. The structure-activity relationships of 34 derivatives of benzothiazol-2-yl-3-hydroxy-5-phenyl-1,5-dihydro-pyrrol-2-one have been studied and binding mode of this chemical class has been proposed. The inhibitors from this chemical class are in accordance with the developed pharmacophore model of ASK1 inhibitors. The most active derivatives of benzothiazol-2-yl-3-hydroxy-5-phenyl-1,5-dihydro-pyrrol-2-one which possess submicromolar inhibitory activity toward ASK1 can be used for biological experiments.

We have generated receptor-based pharmacophore model of FGFR1 inhibitors and performed pharmacophore screening which allowed us to identify two novel classes of FGFR1 inhibitors – 3-(1-benzyl-1H-indol-3-yl)-2-cyanoacrylic acids, N-[(phenylmethylidene)amino]thioureas, and several hit compounds. The inhibitors have IC_{50} values in the range from 1.4 to 16 μM . These compounds can be used in biochemical experiments for the study of FGFR1 role in cellular processes and can be the basis for further optimization.

In order to search new FGFR1 inhibitors we have also performed molecular docking experiments with further biochemical testing and as a result pyridine-3-carbonitrile derivatives inhibiting FGFR1 with IC_{50} values in the range from 1.58 to 6.9 μM have been identified. These compounds can be promising for further optimization to improve activity and selectivity toward FGFR1.

We have developed receptor-based pharmacophore model of CK2 inhibitors and performed pharmacophore screening which allowed us to identify novel class of CK2 inhibitors – 2-(phenylamino)-5-(phenylmethylidene)-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-ones. The most active compounds possess submicromolar inhibitory activity against CK2 (IC_{50} = 150 nM). These compounds experimentally confirmed capacity of developed CK2

inhibitors pharmacophore model. The identified inhibitors can be used for study of CK2 cellular functions and can be basis for the development of pharmaceutical agents against diseases associated with enhanced CK2 activity.

In order for find new CK2 inhibitors we have also carried out molecular docking with further kinase assay *in vitro*. Derivatives of tetrazolo[1,5-c]quinazolines have been identified as micromolar CK2 inhibitors. These compounds are promising for further optimization and development of more active and selective inhibitors of CK2.

The algorithm for pharmacophore model optimization and rescoring of pharmacophore screening results was developed. The algorithm was written in the Java programming language, has a graphical interface and a system of parallelization. The algorithm was validated based on pharmacophore models of FGFR1 and CK2 inhibitors. In the case of FGFR1 pharmacophore model, the application of algorithm allowed to increase the number of active compounds identified during screening of validation set from 21 to 43 and percent of correctly found active compounds in the top was increased from 38 to 60 %. In the case of CK2 pharmacophore model, the number of active compounds identified during screening of validation set increased from 12 to 39 and percent of correctly found active compounds in the top increased from 58 to 74 %.

Thus, the generated pharmacophore models combined with the algorithm for pharmacophore model optimization and rescoring are an effective tool for virtual screening experiments aimed at the development of novel highly active and selective inhibitors for protein kinases ASK1, FGFR1 and CK2.

Keywords: pharmacophore model, screening, protein kinase inhibitor, ASK1, FGFR1, CK2.

АННОТАЦИЯ

Старосила С. А. Разработка фармакофорных моделей и ингибиторов протеинкиназ ASK1, FGFR1 и CK2. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена разработке фармакофорных моделей и низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ ASK1, FGFR1 и CK2 человека методами компьютерного моделирования и биохимического тестирования. Впервые построено лиганд-ориентированную фармакофорную модель ингибиторов протеинкиназы ASK1 и валидировано ее *in silico*; разработан и охарактеризован новый класс ингибиторов этой киназы – 1-бензотиазол-2-ил-3-гидрокси-5-фенил-1,5-дигидропиррол-2-оны, наиболее активное соединение которого – ВРyО-34 – имело значение IC_{50} 520 нМ. Построено рецепторно-ориентированную фармакофорную модель ингибиторов протеинкиназы CK2 и экспериментально ее валидировано; разработаны и охарактеризованы два новых класса ингибиторов этого энзима – 2-(фениламино)-5-(фенилметилен)-4,5-дигидро-1,3-тиазол-4-оны и тетразол[1,5-с]хиназолины, соединения которых имели значения IC_{50} от 150 нМ до 5,3 мМ. Построено рецепторно-ориентированную фармакофорную модель

ингибиторов FGFR1 и экспериментально ее валидировано; разработаны и охарактеризованы три новых класса ингибиторов этой протеинкиназы – 3-(1-бензил-1H-индол-3-ил)-2-цианоакриловые кислоты, [(фенилметилен)амино]-тиомочевины, пиридин-3-карбонитрилы и ряд других соединений-хитов, имевших значение IC₅₀ от 1,4 до 16 мМ. Разработан алгоритм оптимизации фармакофорных моделей и рескоринга результатов фармакофорного скрининга. Его протестировано на фармакофорных моделях ингибиторов FGFR1 и CK2. Алгоритм позволил существенно улучшить их качественные характеристики.

Ключевые слова: фармакофорная модель, скрининг, протеинкиназа, ингибитор, ASK1, FGFR1, CK2.