

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

СТАРОСИЛА СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 577.322

РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНИХ МОДЕЛЕЙ ТА ІНГІБІТОРІВ
ПРОТЕЇНКІНАЗ ASK1, FGFR1 І СК2

Спеціальність 03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук

Науковий керівник

Ярмолюк Сергій Миколайович

доктор хімічних наук, професор

Київ – 2017

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1 Фармакофорне моделювання інгібіторів тирозинових протеїнкіназ.....	13
1.2 Фармакофорне моделювання інгібіторів серин/треонінових протеїнкіназ.....	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	30
2.1 Молекулярний докінг.....	30
2.1.1 Підготовка молекул лігандів.....	30
2.1.2 Підготовка рецептора.....	30
2.1.3 Гнучкий докінг.....	31
2.2 Фармакофорне моделювання.....	32
2.2.1 Підготовка молекул лігандів і рецептора.....	32
2.2.2 Побудова фармакофорної моделі.....	33
2.2.3 Фармакофорний скринінг.....	34
2.3 Скринінг in vitro.....	35
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ АКТИВНИХ САЙТІВ ПРОТЕЇНКІНАЗ, ДЛЯ ЯКИХ РОЗРОБЛЕНО ФАРМАКОФОРНІ МОДЕЛІ.....	39
РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ ASK1 І ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ.....	41

4.1 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1.....	41
4.2 Побудова фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1 на основі відомих інгібіторів із різних хімічних класів.....	49
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ FGFR1 І ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ.....	
5.1 Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1.....	64
5.2 Фармакофорний скринінг, відбір та тестування сполук <i>in vitro</i>	67
5.3 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази FGFR1.....	72
РОЗДІЛ 6. РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 ТА ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ.....	
6.1. Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази СК2.....	78
6.2 Фармакофорний скринінг, відбір та тестування сполук <i>in vitro</i>	82
6.3 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2.....	91
РОЗДІЛ 7. РОЗРОБКА АЛГОРИТМУ ОПТИМІЗАЦІЇ ФАРМАКОФОРНИХ МОДЕЛЕЙ І РЕСКОРИНГУ РЕЗУЛЬТАТІВ ФАРМАКОФОРНОГО СКРИНІНГУ.....	
7.1 Підготовка вхідних даних для алгоритму.....	98
7.2 Розробка модуля усереднення.....	99
7.3 Розробка модуля вагового рескорингу.....	104
7.4 Розробка модуля рескорингу на основі молекулярних дескрипторів.....	107

7.5 Розробка модуля оптимізації радіусів, вагів та скорів за замовчуванням фармакофорних точок.....	108
7.6 Валідація алгоритму.....	111
7.6.1 Валідація алгоритму на основі фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1.....	111
7.6.2 Валідація алгоритму на основі фармакофорної моделі інгібіторів СК2.....	114
РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ.....	118
ВИСНОВКИ.....	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- ASK1 – Appoptosis signal-regulating kinase 1 (апоптоз сигнал-регулююча кіназа 1)
- FGFR1 – Fibroblast growth factor recceptor 1 (рецептора фактора росту фібробластів 1)
- CK2 – Caseine kinase 2 (казеїн кіназа 2)
- EGFR – Epidermal growth factor recceptor (рецептор епідермального фактора росту)
- VEGFR – Vascular endothelial growth factor recceptor (судинний рецептор фактора росту ендотелію)
- Tie2 – TEK tyrosine kinase (ТЕК тирозинкіназа)
- Syk – Spleen tyrosine kinase (тирозинкіназа селезінки)
- ZAP-70 – Zeta-chain-associated protein kinase 70 (Z-ланцюг-пов'язана протеїнкіназа 70)
- ABL – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog (вірусний гомолог онкогену мишачого лейкозу Абельсона)
- FAK – Focal adhesion kinase (адгезія-опосередкована кіназа)
- JAK – Janus kinase (Янус кіназа)
- CDK – Cyclin-dependent kinase (циклін-залежні кіназа)
- MAPK – Mitogen-activated protein kinase (мітоген-активована протеїнкіназа)
- GSK-3 – Glycogen synthase kinase-3 (глікоген синтази кіназа-3)
- CLK – CDK-like kinase (- CDK-подібна кіназа)
- Dyrk – Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (подвійної специфічності фосфорилування тирозину-регулююча кіназа)
- Chk1 – Checkpoint kinase 1 (контрольно-пропускна кіназа 1)
- hIKK-2 – Human inhibitor NF- κ B kinase 2 (людський інгібітор NF- κ B-кінази 2)
- PLKs – Polo-like kinases (поло-подібні кінази)
- JNK – c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-кінцева кіназа)
- mTOR – Mammalian target of rapamycin (мішень рапаміцину ссавців)
- PKB – Protein kinase B (протеїнкіназа B)
- BSA – Bovine serum albumin (бичачий сироватковий альбумін)

cpm – Counts per minute (число імпульсів в хвилину)

DMSO – Dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)

DTT – Dithiothreitol (дітіотритол)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)

EGTA – Ethylene glycol tetraacetic acid

MBP – Myelin basic protein (основний білок мієліну)

MOPS – 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота)

RMSD – Root-mean-square deviation (середньоквадратичне відхилення)

АТФ – Аденозинтрифосфат

IC₅₀ – Концентрація інгібітора, при якій активність ензиму становить 50% від початкової

ВСТУП

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 «Рациональний 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 ^{32}P .

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 тетразоло[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 рисунків і 15 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 137 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Протеїнкінази – це група ензимів, які ковалентно модифікують протеїни шляхом приєднання фосфатних груп (від АТФ), до залишків серину, треоніну чи тирозину і таким чином беруть участь в трансдукції сигналів у клітині [1]. Кінази відіграють важливу роль у різних клітинних процесах і є перспективними мішенями для терапевтичного втручання при лікуванні низки захворювань людини [2]. За останнє десятиліття близько 20 медичних препаратів, спрямованих на модуляцію активності протеїнкіназ були схвалені для клінічного використання, і ще сотні проходять клінічні випробування [3].

Фармакофорне моделювання стало важливим інструментом у розробці ліків. Фармакофор – це ансамбль стеричних та електронних особливостей, необхідних для забезпечення оптимальних взаємодій лігандів зі специфічною біологічною мішенню, а також для індукції (або блокування) його біологічної функції [4]. Існує два методи генерації фармакофорних моделей: прямий і непрямий. При прямому методі побудови за основу використовується просторова структура комплексу рецептору з лігандом (зазвичай називається рецепторно-орієнтований метод), а при непрямому методі використовується набір лігандів із експериментально дослідженими активностями відносно певної біологічної мішені (так званий ліганд-орієнтований метод) [5].

Фармакофорний скринінг дозволяє знаходити сполуки, що мають оптимально орієнтовані групи атомів, комплементарні до сайту зв'язування мішені. Фармакофорні моделі використовуються для скринінгу великих бібліотек сполук *in silico* з метою пошуку нових інгібіторів ензимів.

1.1 Фармакофорне моделювання інгібіторів тирозинових протеїнкіназ

Тирозинові протеїнкінази – це родина ензимів, які каталізують перенесення фосфатної групи від АТФ на амінокислотні залишки тирозину протеїнів-мішеней у клітині. Ця ковалентна посттрансляційна модифікація є ключовим компонентом для регулювання різних біологічних процесів, таких як ріст, диференціювання, метаболізм та апоптоз. Нещодавно було показано, що тирозинові протеїнкінази відіграють важливу роль у розвитку різних хвороб і тому є привабливими мішенями для пошуку терапевтичних агентів.

Тирозинові протеїнкінази класифікують на рецепторні тирозинові кінази такі як FGFR (Fibroblast growth factor receptor 1), EGFR (Epidermal growth factor receptor), VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor), Tie2 (TEK tyrosine kinase, endothelial) та нерецепторні тирозинові кінази такі як Syk (Spleen tyrosine kinase), ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70), ABL (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog), SRC, FAK (Focal Adhesion Kinase), JAK (Janus kinase) [6]. Кожна з рецепторних тирозинових кіназ містить екстрацелюлярний ліганд-зв'язувальний домен, трансмембранну гідрофобну спіраль та внутрішньоклітинний домен, що володіє тирозинкіназною активністю [7]. Нерецепторні тирозинові кінази є цитозольними протеїнами, що володіють значною структурною різноманітністю. Вони мають кіназний домен та часто включають декілька додаткових доменів, що відповідають за протеїн-протеїнові взаємодії, зокрема SH2 (Src Homology 2), SH3 (Src Homology 3) та PH (Pleckstrin homology) домени [6].

Фармакофорні моделі для інгібіторів EGFR. Родина рецепторів епідермального фактору росту (EGFR) включає чотири рецептори, що знаходяться в мембрані клітини: HER1 (EGFR/ErbB1), HER2/Neu (erbB2), HER3 (ErbB3) і HER4 (ERBB4) [7]. Зв'язування специфічних лігандів до трьох із цих рецепторів призводить до їх димеризації та активації. HER2 не взаємодіє з лігандами, але димеризується з іншими членами родини EGFR, що взаємодіють з лігандами [8].

HER1 (EGFR/erbB1): Надекспресія і надактивація HER1 пов'язані з розвитком різних видів раку, зокрема, раку простати, шлунку, грудей, підшлункової залози, яєчників, легень, карциноми голови та шиї, гліоми, колоректального раку [9]. Порушена регуляція сигнального шляху EGFR призводить до розвитку псоріазу, екземи та атеросклерозу [10, 11]. Таким чином, інгібітори EGFR потенційно можуть бути використані для розробки лікарських препаратів проти вищезазначених хвороб та патологічних станів.

Furet та ін. (Novartis) опублікували першу фармакофорну модель для АТФ-конкурентних інгібіторів EGFR. Згідно з цією моделлю, АТФ-зв'язувальний сайт тирозинових кіназ складається з п'яти ділянок. Три з цих ділянок, а саме, аденін-зв'язувальна ділянка, ділянка зв'язування рибози та фосфат-зв'язувальна, є в першу чергу важливими для афінності. Дві інші ділянки – гідрофобна ділянка I та гідрофобна ділянка II відповідають за спорідненість до рецептора і можуть бути використані для поліпшення селективності інгібіторів [12].

Також іншими авторами було розроблено псевдорецепторну модель для EGFR з використанням методу FLARM [13]. Ця модель показує можливі взаємодії між рецептором і лігандом включаючи два водневі зв'язки, одну гідрофобну та одну сульфур-ароматичну взаємодії, що відповідають фармакофорній моделі Novartis. Таким чином, фармакофорна модель Novartis і псевдорецепторна модель можуть бути використані для фармакофорного скринінгу з метою розробки нових інгібіторів EGFR.

HER2 (erbB2): Було показано, що HER2 відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні близько 20-30% випадків первинного раку молочної залози, яєчників, раку шлунка [14]. Було показано, що застосування герцептину (моноклонального антитіла проти ектодомену HER2) в комбінації з хіміотерапією, призводить до значної регресії метастатичних пухлин молочної залози з гіперекспресією HER2 [15]. Таким чином, інгібування HER2 може розглядатися як перспективний спосіб контролю розвитку злоякісних пухлин.

Було знайдено дві групи низькомолекулярних сполук, які володіють інгібувальною активністю по відношенню до HER2. Був використаний ліганд-

орієнтований підхід для побудови фармакофорної моделі HER2 [16]. В процесі цієї роботи фармакофорна модель була згенерована в програмі Catalyst з використанням алгоритму Полінга. Із розрахованих результатів обрали найкращу модель з чотирма фармакофорними точками – акцептором та донором водневого зв'язку, аліфатичним гідрофобним центроїдом та ароматичною точкою. З цього помітно, що гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки мають вирішальне значення для зв'язування ліганду з тирозиновими протеїнкіназами.

Фармакофорне моделювання для інгібіторів VEGFR. Сигнальні шляхи за участі VEGFR регулюють розвиток судин, ангиогенез, лімфангіогенез [17] і беруть участь у розвитку широкого діапазону захворювань, включаючи ріст пухлин, метастазування, атеросклероз, і запальні захворювання [18]. Таким чином, є підстави вважати VEGFR привабливою терапевтичною мішенню.

Фармакофорне моделювання інгібіторів VEGFR опубліковане в статтях [18,19].

Ліганд-орієнтована фармакофорна модель створена за допомогою програми Catalyst з використанням алгоритму Полінга і методу “кращого конформаційного аналізу”. Було отримано модель, яка складалася з чотирьох точок: акцептора та донора водневого зв'язку, гідрофобної та ароматичної точок. Просторова структура 4-аміно-фуру[2,3-D]піримідину, який був взятий з кристалічної структури (PDB ID: 1YWN) була використана для створення молекулярної форми. Об'єднані форма і модель застосовувалися для скринінгу бази даних Maybridge. У результаті було виявлено новий потенційний інгібітор VEGFR кінази, який мав активність на клітинних лініях [18].

Дві рецепторно-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази VEGFR2 були побудовані за допомогою програмного забезпечення SBF. Перша модель ґрунтувалася на кристалічній структурі 1Y6A, з використанням водневих зв'язків із Glu915, Cys917 і Asn921. Друга фармакофорна модель базувалася на кристалічній структурі 1YWN: амідні групи Cys917 і Asp1044 головного ланцюга були використані в якості донорів водневого зв'язку, Оксиген карбонільної групи Glu883 був використаний в ролі акцептору водневого зв'язку. Отримані

результати свідчать про важливість наявності акцептора водневого зв'язку і двох донорів водневого зв'язку [19].

ЈАК2 і ЈАК3: ЈАК2 і ЈАК3 є нерецепторними тирозиновими протеїнкіназами, що беруть участь в розвитку захворювань опосередкованих В- і Т-клітинами [20]. Інгібування цих кіназ може бути потенційною стратегією для лікування лімфоїдних захворювань.

Фармакофорні моделі ЈАК2 і ЈАК3 були згенеровані за допомогою PHASE, високоефективного програмного модуля для ліганд-орієнтованого дизайну активних сполук, що входить до пакету програм Schrödinger. PHASE згенерував шість фармакофорних точок: акцептор водневого зв'язку, донор водневого зв'язку, гідрофобну, негативно заряджену, позитивно заряджену точки та ароматичне кільце. Дві ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі були отримані для низки інгібіторів ЈАК2 і ЈАК3 щоб з'ясувати головні структурні особливості, необхідні для інгібування обох ензимів. Ці моделі є корисними для пошуку нових сполук, що володіють інгібувальною активністю щодо обох ензимів. Краща гіпотеза для ЈАК2 показує, що інгібітори ЈАК2 мають містити один акцептор водневого зв'язку (А), один донор (D) і дві ароматичні точки (R). Краща модель для ЈАК3 була ADDRR. Коефіцієнт Пірсона-р для тестового набору молекул показав високу передбачувальну здатність цих моделей [20].

Јуk та ZAP-70: Јуk і ZAP-70 – цитозольні нерецепторні тирозинкінази, які відіграють важливу роль у внутрішньоклітинному сигналюванні гематопоетичних клітин [21]. Јуk в основному експресується в тромбоцитах, В-лімфоцитах, лаброцитах, базофілах, нейтрофілах, дендритних клітинах, макрофагах і моноцитах [22-24], тоді як ZAP-70 – в Т-лімфоцитах і природних кілерах [24-25]. Було показано, що Јуk є потенційною мішенню для лікування гіперчутливих реакцій типу I, включаючи алергічний риніт, астму, анафілаксії й аутоімунні захворювання, такі як ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак та розсіяний склероз [23, 26].

Для низки низькомолекулярних інгібіторів Јуk і ZAP-70 були отримані дві статистично достовірні фармакофорні моделі за допомогою програми PHASE.

Згенеровані фармакофорні моделі в поєднанні з молекулярним докінгом дозволили знайти 27 інгібіторів, що інгібують одночасно обидві протеїнкінази [24].

Крім того, 3D-фармакофорна модель для інгібіторів Syk була розроблена іншими авторами за допомогою модулів HipHop і HuroRefine в програмному пакеті Catalyst. На основі цієї моделі було знайдено шість сполук з хорошою інгібувальною активністю відносно Syk [21].

Tie2: Tie-2 є рецепторною тирозинкіназою, що експресується переважно в ендотеліальних клітинах і необхідна для формування кровоносних судин. Рецептор бере участь у формуванні протизапальної дії в ендотеліальних клітинах, пригнічуючи VEGF- та TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)- індуковану експресію молекул адгезії лейкоцитів і прокоагулянтного тканинного фактору [27]. Tie-2 також задіяний в патологічному ангиогенезі, що включає рак, псоріаз, хороїдальну неоваскуляризацію та ангиогенез при ревматоїдному артриті [28]. Залучення Tie-2 в патологічний ангиогенез робить цей клітинний рецептор привабливою терапевтичною мішенню.

Фармакофорне моделювання для розробки Tie2 інгібіторів I і II типу проводили за допомогою модулів HipHop і HuroRefine в програмному пакеті Catalyst. Для інгібіторів I типу було проведено якісне фармакофорне моделювання у зв'язку з відсутністю високоактивних сполук і обмеженою структурною різноманітністю відомих інгібіторів I типу. Найкраща гіпотеза включала один акцептор водневого зв'язку, один донор водневого зв'язку, одну гідрофобну точку, одну ароматичну гідрофобну та одну кільцеву ароматичну точку. Для розробки інгібіторів II типу, за допомогою HipHop спочатку було проведено якісне фармакофорне моделювання з метою виявлення властивих для цих інгібіторів фармакофорних точок. З урахуванням інформації, отриманої з модуля HipHop було проведено кількісне фармакофорне моделювання з використанням модуля HuroRefine. Краща модель складалася з двох донорів водневих зв'язків, однієї ароматичної гідрофобної точки і двох загальних гідрофобних точок, а також двох виключених об'ємів. Для валідації моделей були використані тестові набори

інгібіторів та методи крос-валідації. Результати показали хорошу кореляцію між експериментальними і передбаченими значеннями IC_{50} , що свідчить про хорошу передбачувальну здатність моделей [29].

1.2 Фармакофорне моделювання інгібіторів серин/треонінових протеїнкіназ

Серин/треонінові протеїнкінази фосфорилують ОН-групи залишків серину або треоніну протеїнів-мішеней. Серед еукаріотичних протеїнкіназ, серин/треонінові кінази можна розділити на шість великих груп: AGC (містить PKA, PKC і PKG), CaMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) групу, CMGC (CDK (cyclin-dependent kinases)), MAPK (mitogen-activated protein kinase), GSK (Glycogen synthase kinase-3) і CLK (CDK-like kinase), STE (гомологи STE11 і Ste20), CK1 (casein kinase-1) і TKL (Tyrosine kinase-like). Наявні структурні дані для представників кожної з груп показують, що вони мають загальну для всіх кіназ архітектуру [28].

CLK і Dyrk (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase): протеїнкіназа Dyrk має подвійну специфічність, оскільки вона фосфорилує амінокислотні залишки серину, треоніну та тирозину. Dyrk1A має підвищений рівень експресії при хворобі Дауна та залучена в розвиток інших патологічних станів – нейродегенерації, гіпертрофії серця та гомеостазу кісток [31, 32]. Таким чином, інгібування Dyrk1A може бути ефективним підходом для лікування цих хвороб. Протеїнкіназа Clk залучена в регуляцію альтернативного сплайсингу лізоформ мРНК. Таким чином, модуляція активності Clk може бути важливим механізмом для контролю сплайсингу мРНК [33].

Фармакофорні моделі інгібіторів Dyrk1A та Clk4 були побудовані на основі структури п'яти найактивніших сполук. Обидві гіпотези представлені як AAARR, вказуючи на те, що вони включають три акцептори водневого зв'язку та дві гідрофобні групи. Моделі асоційовані з Dyrk1A та Clk4 мають фармакофорні точки, розташовані в подібних позиціях, оскільки обидва сети активних сполук

мають подібні структурні кори. Для обох моделей, два акцептори водневого зв'язку і одна гідрофобна група відповідають хінізоліновому кільцю, що є спільним для всіх досліджуваних сполук. Інші дві фармакофорні точки – акцептор водневого зв'язку і гідрофобна група відповідають заміснику R3 1,3-бензодіоксолу, що є спільним для всіх вибраних інгібіторів [34].

Chk1 (Checkpoint kinase 1): Chk1 – серин/треонінова кіназа, що відіграє інтегральну роль в регуляції прогресії клітинного циклу, поділу нормальних клітин та є критичним компонентом для відповіді клітини на пошкоджену ДНК. Інгібування кінази Chk1 призводить до порушення переходу G2/M, що запобігає мітозу у присутності пошкоджень ДНК, і в кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин. Це свідчить про потенційне терапевтичне застосування інгібіторів Chk1 в лікуванні раку [35].

Фармакофорне моделювання для Chk1 проводили за допомогою програмного пакета Catalyst. Спільні фармакофорні точки, що є важливими для високоактивних інгібіторів Chk1, були визначені програмою HipHop. Найкраща модель включала чотири точки: акцептор та донор водневого зв'язку, гідрофобну і ароматичну точки [36].

hIKK-2 (Human inhibitor NF- κ B kinase 2): hIKK-2 – серин /треонінова протеїнкіназа, що належать до IKK комплексу і є основним компонентом, що забезпечує активацію ядерного транскрипційного фактора κ B (NF- κ B) у відповідь на дію індукторів запалення. Інгібітори hIKK-2 можуть мати терапевтичне застосування для пацієнтів, які страждають від хронічних запальних захворювань.

Рецепторно-орієнтована фармакофорна модель hIKK-2 була згенерована за допомогою програми LigandScout на основі комплексів протеїн-ліганд, які були отримані за допомогою докінгу АТФ-конкурентних інгібіторів у активний сайт hIKK-2. Конформації лігандів, які мають обов'язкові риси АТФ-конкурентних інгібіторів кінази (наприклад, формування водневих зв'язків із основним ланцюгом амінокислотних залишків у шарнірній області (сегмент 96-99 в амінокислотній послідовності hIKK-2)) і гідрофобні взаємодії з гідрофобною кишенею hIKK-2 (Val29, Lys44, Val152 і Ile65) були взяті за основу при побудові

моделі. У результаті цього аналізу, 43 конформації 21 інгібітора hPKK-2 були використані для генерації структурно-орієнтованої фармакофорної моделі. Ця гіпотеза містила один акцептор та два донори водневого зв'язку і одну гідрофобну точку, спільні для більшості з 43 конформацій [37].

CDK1: CDK1 – серин/треонінова протеїнкіназа, яка відіграє ключову роль у промотуванні мітозу [38]. Інгібітори CDK1 ефективно пригнічують ріст пухлинних клітин і тому останнім часом розробка нових високоактивних інгібіторів CDK1 викликає значний інтерес у сучасній фармакології [39].

Низка достовірних моделей для інгібіторів CDK1 були побудовані за допомогою модуля НуроGen з програмного пакету Catalyst. НуроGen ідентифікує 3D-масив не більше, ніж з п'яти фармакофорних точок, спільних для всіх активних лігандів із навчальної вибірки. Це можуть бути донори і акцептори водневих зв'язків, ароматичні, аліфатичні, гідрофобні точки, позитивні і негативні йонні групи. Конформаційна рухливість сполук навчальної вибірки моделюється шляхом створення багатьох конформерів, які охоплюють певний енергетичний діапазон, властивий вхідній молекулі. Якісні фармакофорні моделі доповнюються виключеними об'ємами. Оптимальні стеричні моделі інгібіторів CDK1 були використані для скринінгу NCI бази лікарських та агрохімічних сполук. В результаті, десять відібраних при скринінгу сполук продемонстрували мікромольну інгібувальну активність щодо CDK1. Це дає підстави вважати, що згенерована модель може бути корисною для пошуку потенційних інгібіторів CDK1 [40].

CDK2: CDK2 є важливою протеїнкіназою для ініціації синтезу ДНК у вищих еукаріот і потрібна для регуляції поділу клітин та успішного переходу із S у G₂ фазу клітинного циклу [42]. Важливість CDK2 в регуляції клітинного циклу є підставою для пошуку низькомолекулярних інгібіторів цього ензиму як потенційних протиракових препаратів.

Декілька ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей для низькомолекулярних інгібіторів CDK2 були отримані за допомогою програмного пакету Catalyst незалежно різними групами авторів: Necker та ін. [43], Toba та ін.

[44], і Vadivelan та ін. [45]. Мультикомплексна фармакофорна модель на основі низки комплексів рецептор-інгібітор була побудована Zou та ін. за допомогою програми LigandScout [46]. Слід зазначити, що під час конструювання фармакофорної моделі програма Catalyst бере до уваги лише інформацію про ліганди тоді як LigandScout створює фармакофорні точки моделі, коли ідентифіковано основні взаємодії між інгібітором та рецептором.

Автори мультикомплексної фармакофорної моделі порівняли їхню гіпотезу з іншими відомими фармакофорними моделями інгібіторів CDK2. Було виявлено, що кожна фармакофорна точка в ліганд-орієнтованій фармакофорній моделі накладається з відповідною точкою в мультикомплексній фармакофорній моделі. Це дозволяє стверджувати, що остання містить більше інформації, ніж три інші. Детальніше, під час вирівнювання фінальної моделі, згенерованої Necker та ін. із мультикомплексною фармакофорною моделлю, було показано, що акцептор водневого зв'язку ліганд-орієнтованої моделі відповідає фармакофорній точці, що відображує взаємодію низькомолекулярного інгібітора із шарнірною ділянкою (A1); донор водневого зв'язку в моделі Necker та ін. відповідає точці, що відображує взаємодію з Gln131 (D5); гідрофобні точки відповідають точкам, розташованим у районах, доступних для розчинника (H1) та в рибозо-фосфат-зв'язувальному сайті (H3). Фармакофорна модель згенерована Toba та ін. включала два донори водневих зв'язків та три гідрофобні точки. Кожна з цих точок співпадала відповідно з точками D1, D5, H1, H2 та H3 мультикомплексної фармакофорної моделі. Фармакофорна гіпотеза, сконструйована Vadivelan та ін. включала два акцептори водневого зв'язку, один донор водневого зв'язку і гідрофобну точку. У порівнянні з мультикомплексною фармакофорною моделлю, один із акцепторів водневого зв'язку відповідав точці, що розташована поблизу Asp86 (A3), інший акцептор водневого зв'язку відображував взаємодію з Lys33 (A4). Донор водневого зв'язку та гідрофобна точка моделі, згенерованої Vadivelan відповідають точкам D1 та H3 мультикомплексної фармакофорної гіпотези, відповідно [45].

PLKs (Polo-like kinases): PLKs – серин/треонінові протеїнкінази, що існують в чотирьох ізоформах: PLK1, PLK2, PLK3 і PLK4. Показано, що тільки одна з цих ізоформ, PLK1, бере участь у регуляції хромосомної сегрегації, дозріванні centrosом, формуванні біполярного веретена та цитокінезу [46]. Було виявлено надекспресію PLK1 в багатьох типах пухлин, зокрема при раку легень, молочних залоз, товстої кишки, підшлункової залози, простати та яєчників. Це вказує на те, що PLK1 є потенційною терапевтичною мішенню [47].

Фармакофорні моделі інгібіторів PLK1 були сконструйовані за використання модулів HipHop та HuroGen програми Catalyst. Найраца якісна HipHop фармакофорна гіпотеза містить сім фармакофорних точок – гідрофобну ароматичну точку, дві гідрофобні аліфатичні точки, три акцептори водневих зв'язків і один донор водневого зв'язку. Найкраща кількісна HuroGen фармакофорна модель, що володіла найнижчим значенням RMSD (root-mean-square deviation) та найвищим кореляційним коефіцієнтом, включала чотири фармакофорні точки – гідрофобну, гідрофобну ароматичну, акцептор та донор водневого зв'язку. Результати валідації HuroGen фармакофорної моделі продемонстрували хорошу кореляцію між експериментальними та розрахованими даними IC₅₀ [48].

JNK3 (c-Jun N-terminal kinase 3): JNK3 є членом родини протеїнкіназ, що регулюються міогенами (MAPK). JNK3 активує сигнальні шляхи за стресових умов [49]. JNK3 селективно експресується в мозку, серці та сім'яниках [50]. Було показано, що JNK3 фосфорилує попередник β-амілоїдного протеїну, консервативний та убіквістично експресований трансмембранний глікопротеїн, залучений у розвиток хвороби Альцгеймера [51]. Таким чином, JNK3 вважається перспективною молекулярною мішенню при цій нейродегенеративній хворобі.

Фармакофорні моделі для низькомолекулярних інгібіторів JNK3 були побудовані за допомогою програми Catalyst. Просторова структура JNK3 (PDB ID: 2R9S) була використана для структурно-орієнтованого фармакофорного моделювання та для молекулярного докінгу. Структурно-орієнтована фармакофорна гіпотеза була побудована за допомогою Discovery Studio.

Найбільш важливі патерни взаємодії були трансформовані у фармакофорні точки. Кінцева модель включала фармакофорні точки донорів водневих зв'язків із Lys68, Gly71, Ser72, Gln155, Met149, акцепторів водневих зв'язків із Lys68, Gly71, Met149, Gln155 та трьох гідрофобних точок.

Фармакофорні точки отримані в ліганд-орієнтованій моделі добре відповідають точкам структурно-орієнтованої моделі. Слід зазначити, що остання має три додаткові точки, які відсутні в ліганд-орієнтованій фармакофорній гіпотезі. Ці моделі можуть бути корисними для розробки нових інгібіторів протеїнкінази JNK3 [49].

GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3): GSK-3 – це серин/треонінова протеїнкіназа, що має високий рівень експресії в нервовій системі і регулює метаболізм глікогену за участі інсуліну та залучена в розвиток різних біологічних процесів, зокрема канцерогенезу та підтримання життєздатності клітин [52]. GSK-3 є важливою терапевтичною мішенню для пошуку низькомолекулярних інгібіторів, що можуть бути основою для створення лікарських препаратів від патологічних станів людини – раку, хвороби Альцгеймера, інсульту, біполярних хвороб, другого типу діабету та хронічних запальних процесів [53].

Фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази GSK-3 були сконструйовані за допомогою модуля NuroGen програми Catalyst, ґрунтуючись на структурі 152 низькомолекулярних інгібіторів GSK-3. NuroGen дозволяє проводити автоматичне конструювання фармакофорних моделей, ґрунтуючись принаймні на структурі 16 молекул, що відрізняються за активністю в межах чотирьох порядків [5].

Просторове фармакофорне моделювання для трьох інгібіторів GSK-3 було проведене із застосуванням модуля DISCOtech™, імплементованого в SYBYL 8.0. Беручи до уваги сет молекул, що характеризуються здатністю взаємодіяти із протеїном, DISCOtech™ ідентифікує точки фармакофорної гіпотези. DISCOtech™ може бути ефективно застосований для побудови фармакофорних моделей за наявності сету лише з 3-5 сполук [54].

mTOR (Mammalian target of rapamycin): mTOR – це убіквістинична серин/треонінова протеїнкіназа, що регулює деякі важливі фізіологічні функції такі як синтез протеїну, метаболізм, ріст клітин, проліферація та автофагія. mTOR також є критичною для низки мозко-специфічних механізмів, таких як синаптична пластичність, навчання, і кортикальний розвиток [55]. Нещодавні дослідження показали зв'язок mTOR із деякими патологічними станами людини, включаючи рак, діабет, ожиріння, кардіоваскулярні та неврологічні хвороби [56]. Фармацевтична привабливість низькомолекулярних інгібіторів mTOR поєднана із дефіцитом кристалографічних структурних даних для mTOR кіназного домену стали відправною точкою для розробки ліганд-орієнтованої QSAR та фармакофорних моделей [57].

Hip-Hop фармакофорна модель була згенерована за допомогою програми Accelrys Discovery Studio 2.1. Ця фармакофорна гіпотеза представляє собою геометричне представлення точок, необхідних для взаємодії ліганда з рецептором. Hip-Hop ідентифікує конфігурації або просторове розташування хімічних характеристик, що є спільними для всіх молекул у сеті.

Найкраща фармакофорна гіпотеза, згенерована на основі 27 АТФ-конкурентних інгібіторів mTOR мала два акцептори водневого зв'язку, одну гідрофобну та одну ароматичну точки [58].

p38 MAPK: p38MAPK – це серин/треонінова протеїнкіназа, яка відіграє важливу роль у розвитку таких хвороб, як астма, остеоартрит, ревматоїдний артрит та хронічна обструктивна хвороба легень. Таким чином, інгібування p38MAPK може бути ефективною стратегією для попередження розвитку цих хвороб [59].

Catalyst НуроGen фармакофорний підхід був застосований з метою отримання моделей для колекції інгібіторів p38MAPK [59, 60]. Вісім із десяти найкращих гіпотез мають чотири ідентичні фармакофорні точки: один акцептор водневого зв'язку, одну гідрофобну та дві ароматичні точки, що вказує на стабільність моделей [59]. Отримані гіпотези можуть бути застосовані для пошуку нових інгібіторів p38MAPK [60].

PKB, Akt (Protein Kinase B). Родина протеїнкінази В включає в себе три серин/треонінові кінази – Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , та Akt3/PKB γ [61]. Akt є центральним компонентом сигнальних шляхів клітини, що регулюються факторами росту, цитокінами та іншими клітинними стимулами. Активація Akt призводить до прогресування клітинного циклу (інгібування апоптозу) [62]. Ліганд-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів Akt була побудована за допомогою DISCOtechTM та GASP (genetic algorithm similarity program) модуля [63].

Кристалічна структура Akt2 у комплексі з відомим низькомолекулярним інгібітором (PDB ID: 3E8D) була використана для конструювання структурно-орієнтованої фармакофорної гіпотези. Програма DS була використана для генерації фармакофорних точок, що відповідають усім можливим точкам взаємодії в АТФ-зв'язувальній кишені Akt2. Отримана фармакофорна модель складалася із семи фармакофорних точок – донору водневого зв'язку (HD), двох акцепторів водневого зв'язку (HA1-2) та чотирьох гідрофобних точок (HY1-4). Крім того, 18 точок виключеного об'єму також були взяті до уваги. HD знаходиться поблизу карбоксильної групи Asp293. HA1 позиціонований до взаємодії з аміногрупою Ala232. HA2 розташований поблизу аміногруп Phe294 та Asp293. Групи, що відповідатимуть цим фармакофорним точкам потенційно здатні формувати водневі зв'язки з сусідніми амінокислотними залишками. HY1 знаходиться у гідрофобній кишені, сформованій Ala178, Met282 і Phe439. HY2 розташовується у гідрофобній кишені, утвореній Gly159, Gly161, Gly164 і Val166. HY3 позиціонується поблизу Lys181, Met229 та Phe294. Показано, що HY4 досить тісно знаходиться з гідрофобними амінокислотними залишками Phe163 та Lys181. Групи, що відповідатимуть цим гідрофобним точкам можуть бути залучені до гідрофобних взаємодій із ензимом. Таким чином, низькомолекулярні сполуки, що узгоджуються з декількома фармакофорними точками можуть бути потенційними інгібіторами Akt2 [64].

Таким чином, методи фармакофорного моделювання можна розділити на дві категорії: рецепторно-орієнтовані та ліганд-орієнтовані. Рецепторно-

орієнтовані підходи можуть бути використані в тому випадку, коли визначена структура молекулярної мішені. В іншому випадку, для фармакофорного моделювання використовуються ліганд-орієнтовані підходи.

У процесі аналізу використання фармакофорних підходів для дизайну інгібіторів протеїнкіназ, було встановлено, що не зважаючи на величезну кількість структурних даних, отриманих для протеїнкіназ, більш широко використовуються ліганд-орієнтовані підходи. Ліганд-орієнтовані методи для фармакофорного моделювання включають ALADDIN, DISCO, GERM, COMPASS, GASP, Catalyst HipHop, SCAMPI, Catalyst HypoGen, Phase, CLEW GAMMA, PARM, DANTE, та ін. [65].

3D-QSAR методи Catalyst HypoGen і Phase, які використовують значення активностей низькомолекулярних сполук у навчальній вибірці для генерування фармакофорних гіпотез застосовуються найчастіше. Ці гіпотези включають фармакофорні точки спільні лише для високо активних сполук і також містять виключені об'єми (отримані на основі структури неактивних сполук), які не можуть бути зайняті інгібіторами. Методи Catalyst HipHop, Pharmagist [66], DISCO можуть бути використані лише для генерування якісних фармакофорних моделей, які не враховують інформації стосовно активності сполук. Якісна фармакофорна модель може бути взята за основу для генерування 3D-QSAR гіпотези.

Рецепторно-орієнтовані методи побудови фармакофорної моделі значно рідше використовуються в процесі розробки інгібіторів протеїнкіназ. Ці підходи можуть бути корисними для дослідження ліганд-рецепторних взаємодій.

Найлегший шлях для побудови рецепторно-орієнтованої просторової фармакофорної моделі – це вручну вибрати ключові амінокислотні залишки в активному сайті протеїну, визначити найважливіші взаємодії з лігандом і потім, ґрунтуючись на цій інформації – встановити фармакофорні точки зі специфічними властивостями. Інший шлях отримати 3D-фармакофорну модель – це застосувати рецепторно-орієнтовані алгоритми, що автоматично оцінюють взаємодії між лігандом та рецептором. Таке моделювання проводиться за

допомогою програм Pharmer [67], Accelrys Discovery Studio, Schrödinger, MOE, LigandScout та ін. [65].

Комбінація рецепторно-орієнтованих та ліганд-орієнтованих методів дозволяє покращити ефективність розробки нових біологічно активних сполук [52].

Фармакофорні моделі, розроблені для пошуку нових інгібіторів тирозинових та серин/треонінових протеїназ не мають значної різниці. Більшість фармакофорних моделей протеїназ розроблені для АТФ-конкурентних інгібіторів і відповідають фармакофорним моделям Novartis [12] та Тракслера [68].

Фармакофорна модель Тракслера включає ті ж самі райони, що й фармакофорна модель Novartis: аденін-зв'язувальна кишеня, ділянка взаємодії з рибозою, гідрофобний район I, гідрофобний район II, фосфат-зв'язувальна ділянка та так званий амінокислотний залишок “гейт-кіпер”, що відіграє важливу роль для зв'язування інгібітора та селективності (рис. 1.1). Не зважаючи на важливу роль “гейт-кіпера” для взаємодії з інгібітором, у більшості випадків автори не приділяли уваги цьому амінокислотному залишку в процесі фармакофорного моделювання для інгібіторів протеїназ.

Середня кількість фармакофорних точок у фармакофорних моделях інгібіторів тирозинових та серин/треонінових протеїназ становить 4-5. Деякі моделі мають більше фармакофорних точок, але слід зазначити, що збільшення їхньої кількості призводить до покращення специфічності моделі, що зменшує здатність моделі ідентифікувати сполуки-хіти з різних хімічних класів.

Більшість фармакофорних гіпотез мають 1-2 точки (донор і/або акцептор водневих зв'язків) в аденін-зв'язувальній кишені. Як правило, ці точки вказуються як вектори, спрямовані до основного ланцюга амінокислотних залишків у шарнірній ділянці. Деякі фармакофорні моделі мають додаткову ароматичну або гідрофобну точку в ділянці зв'язування аденіну.

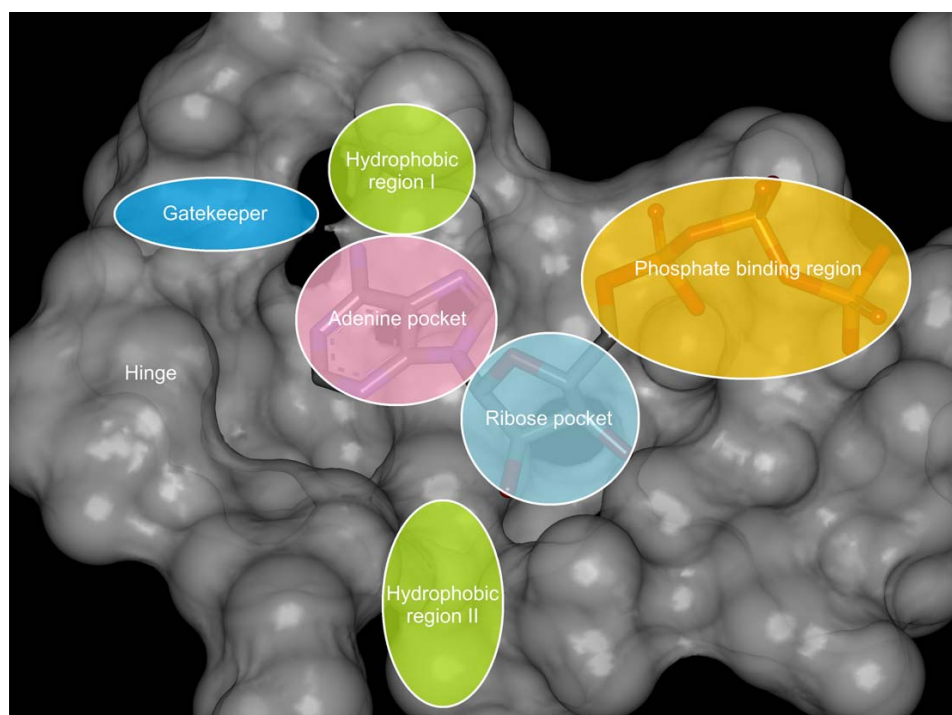


Рис. 1.1 Фармакофорна модель для першого типу інгібіторів протеїнкінази

Майже всі фармакофорні моделі мають гідрофобну або ароматичну фармакофорну точку в гідрофобній кишени I. Деякі гіпотези також мають донор і/або акцептор водневого зв'язку у цій ділянці, що сприяє додатковій стабілізації інгібітора в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази.

Лише деякі моделі мають фармакофорну точку донора водневого зв'язку у ділянці взаємодії з рибозою. Ця ділянка не є такою важливою для афінної взаємодії інгібіторів із активним сайтом протеїнкінази, як аденін-зв'язувальна ділянка.

Фосфат-зв'язувальна ділянка інколи містить 1-2 фармакофорні точки (донор і/або донор водневого зв'язку), гідрофобна кишеня II – одну гідрофобну або ароматичну фармакофорну точку.

Більшість відомих фармакофорних моделей були побудовані для першого типу інгібіторів протеїнкіназ. Деякі фармакофорні гіпотези були також згенеровані для другого типу інгібіторів протеїнкіназ. Моделі для обох типів дуже подібні, але у випадку другого типу інгібіторів протеїнкіназ, модель має фармакофорну точку глибоко в кишени АТФ-зв'язувального сайту ензиму.

Таким чином, ліганд-орієнтовані та рецепторно-орієнтовані методи можуть в рівній мірі застосовуватися для генерування фармакофорних моделей протеїнкіназ. Комбінація цих підходів може бути корисною для покращення ефективності дизайну біологічно активних сполук. За допомогою розроблених фармакофорних моделей можна значно прискорити процес розробки інгібіторів протеїнкіназ.

Огляд літератури опублікований у статті:

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.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Молекулярний докінг

2.1.1 Підготовка молекул лігандів

Для рецепторно-орієнтованого напівгнучкого докінгу використовували пакети програм DOCK 4.0 [69] та AutoDock 4.2.6 [70]. Для DOCK 4.0 підготовку лігандів проводили програмою SCREENER, зокрема препроцесинг вихідної бази лігандів, конвертацію 2D структур у 3D. Пакет програм GROMACS [71] використовували для швидкої мінімізації енергії, пакет GAMESS [72] – для оптимізації геометрії лігандів і розрахунку їх часткових атомних зарядів. Програма TOPBUILDER застосовувалася для генерації молекулярних топологій у форматі GROMACS, присвоєння часткових атомних зарядів, розрахованих в GAMESS, контролю мінімізації енергії лігандів у GROMACS та генерації фінальних координат сполук у форматі MOL2.

Для AutoDock 4.2.6 оптимізували геометрію лігандів та встановлювали для них часткові атомні заряди (емпіричним методом Гайстейгера) пакетом програм Open Babel [73]; додавали полярні водні, конвертували ліганди в pdbqt формат та напрацьовували файли з параметрами докінгу у форматі dpf – пакетом програм MGL Tools.

2.1.2 Підготовка рецептора

Просторові структури каталітичних субодиниць протеїнкіназ ASK1, CK2, FGFR1 було взято з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 2CLQ, 3NSZ, 3GQI). З них було видалено ліганди, молекули води та субодиниці, які не використовувалися у докінгу. У кристалічній структурі ASK1 були пропущені

деякі атоми бічних ланцюгів амінокислотних залишків. Тому за допомогою серверу SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) було побудовано гомологічну модель ензиму

Для DOCK потрібні повна структура рецептора у форматі MOL2 з частковими атомними зарядами і координати атомів амінокислотних залишків активного сайту рецептора у форматі PDB. За допомогою GROMACS проводили мінімізацію енергії молекули рецептора у вакуумі з використанням силового поля GROMOS96 – 1000 кроків мінімізації, алгоритм крутого спуску. Часткові атомні заряди розраховували в силовому полі AMBER.

Для AutoDock за допомогою пакета програм MGL Tools молекулу рецептора протонували (встановляли полярні водні), розраховували часткові атомні заряди емпіричним методом Гайстейгера, зберігали рецептор у форматі *pdbqt* та готували карти рецептора.

2.1.3 Гнучкий докінг

Для DOCK сфери активного сайту (точки докінгу) розраховували програмами *sphgen* (пакет DOCK) та *Connolly MS* [74]. При розрахунку сфер радіус проби складав 1,4 Å, густина поверхні – 5 точок. З кластеру, який відповідав активному сайту рецептора, були відібрані сфери, які описували лише АТФ-зв'язувальну кишеню і видалені сфери, які знаходилися за межами активного сайту та могли спричинити невірні позиції лігандів. Карти енергетичних, шумових та контактних решіток рецептора були згенеровані програмою *Grid* пакету DOCK. Роздільна здатність решітки була 0,5 Å, а максимальна дистанція врахування енергетичних взаємодій становила 10 Å. Для розрахунку електростатичних взаємодій використовували діелектричну константу, яка залежала від відстані. Діелектричний фактор становив 4, величина відсічки – 12 Å. Структуру рецептора описували повноатомною моделлю. Якірні елементи та обертальні зв'язки лігандів були ідентифіковані автоматично програмою DOCK. Конформаційний пошук здійснювали за допомогою торсійного драйву. Величина шумового перекривання складала 0,3. Були дозволені множинні якірні елементи у структурі ліганду, мінімальна кількість атомів кожного елементу

становила 4. Орієнтаційний пошук було зроблено на основі автоматичного співпадання. Максимальне число орієнтацій складало 500. Локальну мінімізацію і ремінімізацію енергії орієнтацій, конформацій ліганда і його якірних елементів було дозволено. Параметри мінімізації енергії були взяті за замовчуванням.

Для AutoDock використовувались такі параметри: крок поступального руху становив 2 Å; торсійний кут – 50°; кут кватерніону – 50°; ступінь торсійної свободи – 2; коефіцієнт торсійної свободи – 0,274; толерантність кластера – 2 Å; максимальна початкова енергія – 0; зовнішня енергія решітки – 1000; максимальне число етапів оцінки енергії – 1000000; максимальне число спроб – 10000; число структур у популяції – 300; максимальне число генерацій – 27000; кількість структур, які переходять до наступної генерації – 1; рівень кросоверу – 0,8; рівень генної мутації – 0,02; спосіб кросоверу – арифметичний; α параметр розподілу Гауса – 0; β параметр розподілу Гауса – 1; кількість запусків генетичного алгоритму (пошук Ламарка) – 50.

Візуальний аналіз взаємодії сполук із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкіназ проводили у програмі Discovery Studio Visualizer 4.0 [75].

2.2 Фармакофорне моделювання

2.2.1 Підготовка молекул лігандів і рецептора

Для розробки ліганд-орієнтованої фармакофорної моделі ASK1 за основу було взято 59 інгібіторів цієї протеїнкінази із різних публікацій (IC_{50} були в межах від 0,0063 до 35 μM). З них обрано 19 сполук з IC_{50} меншим 0,3 μM в якості навчальної вибірки. Серед них шість сполук були екстраговані з кристалічних структур, отриманих з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 4BHN, 4BID, 3VW6, 4BIC, 4BIB, 4BIE). Структури всіх сполук навчальної вибірки були побудовані за допомогою програми Marvin Sketch.

Навчальну вибірку додатково кластеризували. Кластеризація ґрунтувалася на відстані Танімото між фінгерпринтами FCFP4 (Functional Class Fingerprints 4)

цих сполук. В результаті отримано меншу навчальну вибірку, яку також використано для генерування фармакофорних моделей.

Для розробки рецепторно-орієнтованих фармакофорних моделей за основу було взято просторові структури протеїнкіназ із інгібіторами з бази даних Brookhaven Protein Data Bank, що мали найкращі роздільні здатності. PDB ID для FGFR1 – 4WUN, 3RHX, 4F64, для CK2 – 4ANM. У програмі Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0 із комплексів видалено молекули води. Потім інгібітори та їх рецептори було збережено в окремі файли. Ліганди збережено у форматі .mol2, який дозволяє з високою точністю зберегти всі зв'язки між атомами, а рецептори збережено у форматі .pdb.

2.2.2 Побудова фармакофорних моделей

На основі двох навчальних вибірок генерувалися ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1 за допомогою програми Pharmagist. Сполуки отримані з кристалічних структур каталітичного домену протеїнкінази ASK1 людини були взяті як зразки («pivots») для конструювання фармакофорних моделей. Інші моделі були сконструйовані в результаті послідовного використання усіх лігандів як зразків та автоматичного вибору найкращої моделі.

Моделі валідувалися на тестовій вибірці із 43 сполук (16 з високою інгібувальною активністю ($\leq 5 \mu\text{M}$), 7 сполук з середньою активністю (від 5 до 40 μM) і 20 сполук були неактивні). Параметри PharmaGist були такі, як і при конструюванні моделі, лише кількість попарних вирівнювань було збільшено з 300 до 2000. Оцінка коректності передбачення активності сполук за допомогою розроблених фармакофорних моделей ґрунтувалась на таких параметрах: середній кількості спільних точок між лігандами та моделлю, загальній кількості передбачених активних сполук, кількості передбачених високо активних лігандів, кількості передбачених лігандів із середньою активністю, кількості передбачених неактивних лігандів.

Рецепторно-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнази СК2 та FGFR1 були згенеровані за допомогою програми Pharmer. Спочатку будувалися первинні моделі для кожного комплексу. Pharmer визначає взаємодії між рецептором та лігандом і на основі цього будує відповідні фармакофорні точки моделі. Pharmer дозволяє ідентифікувати такі точки: донори та акцептори водневого зв'язку – точки з направленими векторами; ароматичні точки (можуть мати направлені вектори); гідрофобні, позитивно та негативно заряджені точки. Гідрофобні точки, що знаходяться на відстані менше 2 Å, кластеризуються в одну точку. Також Pharmer дає можливість застосовувати виключені об'єми, в які заборонено потрапляти лігандам при фармакофорному скринінгу.

Подальші маніпуляції з моделями проводили в програмі Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0 відповідно до міжмолекулярних взаємодій, показаних цією програмою, оскільки Pharmer не має власного візуалізатора і молекулярного редактора, крім того що є у веб-версії (з дуже обмеженими можливостями).

Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0 не підтримує формату query, який використовується у Pharmer. Відповідно Pharmer не підтримує фармакофорний формат СНМ, який використовується в Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0. Тому нами був розроблений конвертер між цими форматами з використанням мови програмування Java (веб-сторінка: <https://java.com>).

Спосіб візуалізації фармакофорних точок було використано той, що пропонує програма Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0, лише задавали радіуси точок, встановлені у Pharmer.

2.2.3 Фармакофорний скринінг

Для фармакофорного скринінгу за допомогою пакету програм Open Babel [73] було згенеровано конформери для бази низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала майже 180000 молекул. Для кожної молекули було встановлено обмеження 250 конформерів та 100 кроків оптимізації. Згенеровані конформери були конвертовані в спеціальну скринінгову базу за допомогою Pharmer.

Фармакофорний скринінг проводили за допомогою програми Pharmer. Результати фільтрували за значеннями середньоквадратичних відхилень між фармакофорними точками досліджуваної сполуки та фармакофорної моделі (RMSD, Å). Ліганди з найменшими значеннями середньоквадратичних відхилень аналізували візуально на предмет співпадіння з фармакофорними точками моделі.

Скринінг за допомогою програми Pharmagist проводили з використанням параметрів за замовчуванням. Даний скринінг не потребує генерування конформерів, так як алгоритм програми робить гнучке співставлення з фармакофорною моделлю.

2.3 Скринінг *in vitro*

Тестування ефективності інгібіторів проводили *in vitro*. Використовували очищені рекомбінантні протеїни каталітичних доменів ASK1, FGFR1, CK2, Aurora A, JNK3, Tie2, експресовані в клітинах Sf9 (Upstate/Millipore).

При визначенні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі ASK1, для проведення однієї реакції брали 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (25 мМ MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), pH 7,2, 2,5 мМ EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 2,5 мМ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0,5 мМ DTT (dithiothreitol), 0,25 мг/мл BSA, 20 мМ β-гліцерофосфат), 3 мкл розчину пептидного субстрату MBP (myelin basic protein) (5 мг/мл), 0,3 мкл розчину протеїнкінази (0,1 мкг/мл), 10,3 мкл води. Реакційну суміш (18,9 мкл/пробу) поміщали в епандорф об'ємом 1,5 мл. До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора в DMSO (dimethyl sulfoxide) у відповідній концентрації. Одночасно з інкубацією проби з інгібітором (4 – 5 хв на льоду) готували суміш розчину Mg²⁺/АТФ (150 мкМ АТФ, 15 мМ MOPS, pH 7,2, 10 мМ MgCl₂) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ³²P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Реакцію для кожного зразка ініціювали додаванням 10 мкл суміші Mg²⁺/АТФ. Вихідний об'єм у кожній реакції складав 30 мкл з кінцевою концентрацією АТФ у реакційній суміші – 50 мкМ. Потім проби інкубували у термостаті протягом 25 хв при 30°C.

При визначенні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі Аугоа А для проведення однієї реакції використовували 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (75 мМ MOPS, рН 7,2, 1,25 мМ EDTA, 0,5 мг/мл BSA, 0,05% β -меркаптоетанол, 0,015% Brij 35), 3 мкл розчину пептидного субстрату Kemptide (1,4 мг/мл), 0,0225 мкл розчину протеїнкінази (0,2 мкг/мл), 10 мкл води. Аліквоту реакційної суміші поміщали в епендорф об'ємом 1,5 мл. До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора в DMSO у відповідній концентрації. Одночасно з інкубацією проби з інгібітором (4 – 5 хв на льоду) готували суміш розчину Mg^{2+} /АТФ (150 мкМ АТФ, 50 мМ $MgCl_2$, 10 мМ MOPS; рН 7,2, 3 мМ EGTA, 0,6 мМ DTT, 0,6 мМ Na_3VO_4 , 15 мМ β -гліцерофосфат) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg^{2+} /АТФ (вихідний об'єм у кожній реакції складав 30 мкл, кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ). Потім проби інкубували у термостаті при 30°C протягом 20 хв.

При дослідженні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі СК2 для проведення однієї реакції брали 3 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl рН 7,5, 50 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$), 1,5 мкл пептидного субстрату RRREEETEEE (New England Biolabs) (3 мг/мл); 0,02 мкл протеїнкінази СК2, 14,5 мкл дистильованої води; 1 мкл розчину інгібітора у різних концентраціях; 10 мкл АТФ (кінцева концентрація 50 мкМ) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Інкубаційний час складав 25 хв при 30°C.

При встановленні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі JNK3 для проведення однієї реакції використовували 6 мкл 10X-кратного реакційного буферу (25 мМ Tris-HCl, рН 7,2, 5 мМ EGTA, 1% β -меркаптоетанол), 0,7 мкл розчину пептидного субстрату (ATF2, амінокислотні залишки 19-96) (5 мг/мл), 0,3 мкл розчину протеїнкінази (1 мкг/мл), 9,8 мкл води. Аліквоту реакційної суміші поміщали в епендорф об'ємом 1,5 мл. До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора в DMSO у відповідній концентрації. Одночасно з інкубацією проби з інгібітором (4 – 5 хв на льоду) готували суміш розчину Mg^{2+} /АТФ (150 мкМ АТФ, 16,6 мМ $MgCl_2$, 5 мМ MOPS, рН 7,2, 166 мкМ DTT, 5 мМ β -гліцерофосфат, 200

мкМ Na_3VO_4) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg^{2+} /АТФ. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Потім проби інкубували у термостаті при 30°C протягом 25 хв.

При дослідженні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі FGFR1 для проведення однієї реакції використовували 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (50 мМ MOPS, pH 7,2, 1 мМ EDTA, 1 мг/мл BSA, 0,1% β -меркаптоетанол, 0,01% Brij 35, 0,5 мМ Na_3VO_4), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату IGR-IRtide (4 мг/мл), 0,01 мкл розчину протеїнкінази (0,2 мкг/мл), 10,5 мкл води. Аліквоту реакційної суміші поміщали в епендорф об'ємом 1,5 мл. До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора в DMSO у відповідній концентрації. Одночасно з інкубацією проби з інгібітором (4 – 5 хв на льоду) готували суміш розчину Mg^{2+} /АТФ (150 мкМ АТФ, 35 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1,5 мМ HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота)), pH 7,2) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg^{2+} /АТФ. Вихідний об'єм у кожній реакції складав 30 мкл з кінцевою концентрацією АТФ у реакційній суміші – 50 мкМ. Потім проби інкубували у термостаті при 30°C протягом 25 хв.

При вивченні ефективності інгібіторів на протеїнкіназі Tie2 для проведення однієї реакції брали 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (50 мМ MOPS, pH 7,2, 1,25 мМ EDTA, 0,5 мг/мл BSA, 0,05% β -меркаптоетанол, 0,005% Brij 35, 1,5 мкл 10 мМ MnCl_2), 1 мкл розчину пептидного субстрату Poly(Glu₄-Tyr) (Upstate\Millipore) (5 мг/мл), 0,05 мкл розчину протеїнкінази (4 мкг/мл), 10,3 мкл води. Аліквоту реакційної суміші поміщали в епендорф об'ємом 1,5 мл і до кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора в DMSO у відповідній концентрації. Одночасно з інкубацією проби з інгібітором (4 – 5 хв на льоду) готували суміш розчину Mg^{2+} /АТФ (150 мкМ АТФ, 10 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg^{2+} /АТФ

Вихідний об'єм у кожній реакції складав 30 мкл. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Потім проби інкубували у термостаті при 30°C протягом 20 хв.

Після інкубації епендорфи переносили на лід. Реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5% H_3PO_4 . Потім реакційну суміш наносили на диск фосфоцелюлозного паперу р31 (Whatman) із діаметром 20 мм. Диски тричі відмивали в 1% розчині H_3PO_4 і просушували при температурі 40 – 45 °С. Рівень радіоактивного сигналу вимірювали сцинтиляційним лічильником PerkinElmer Tri-Carb 2800-TR. В якості негативного контролю, замість розчину інгібітора додавали розчин DMSO (кінцева концентрація була 3,8%). Ступінь інгібування протеїнкінази визначали по співвідношенню включення ^{32}P при додаванні інгібітора та за його відсутності.

Визначення IC_{50} . Спочатку проводили попередній скринінг при додаванні сполук у концентрації 33 μM . Визначали активність протеїнкіназ при додаванні DMSO та інгібіторів. Показники лічильника – cpm (counts per minute) у пробах із DMSO приймали за 100%. Інгібітори, активність ензиму при додаванні яких зменшувалася нижче, ніж на 50% брали для визначення IC_{50} . Діапазон концентрацій інгібітора для встановлення IC_{50} вибирали залежно від залишкової активності ензиму. Визначали показники лічильника для кожної концентрації інгібітора. Будували титрувальні криві в координатах десяткового логарифму концентрації інгібітора ($\lg[C]$) та cpm. Для середнього значення cpm знаходили $\lg[C]$. Визначали обернений логарифм концентрації, який дорівнював IC_{50} .

Для кожної проби проводилися по три незалежних експерименти. Відхилення від середнього значення становили не більше 15%.

РОЗДІЛ 3

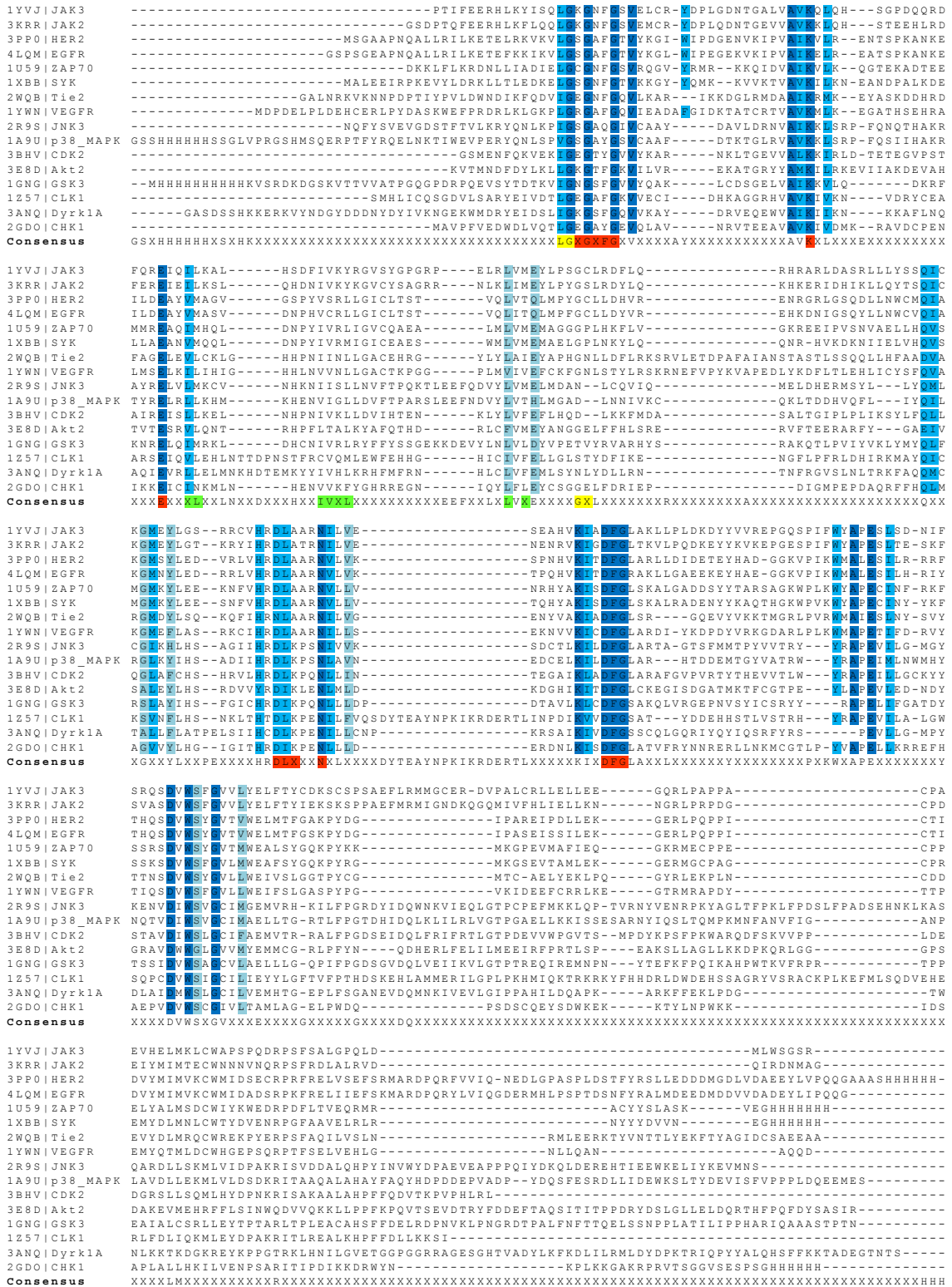
АНАЛІЗ АКТИВНИХ САЙТІВ ПРОТЕЇНКІНАЗ, ДЛЯ ЯКИХ РОЗРОБЛЕНО ФАРМАКОФОРНІ МОДЕЛІ

Було проведено вирівнювання амінокислотних послідовностей 16 тирозинових та серин/треонінових протеїнкіназ (JAK3, JAK2, HER2, EGFR, ZAP70, Tie2, VEGFR, JNK3, p38_MAPK, CDK2, Akt2, GSK3, CLK1, Dyrk1A, CHK1), для яких відомі фармакофорні моделі, за допомогою програми Clustal X [76] з використанням параметрів за замовчуванням. Дане дослідження зроблене з метою визначити які ділянки активних сайтів протеїнкіназ важливі для побудови фармакофорних моделей.

Виявили, що фосфат-зв'язувальні ділянки є найбільш високо консервативними, на відміну від гідрофобних кишень I та II, які мало подібні (рис. 3.1). Таким чином, фармакофорні точки локалізовані у фосфат-зв'язувальній ділянці не забезпечують селективності для інгібіторів, проте можуть забезпечувати їх афінність. Аналогічно точки, визначені в аденін- та цукор-зв'язувальних ділянках, теж будуть впливати лише на афінність, оскільки вони подібні в усіх протеїнкіназ. 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.

Основні наукові результати розділу опубліковані у статті:

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.



Подібність послідовності: ■ - ідентичні, ■ - значна, ■ - слабка
 Регіони зв'язування: ■ - фосфат-зв'язувальна ділянка, ■ - гідрофобна кишеня I,
■ - гідрофобна кишеня II

Рис. 3.1 Вирівнювання амінокислотних послідовностей тирозинових та серин/треонінових протеїнкіназ, для яких відомі фармакофорні моделі

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ ASK1 І ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ

4.1 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1

Для пошуку нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1 було використано методи комп'ютерного моделювання та тестування *in vitro*. Пакет програм DOCK використовували для проведення напівгнучкого докінгу бібліотеки, що налічувала близько 270000 органічних сполук в АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази ASK1. У результаті проведення докінгу з наступною візуалізацією комплексів сполук в активному центрі 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-хлоро-феніл)-4-(фуран-2-карбоніл)-3-гідрокси-1-(6-метокси-бензотіазол-2-іл)-1,5-дигідро-пірол-2-он (сполука **4.1**) інгібувала ASK1 зі значенням $IC_{50} = 4,2 \mu M$.

Для того щоб дослідити залежність активності сполук цього класу від їх хімічної структури було синтезовано та протестовано 33 похідних 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-ону. Загальна хімічна структура похідних цього класу показана на рис. 4.1, хімічні структури замісників та значення IC_{50} наведено в табл. 4.1.

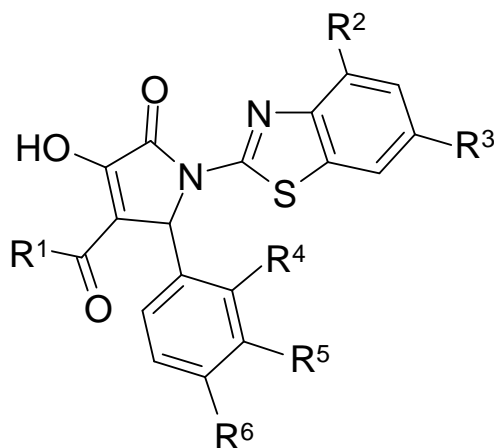


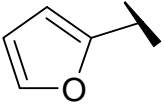
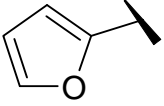
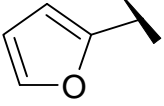
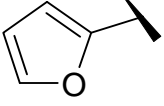
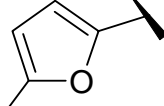

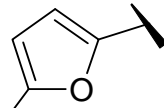

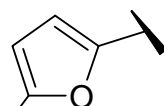

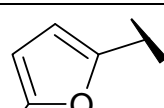


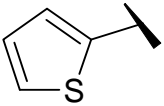
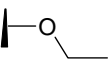
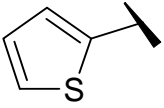
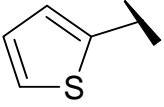
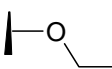
Рис. 4.1 Загальна хімічна структура похідних бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону

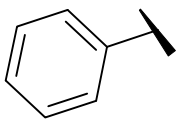
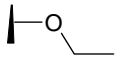
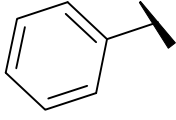
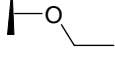

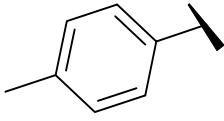
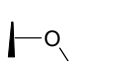

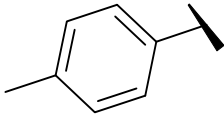

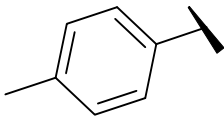

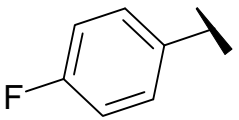
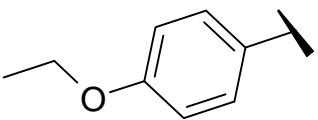
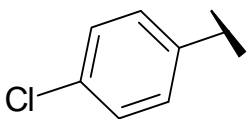
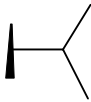
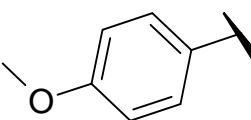
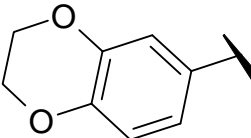
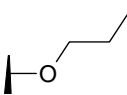
Таблиця 4.1

Хімічна структура замісників та *in vitro* інгібувальна активність похідних бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-ону по відношенню до ASK1

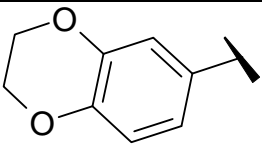

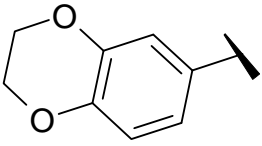
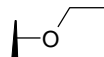
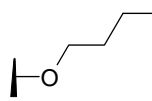
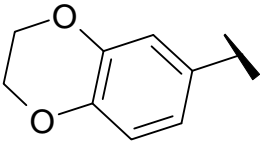
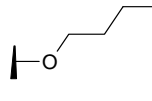
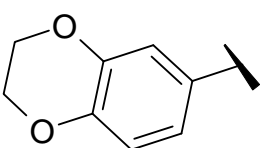
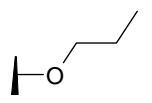
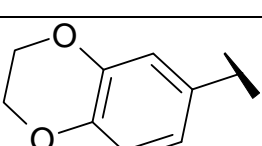
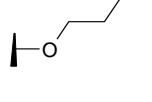
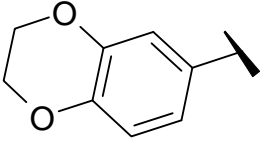
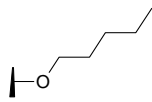
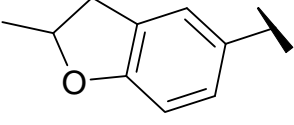
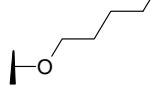
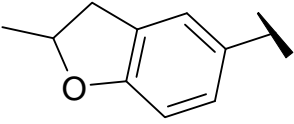
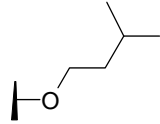
N	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	IC ₅₀ , μM
4.1		H		H	H	Cl	4,2
4.2		H	CH ₃	H	H	Br	28,2
4.3		H	F	H	H	Br	28,2
4.4		H	F	H	Cl	H	28,2
4.5		H	F	H	Br	H	29,5

Продовж. табл. 4.1

4.6		H	CH ₃	H	H	Cl	30,2
4.7		H	CH ₃	H	Br	H	31
4.8		H	F	H	F	H	42,6
4.9		CH ₃	CH ₃	H	H	H	63
4.10		H	F	H	H		1,55
4.11		CH ₃	CH ₃	H	H		2
4.12		CH ₃	CH ₃		H	H	35,5
4.13		H	F	H			38
4.14		H		H	H	CH ₃	4,4
4.15		H	F	H	Cl	H	4,5
4.16		H	CH ₃	H	H		9,1

4.17		H		H	H	Cl	4,2
4.18		H		H	H		5
4.19		H		H	H		2
4.20		H	CH ₃	H	H		4,4
4.21		H	F	H	H		7,6
4.22		H	CH ₃	H	H	Cl	2,9
4.23		H	CH ₃	H	H	F	5,5
4.24		CH ₃	CH ₃	H	H		6,3
4.25		H	F	H	F	H	17
4.26		H	CH ₃	H	H		2

Продовж. табл. 4.1

4.27		H	Cl	H	H		2,5
4.28		H	Cl	H			3,6
4.29		H	CH ₃	H	H		4,6
4.30		H	Cl	H	H		5
4.31		H	Cl	H	H		5,2
4.32		H	CH ₃	H	H		5,2
4.33		H	F	H	H		0,75
4.34		H	F	H		H	0,52

Графік розтитровування найбільш активної сполуки **4.34**, що отримала спеціальну назву – ВРyО-34, приведений на рис. 4.2.

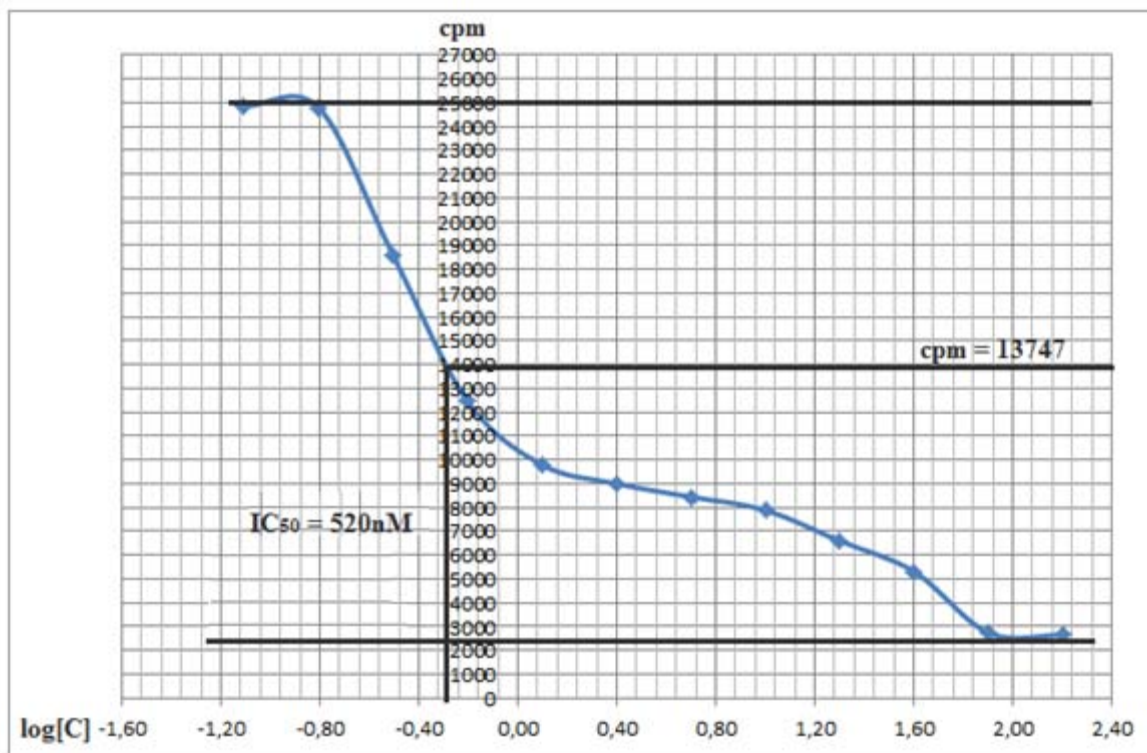


Рис. 4.2 Графік розтитровування найбільш активної сполуки **4.34** (ВРyО-34)

Використовуючи методи комп'ютерного моделювання були досліджені комплекси всіх цих сполук із ASK1.

Виявили, що всі сполуки цього класу мали подібний тип зв'язування із АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази ASK1. Бензотіазоловий фрагмент залучений до гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками Leu686, Val757 і Leu810 в аденін-зв'язувальній ділянці. Крім того, цей гетероцикл формує π -сульфід-взаємодії з карбонільною групою Val757, розташованого в шарнірній ділянці. Було виявлено, що атом Оксигену 3-гідрокси-1,5-дигідро-пірол-2-ону утворює водневий зв'язок із аміногрупою Val757. Крім того, сполуки утворюють гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками в гідрофобній кишені I АТФ-зв'язувального сайту, зокрема, з His729, Val738, Tyr740, Ile752 та Met754. Взаємодії з

активним сайтом ASK1 властиві усім бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-онам показано на прикладі найактивнішої сполуки на рис. 4.3.

Очевидно, що бензотіазол є важливим для прояву інгібувальної активності сполук цього класу, оскільки заміна цього гетероциклу етил-морфоліном та пропіл-морфоліном призводила до повної втрати активності.

Було встановлено, що інгібувальна активність досліджуваних сполук по відношенню до протеїнкінази ASK1 залежить від хімічної структури замісника R¹. Як видно з табл. 4.1, заміна фурану (сполука 4.4) на тіофен (сполука 4.15) призводила до значного зростання інгібувальної активності щодо ASK1 (значення IC₅₀ становили відповідно 28,2 μM та 4,5 μM). Сполуки з R¹ = 4-флуорофеніл або 4-метоксифеніл також були більш активні, ніж ті, що мали фуран. Цей ефект можна бачити при порівнянні пар сполук 4.22, 4.6 та 4.25, 4.8 (відповідні значення IC₅₀ становили 2,9 μM, 30,2 μM; 17 μM, 42,6 μM).

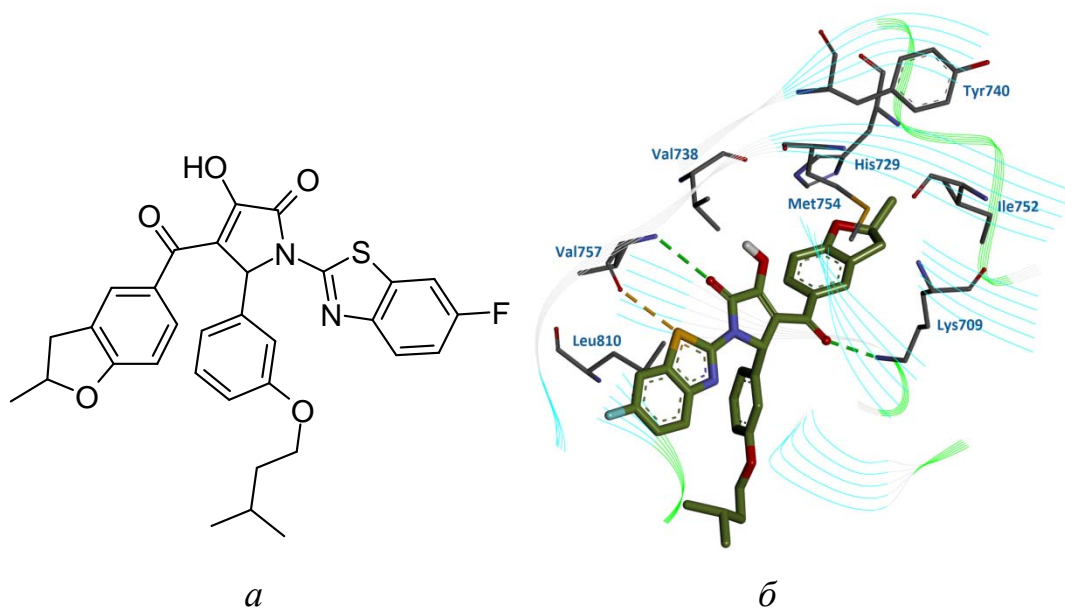


Рис. 4.3 Хімічна структура (а) і тип зв'язування сполуки 4.34 (BRyO-34) в активному сайті каталітичної субодиниці протеїнкінази ASK1 (б). Водневі зв'язки показано зеленими пунктирними лініями, π-сульфід-взаємодію – жовтою пунктирною лінією

Встановлено, що заміна фенілу (сполука **4.18**) на 4-метилфеніл (**4.19**) позитивно впливала на активність (значення IC_{50} становили відповідно 2 μ M та 5 μ M). Заміна 4-метилфенілу і 4-хлорофенілу на 2-метилфуран призводила до значного зростання інгібувальної активності. Цей ефект може бути виявлений при порівнянні активності в парах сполук **4.21**, **4.10** та **4.24**, **4.11** (значення IC_{50} становили відповідно 7,6 μ M, 1,55 μ M; 6,3 μ M, 2 μ M).

Із отриманих результатів було встановлено закономірності зміни активності в залежності від замісника R^1 : 2-метил-2,3-дигідро-бензфуран > 2-метил-фуран > 4-флуорофеніл > 2,3-дигідро-бензо[1,4]діоксин \geq 4-метилфеніл > тіофен > феніл > 4-етоксифеніл > 4-хлорофеніл > 4-метоксифеніл > фуран. В цілому, зростання гідрофобності замісника R^1 покращувало інгібувальну активність сполук по відношенню до ASK1.

Досліджено вплив хімічної структури замісника R^3 у бензотіазольному гетероциклі на інгібувальну активність щодо ASK1. Було встановлено, що заміна метильної групи (сполука **4.2**) на фтор (сполука **4.3**) не мала впливу на активність досліджуваних сполук ($IC_{50} = 28,2 \mu$ M). Присутність метильної групи (сполуки **4.26**, **4.29**) замість атома хлору (похідні **4.30**, **4.31**) призводила до незначного зростання інгібувальної активності щодо ASK1. Заміна метильної групи на етокси або метокси групу призводила до значного зростання інгібувальної активності. Для того щоб побачити цей ефект можна порівняти пари сполук **4.20**, **4.19**; **4.6**, **4.1** (значення IC_{50} становили відповідно 4,2 μ M, 2 μ M; 30,2 μ M, 4,2 μ M).

Хімічна структура замісників R^4 , R^5 та R^6 у фенільному кільці не мали значного впливу на активність досліджуваних сполук. Слід зазначити, що введення великих гідрофобних замісників у 3 та 4 положення у фенільному кільці призводило до зростання інгібувальної активності сполук.

Селективність найбільш активних інгібіторів ASK1 досліджували *in vitro* на трьох серин/треонінових (CK2, JNK3 та Aurora A) і двох тирозинових (FGFR1 та Tie2) протеїнкіназах. Результати дослідження показали, що сполуки **4.27** та **4.34** були значно активніші по відношенню до ASK1, ніж до інших протеїнкіназ (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

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

Найбільш активні та селективні інгібітори цього класу можуть застосовуватися для подальшого вивчення ASK1 та розробки фармацевтичних препаратів для терапії низки захворювань, пов'язаних із порушеннями функціонування цієї кінази.

4.2 Побудова фармакофорної моделі протеїнкінази ASK1 на основі відомих інгібіторів із різних хімічних класів

Підвищена активність протеїнкінази ASK1 асоційована з розвитком низки патологій, включаючи нейродегенеративні [77-80], серцево-судинні захворювання

[81-85] та різні види раку [86, 87]. Таким чином, інгібітори ASK1 можуть стати важливими сполуками для фармакологічного використання.

Низькомолекулярні інгібітори ASK1 із різних хімічних класів мають подібні типи зв'язування із активним центром ензиму. Тому, раціональним є узагальнення цих структурних даних у загальну концепцію за використання методів фармакофорного моделювання. Існує два підходи для конструювання фармакофорних моделей – рецепторно-орієнтовані методи, що дозволяють побудову фармакофорних моделей, ґрунтуючись на взаємодіях лігандів із рецепторами, і ліганд-орієнтовані методи, що дозволяють генерацію фармакофорних моделей базуючись на навчальних сетах активних сполук.

Pharmagist – це програма, що використовується для генерації фармакофорних моделей на основі навчальних сетів. Ця програма ґрунтується на методі детерміністичної фармакофорної детекції. Моделі можуть бути побудовані для сполук із невизначеними типами зв'язування. Крім того, Pharmagist може використовувати доступну структурну інформацію стосовно взаємодій лігандів із рецептором. Сполуки з відомими конформаціями, в яких вони взаємодіють з ензимом як правило обираються як зразки (“pivots”), а інші ліганди з ними порівнюються. Оцінюється індивідуальний внесок кожного ліганда у фармакофорну точку. Моделі дають інформацію стосовно не лише просторових позицій фармакофорних точок, а й їхньої ваги, вказуючи таким чином на важливість цих точок для взаємодії з активним центром ензиму.

Фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази ASK1 була згенерована за допомогою Pharmagist використовуючи типи взаємодії декількох класів інгібіторів. Ця фармакофорна гіпотеза може бути застосована для подальших пошуків інгібіторів протеїнкінази ASK1.

Сет із 59 різних сполук був зібраний із різних публікацій, що включають більшість класів інгібіторів протеїнкінази ASK1. Інгібувальні активності сполук в показниках IC_{50} були в межах від 0,0063 до 35 μ M. Було обрано 19 сполук в якості навчальної вибірки за наступними правилами: (1) активність відібраних сполук була кращою, ніж 0,3 μ M, оскільки найбільш активні сполуки надають найбільш

важливу інформацію для побудови фармакофорних моделей; (2) навчальна вибірка повинна охоплювати якомога більше хімічних класів інгібіторів ASK1 для підвищення структурної різноманітності (рис. 4.4).

Для сполук **4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45**, **4.52**, **4.53** із навчальної вибірки були отримані кристалічні структури із каталітичним доменом протеїнкінази ASK1 людини. Ці інгібітори зі встановленими конформаціями, в яких вони зв'язуються з ASK1 були взяті як зразки для конструювання фармакофорної моделі. Конформації сполук **4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45**, **4.52**, **4.53** були екстраговані з кристалічних структур з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 4BHN, 4BID, 3VW6, 4BIC, 4BIB, 4BIE). Просторові структури сполук **4.50** і **4.51** були отримані за використання напівгнучкого докінгу.

Навчальна вибірка, що містила 19 сполук була розділена на 10 кластерів (табл. 4.3).

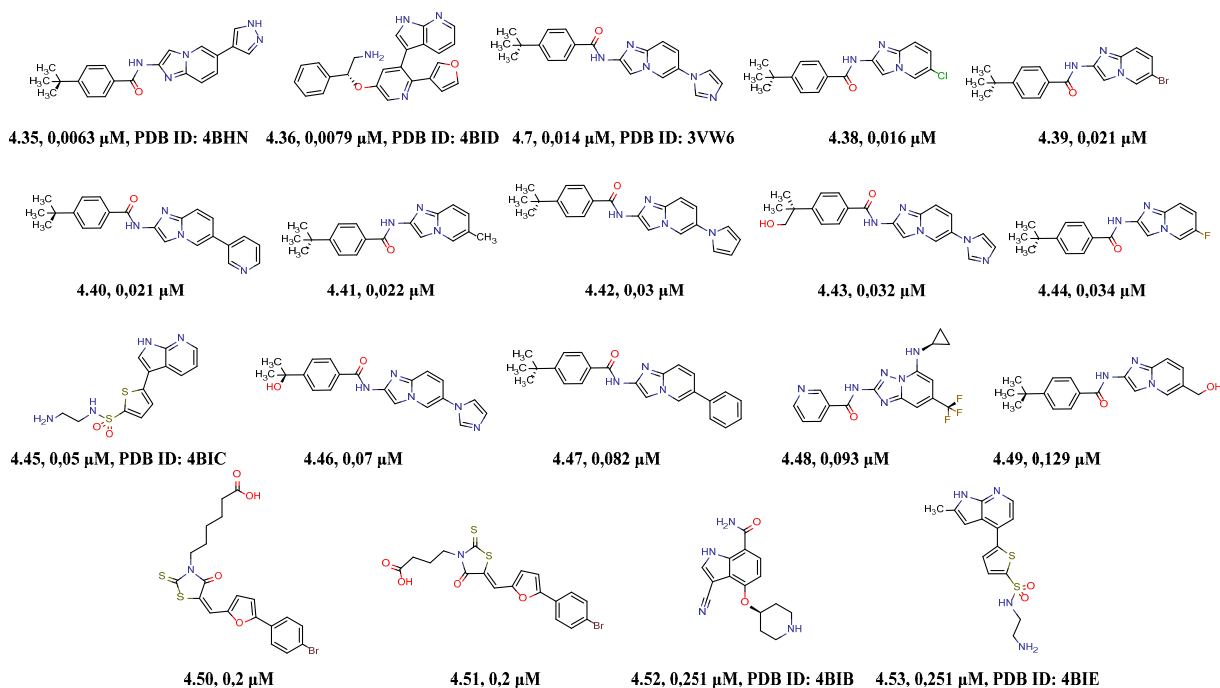


Рис. 4.4 Хімічні структури інгібіторів з навчальної вибірки для побудови фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1

Таблиця 4.3

Кластери сполук із навчальної вибірки. Сполуки із найвищою активністю з кожного кластера позначені сірим кольором

Кластер	1	1	2	2	3	4	4	5	6	7
Сполука	4.50	4.51	4.41	4.49	4.52	4.45	4.53	4.48	4.36	4.37
IC₅₀, μM	0,2	0,2	0,022	0,129	0,251	0,05	0,251	0,093	0,0079	0,014

Кластер	7	7	7	8	9	9	9	10	10
Сполука	4.42	4.43	4.46	4.35	4.38	4.39	4.44	4.40	4.47
IC₅₀, μM	0,03	0,032	0,07	0,0063	0,016	0,021	0,034	0,021	0,082

Метою проведення кластеризації було зменшення кількості сполук в межах кожного класу інгібіторів протеїнкінази ASK1. Із кожного класу була взята сполука з найвищою активністю. У результаті кластеризації отримали нову навчальну вибірку із 10 лігандів (позначені сірим кольором у табл. 4.3). Слід зазначити, що під час генерації фінгерпринтів усі галогени на ароматичному кільці розглядали як функціонально еквівалентні. Таким чином, сполуки **4.38**, **4.39** і **4.44** належали до одного кластеру (9), а сполука **4.41**, що має метильну групу, належала до іншого кластеру (2).

Pharmagist параметризували для конструювання фармакофорної моделі, ґрунтуючись на навчальній вибірці з 10 лігандів. Спочатку, було зроблено структурну суперпозицію для комплексів сполук **4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45**, **4.51** та **4.52** із ASK1. Позиції цих сполук та їх зв'язування в активному сайті протеїнкінази були подібними. Параметризація була здійснена для досягнення схожих положень для інгібіторів ASK1 з невідомими типами взаємодії до інгібіторів з відомими конформаціями зв'язування. У цьому випадку результуюча модель повинна мати спільні фармакофорні точки для типів зв'язування лігандів із різних хімічних класів.

Таким чином, для параметризації, шість сполук із визначеними конформаціями зв'язування з рецептором були використані як зразки.

Отримували 6-12 моделей за один цикл параметризації. Ці моделі аналізували відповідно до їх позиції, скору, та кількості фармакофорних точок. Оскільки параметризація була здійснена для максимально коректного співпадіння лігандів у моделях, було змінено лише основні параметри, що впливали на попарне та множинне вирівнювання лігандів: `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 та аніонів, крім застосування fFLASH алгоритму, було визначено параметр `set charge definition = 1` для присвоєння часткових атомних зарядів.

Pharmagist автоматично ідентифікує найкращу модель, ґрунтуючись на кластеризації множинного вирівнювання сполук та скору відповідних моделей. Як правило, найбільш перспективна модель є першою згенерованою для молекули-зразка (Pha1). Таким чином, було обрано лише перші моделі для наступної валідації, однак всі гіпотези аналізували для виявлення впливу змін параметрів програми на процес генерації фармакофорної моделі.

Під час параметризації виявили, що позиції сполук **4.51** і **4.52** значно відрізнялися від положень інших лігандів. Таким чином, ці сполуки було видалено із навчальної вибірки для того щоб уникнути внеску некоректної інформації у фармакофорну модель. Отже, кінцева менша навчальна вибірка включала 8 сполук, а більша нараховувала 16.

Процес побудови фармакофорної моделі за використання Pharmagist включає 6 етапів: репрезентація ліганда, попарне вирівнювання, множинне вирівнювання, генерація фармакофорних моделей, кластеризація цих моделей та вибір моделей-кандидатів. Спочатку, кожний ліганд розділяється на жорсткі групи, з'єднані обертальними зв'язками. Потім, ці групи асоціюються з сетом фізико-хімічних характеристик, наприклад, акцептор/донор водневого зв'язку, атом катіону/аніону, сет атомів ароматичного кільця, або пара гідрофобних атомів.

Попарне вирівнювання – це суперпозиція молекули-мішені із молекулою, що обрана як зразок. У нашому експерименті як молекули-зразки були обрані інгібітори з відомими конформаціями взаємодії з рецептором. Метою цього етапу є генерація попарних вирівнювань із найвищим скором. $\sum_i s(f_i)$ – це скор попарного вирівнювання, де $s(f_i)$ – це скор для співпадіння характеристики молекули-зразка f_i , що становить 0,3 для гідрофобних груп, 3 для ароматичних кілець та 1 для решти.

Множинне вирівнювання визначається підмножиною лігандів-мішеней та попарним вирівнюванням. Скор множинного вирівнювання визначається як $(m+1)^{1/2} * feature_score$, де m це кількість лігандів і $feature_score$ дорівнює $\sum_i s(f_i)$.

Теоретично, фармакофорна модель може бути отримана з найвищого скору множинного вирівнювання. Однак, оскільки комбінація декількох множинних вирівнювань може дати більше інформації для фармакофорної моделі-кандидата, то на наступному етапі краще отримати усереднену модель із сукупності множинних вирівнювань. Загальний скор усередненої моделі – $\sum_i w(f_i) * s(f_i)$, де $w(f_i)$ – це функція числа молекул $m(f_i)$ в ансамблі, що відповідає f_i , таким чином $w(f_i) = (m(f_i))^{1/2}$.

Використання різних молекул-зразків може призводити до отримання однакових або подібних усереднених моделей. Після повторних циклів запуску програми для всіх можливих молекул-зразків, здійснюється кластеризація усереднених моделей із подібним просторовим паттерном характеристик.

Вибір моделі-кандидата є ітеративним процесом. Перша вибрана усереднена фармакофорна модель має найвищий скор. Після повторення процесу з наступними усередненими моделями, знову вибирається модель із найвищим скором. Вона має не більше, ніж дві спільні молекули із сетом попередньої моделі. Процес повторюється до тих пір, поки не будуть випробувані всі молекули з навчальної вибірки.

Просторові фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази ASK1 були побудовані за двома різними шляхами: деякі моделі були згенеровані ґрунтуючись на вручну вибраних молекулах-зразках; інші моделі були

конструйовані в результаті послідовного використання всіх лігандів як зразків та автоматичного вибору найкращої моделі.

Навчальна вибірка із 8 лігандів включала чотири сполуки (**4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45**) із визначеними конформаціями зв'язування з рецептором, а навчальна вибірка із 16 сполук включала 5 інгібіторів (**4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45**, **4.53**) із відомими просторовими структурами. Використовуючи вручну ці ліганди як молекули-зразки, було отримано 10 фармакофорних моделей (для сполуки **4.37** програма ідентифікувала дві коректні моделі). Для зручності, моделям було присвоєно назви, які потім використовували. Перше число у назві вказувало на навчальну вибірку (8 – менша, 16 - більша), друге число – молекулу-зразок, третє число – номер згенерованої моделі з однієї молекули-зразка. Моделі **8.1** та **8.3**, які було отримано з меншої вибірки, були ідентичними, тому для наступних експериментів було залишено лише модель **8.3**. Модель **16.19** була некоректною і не бралася до уваги.

Крім того, під час автоматичної процедури, коли всі сполуки розглядали як молекули-зразки, знайдено дві моделі, ґрунтуючись на сполуках **4.37** та **4.48** з меншої навчальної вибірки і три моделі, ґрунтуючись на сполуках **4.40**, **4.42** і **4.45** з більшої навчальної вибірки. Оскільки просторові структури для сполук **4.40**, **4.42** і **4.48** не відомі, їх не використовували. Моделі, згенеровані на основі сполук **4.37** та **4.45** були подібними до тих, що отримали під час використання вручну вибраних молекул-зразків. В результаті у подальших дослідженнях не використовували жодної автоматично згенерованої моделі.

Зрештою, було вибрано вісім фармакофорних моделей, які були згенеровані, ґрунтуючись на сполуках **4.36**, **4.37**, **4.45** із меншого сету та **4.35**, **4.36**, **4.37**, **4.45** із більшого сету (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Характеристики фармакофорних моделей, згенерованих за допомогою Pharmagist

Модель	Скор	Кількість фармакофорних точок	Ar (ароматична)	Hud (гідрофобна)	Don (донор)	Acc (акцептор)	Neg (аніон)	Pos (катіон)
8.2	37,034	5	3	0	0	2	0	0
8.3	62,837	16	4	7	1	3	0	1
8.11	32,812	4	3	0	0	1	0	0
16.1	77,480	12	4	3	1	3	0	1
16.2	47,266	5	3	0	0	2	0	0
16.3.1	80,821	16	4	7	1	3	0	1
16.3.2	75,148	11	4	2	1	2	0	2
16.11	49,040	6	3	0	0	3	0	0

Було оцінено коректне передбачення активності сполук за допомогою розроблених фармакофорних моделей. Валідаційні скринінги, показали, що майже всі моделі передбачали активність сполук коректно, але найкращими моделями були **8.3** та **16.1**. Середня кількість точок для співпадіння лігандів із моделями була 3,5 та 3,3 для моделей **8.3** і **16.1**, відповідно. Ці моделі коректно передбачили 19 із 23 активних сполук (82,61%) та 16 із 20 неактивних лігандів (80%). Обидві моделі передбачили 10 високо активних сполук із 16 (62,5%), модель **8.3** передбачила одну із семи середньо активних сполук (14,3%), а модель **16.1** – дві із семи середньо активних сполук (28,6%) (табл. 4.5).

Модель **8.11** дозволила ідентифікувати всі активні сполуки. Однак слід зазначити, що всі сполуки із середньою інгібувальною активністю були оцінені як високо активні. Таким чином, модель **16.1** є найбільш точною. Крім того, ця модель є структурно простішою і тому була використана для наступних досліджень.

Таблиця 4.5

Результати валідаційних скринінгів відносно
згенерованих фармакофорних моделей інгібіторів ASK1

Модель	Середня кількість спільних точок	Загальна кількість передбачених активних сполук, %	Кількість передбачених високо активних 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

Примітка. Сірим кольором виділено результати скринінгу відносно кращої фармакофорною моделі **16.1**

Модель **16.1** включала 12 фармакофорних точок. Вага цих точок вказує на їх важливість для взаємодії з активним сайтом ензиму. Було ідентифіковано, що Ar2, Ar3 та Acc2 – найбільш важливі фармакофорні точки. Ar2 і Ar3 співпадають із центральною ароматичною системою сполуки **4.35**, що складається з двох гетероциклів. Гетероциклічні кільця задіяні в гідрофобних взаємодіях із амінокислотними залишками в активному сайті. Акцептор Acc2 бере участь у взаємодії з шарнірною ділянкою. Таким чином, модель підтверджується типом зв'язування сполуки **4.35** в АТФ-акцепторному сайті ASK1 (рис. 4.5).

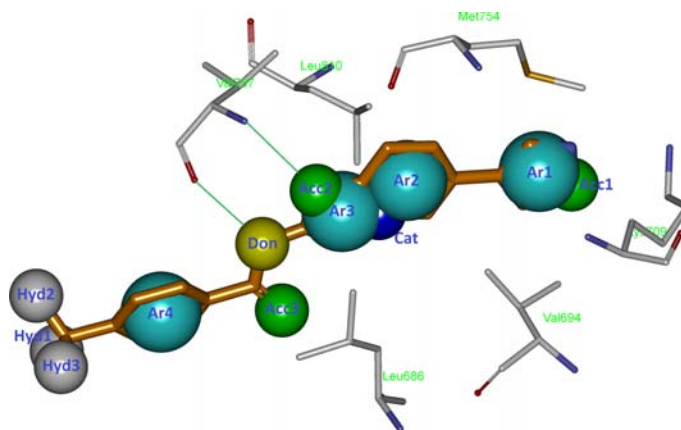


Рис. 4.5 Накладання сполуки **4.35** із навчальної вибірки із фармакофорною моделлю **16.1** в активному сайті протеїнкінази ASK1 (PDB ID: 4BHN). Фармакофорні точки, що відповідають згенерованій моделі позначені кольорами: зеленим – акцептори водневого зв'язку, жовтим – донор водневого зв'язку, сірим – гідрофобні точки, блакитним – ароматичні точки, синім – катіон

Радіус для ароматичних точок, визначений Pharmagist був 1,2 Å, а радіус для інших точок – 0,8 Å. Параметри моделі **16.1** представлені в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Параметри фармакофорної моделі **16.1**

Фармакофорна 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

Продовж. табл. 4.6

Ar4	4	1,2
Hyd1	2,44949	0,8
Hyd2	3,87298	0,8
Hyd3	3,87298	0,8

Різні сполуки навчальної вибірки співпадали з різною кількістю точок моделі і робили відповідний внесок у ваги фармакофорних точок. Кластери сполук, які формують модель, їхній скор та кількість фармакофорних точок різного типу представлені в табл. 4.7.

Для того щоб більш детально дослідити релевантність отриманої фармакофорної моделі **16.1**, було здійснено скринінг комерційно доступної бібліотеки, що налічувала 106529 органічних низькомолекулярних сполук, включаючи 24 високо активні інгібітори ASK1 (16 сполук із навчальної вибірки, сполуки **4.51** і **4.52**, які були видалені із навчальної вибірки, одне додаткове похідне сполуки **4.37** – (4-терт-бутил-N-{6-[(метиламіно)метил]імідазо[1,2-a]піридин-2-іл}бензамід (сполука **4.54**)) і п'ять похідних сполуки **4.51** – ((2S)-2-[(5Z)-5-{[5-(3,4-дихлорофеніл)фуран-2-іл]метиліден}-4-оксо-2-сульфаніліден-1,3-тіазолідин-3-іл]пропанова кислота) (сполука **4.55**), (2R)-2-[(5Z)-5-{[5-(4-бромфеніл)фуран-2-іл]метиліден}-4-оксо-2-сульфаніліден-1,3-тіазолідин-3-іл]пентанова кислота (сполука **4.56**), (2S)-2-[(5Z)-5-{[5-(3-хлорофеніл)фуран-2-іл]метиліден}-4-оксо-2-сульфаніліден-1,3-тіазолідин-3-іл]бутанова кислота (сполука **4.57**), (2S)-2-[(5Z)-5-{[5-(4-бромфеніл)фуран-2-іл]метиліден}-4-оксо-2-сульфаніліден-1,3-тіазолідин-3-іл]бутанова кислота (сполука **4.58**) і (5Z)-5-{[5-(4-бромфеніл)фуран-2-іл]метиліден}-3-(3-гідроксифеніл)-2-сульфаніліден-1,3-тіазолідин-4-он (сполука **4.59**) та шість сполук із середньою активністю.

Таблиця 4.7

Співпадіння сполук у навчальній вибірці з моделлю 16.1

Кластери сполук	Скор кластера	Кількість точок	Ar	Hyd	Don	Acc	Cat
4.1[*], 4.3, 4.6	77,480	12	4	3	1	3	1
4.9, 4.12	76,745	11	4	2	1	3	1
4.8, 4.13	72,502	10	4	2	1	2	1
4.4, 4.5, 4.7, 4.10, 4.15	63,016	9	3	2	1	2	1
4.14	60,692	7	3	0	1	2	1
4.2, 4.11, 4.19	32,692	3	2	0	0	1	0

Примітка. * - молекула-зразок

Виявилось, що фармакофорна модель була високо специфічна до двох класів інгібіторів протеїнкінази ASK1. Тому ця модель була взята для подальшої оптимізації. Було видалено декілька фармакофорних точок – Cat, Acc3 та Hyd1-3, які були спільними для трьох класів інгібіторів ASK1. Остаточна фармакофорна модель була більш загальна для всіх сполук із навчальної вибірки (рис. 4.6).

В результаті 15 високо активних сполук із трьох хімічних класів потрапили в топ 0,5% сполук із найвищим скором. Зокрема, серед них були похідні N-{імідазо[1,2-а]піридин-2-іл}бензаміду (сполуки **4.35**, **4.37-4.54**, **4.46**, **4.47**, **4.49** та **4.54**), похідне N-{[1,2,4]триазоло[1,5-а]піридин-2-іл}бензаміду (сполука **4.48**), і похідне 3-(піридин-3-іл)-1H-піроло[2,3-b]піридину (сполука **4.36**). Похідне 3-(тіофен-2-іл)-1H-пірол-о[2,3-b]піридину (сполука **4.45**) потрапило в 1% сполук із найвищим скором.

Кореляційний коефіцієнт Метьюса для валідації моделі становив 0,67. Значення Z-скорів для активних сполук, передбачених за допомогою неоптимізованої моделі були в межах від 9,217 до 22,394, а оптимізованою – від 16,86 до 39,135. Це означає, що скорі Pharmagist високоактивних сполук, які були передбачені оптимізованою моделлю мали вище позитивне відхилення від середнього значення зразка, що свідчить про кращу передбачувальну здатність.

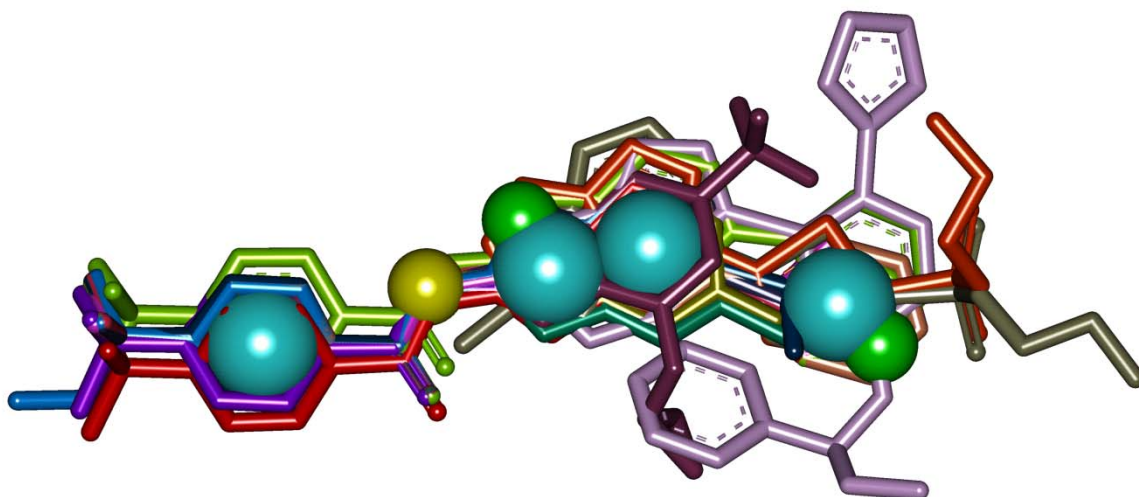


Рис. 4.6 Остаточна фармакофорна модель інгібіторів ASK1. Кольорами позначено: блакитним – ароматичні точки, зеленим – акцептори водневого зв'язку, жовтим – донор водневого зв'язку

З розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів ASK1 було співставлено бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-они шляхом суперпозиції комплексу сполуки **4.34** (ВРyО-34) в активному сайті каталітичної субодиниці протеїнкінази ASK1, отриманого за допомогою молекулярного докінгу та комплексу інгібітора з протеїнкіназою ASK1, отриманого з кристалічної структури із PDB ID: 4BHN. Оскільки фармакофорна модель базувалась на інгібіторі комплексу 4BHN, фармакофорні точки було побудовано в ручному режимі з використанням відповідних радіусів в моделі. В результаті отримано накладення фармакофорної моделі та сполуки ВРyО-34 (рис. 4.7).

Співставлення сполуки ВРyО-34 з фармакофорною моделлю показало, що інгібітор з невеликим відхиленням відповідав п'яти фармакофорним точкам моделі з семи. Так, тіазоловий та пірол-2-оновий цикли відповідали двом центральним ароматичним точкам, атом сульфуру – донору водневого зв'язку, обидві кето-групи ліганду – акцепторам водневого зв'язку. Дане співпадіння підтверджує коректність розробленої фармакофорної моделі.

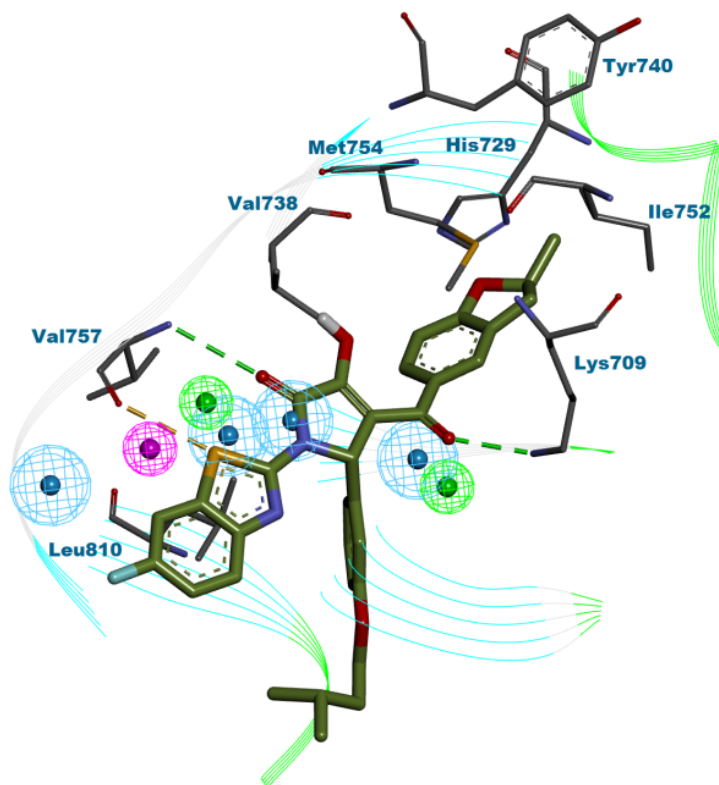


Рис. 4.7 Співставлення сполуки **4.34** (BPyO-34) з розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів протеїнкінази ASK1. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, π -сульфідна-взаємодію – жовтою пунктирною лінією. Кольорами позначено: синім – ароматичні точки, зеленим – акцептори водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку.

Таким чином, за допомогою програми Pharmagist було побудовано фармакофорну модель, що з високою точністю передбачала активність сполук у колекції з 106529 лігандів. Ця модель може бути корисною для дизайну нових інгібіторів протеїнкінази ASK1.

Основні наукові результати розділу опубліковані у статтях:

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.

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.

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ПРОТЕЇНКІНАЗИ FGFR1 І ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ

5.1 Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази FGFR1

Рецептор фактору росту фібробластів 1 (FGFR1) – це трансмембранний протеїн, що відноситься до групи рецепторних тирозинових протеїнкіназ і залучений до регуляції росту, проліферації, диференціювання клітин, ембріонального розвитку, ангиогенезу та інших важливих фізіологічних функцій. Низка експериментальних даних свідчить про те, що FGFR1 є важливою терапевтичною мішенню. Зокрема, було виявлено, що активність FGFR1 тісно корелює з розвитком раку легень [88-99]. Інгібування FGFR1 специфічним кіназним інгібітором, або введенням домінантно-негативної конструкції FGFR1 призводило до значного зниження проліферації, клоногенності, міграції, формування сфероїдів і зупинки G1 фази життєвого циклу у деяких клітинних лініях мезотеліоми [98]. Було показано, що підвищена активність FGFR1 залучена до патогенезу плоскоклітинної карциноми язика [99], синоназального раку [100], раку шлунка [101], підшлункової залози [102, 103], колоректального раку [104, 105], карциноми нирок [106, 107], раку простати [108, 109], крові [110] і гострої мієлоїдної лейкемії [111]. Нещодавно, з'явилися повідомлення, що онкогенні мутації FGFR1 з'являються у пацієнтів із пілоцитною астроцитомою [112]. Існують експериментальні докази того, що надрегульована експресія FGFR1 асоційована з паратироїдною карциномою [113]. Високий рівень ампліфікації гена *FGFR1* є досить частою онкогенною зміною та незалежним прогностичним фактором у плоскоклітинній карциномі стравоходу [114]. Інтегративний геномний

та транскриптомний підхід дозволив виявити, що ампліфікація гена *FGFR1*, як і надрегуляція протеїнових продуктів, відіграють важливу роль в етіології маткової лейоміоми [115]. *FGFR1* може бути залучений до розвитку ендометріозу, і позиціонується як нова терапевтична мішень та прогностичний маркер для цієї хвороби [116]. Таким чином, розробка високоефективних та селективних інгібіторів протеїнкінази *FGFR1* є важливим завданням сучасної науки та фармацевтичної індустрії.

Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази *FGFR1* було побудовано рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель та проведено віртуальний скринінг колекції сполук із її використанням.

Для побудови рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази *FGFR1* було зроблено суперпозицію трьох комплексів *FGFR1* з її інгібіторами (PDB ID: 4WUN, 3RHX, 4F64).

Для суперпозиції використовували параметри, вказані за замовчуванням. Порівняння комплексів виконували на основі стеричних та електростатичних особливостей молекул у рівному співвідношенні (по 50%). Потім із накладених комплексів ліганди та рецептори зберігали окремо для подальшої роботи з ними за допомогою програми Pharmer. Суперпозицію інгібіторів показано на рисунку 5.1 а.

Pharmer згенерував для кожного комплексу первинні фармакофорні моделі (рис. 5.1 б). Наступним кроком було геометричне усереднення фармакофорних точок одного типу. Спочатку були видалені одинарні точки – гідрофобну точку та акцептор водневого зв'язку. Також було видалено донор водневого зв'язку, сформований на основі двох первинних донорів та ароматичну точку, розміщену біля сукупності донорів та акцептора. Це було зроблено з метою не перевантажувати фармакофорну модель, оскільки в невеликій ділянці було розміщено чотири фармакофорні точки, а це в свою чергу сильно б звужувало результати скринінгу.

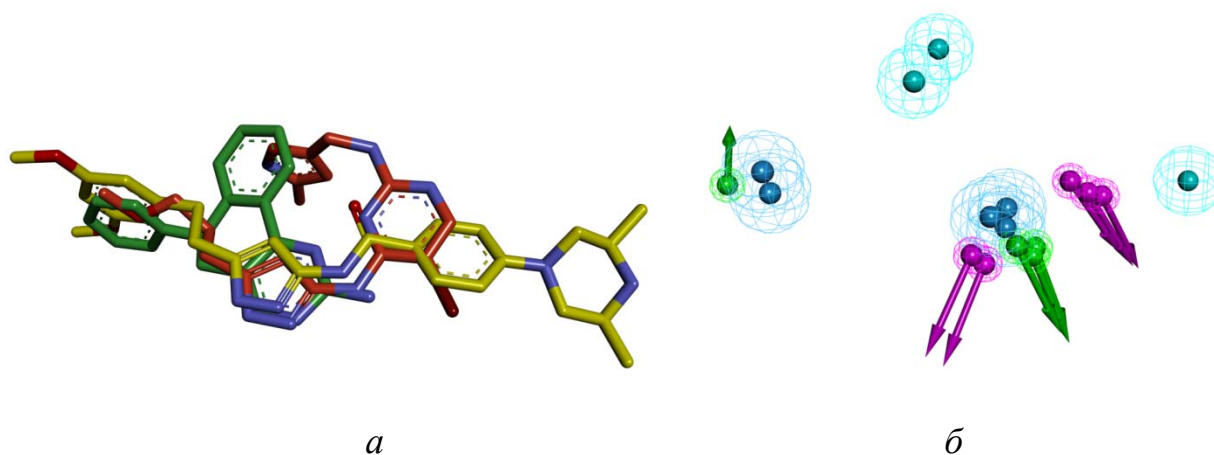


Рис. 5.1 Суперпозиція інгібіторів FGFR1 (а) та рецепторно-орієнтовані фармакофорні моделі, згенеровані за допомогою програми «Pharmer» (б). Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Радіуси для точок були встановлені стандартні для Pharmer – 1,1 Å для ароматичної точки, 1 Å для гідрофобної точки та 0,5 Å для донора і акцептора водневого зв'язку. Остаточну фармакофорну модель зображено на рис. 5.2.

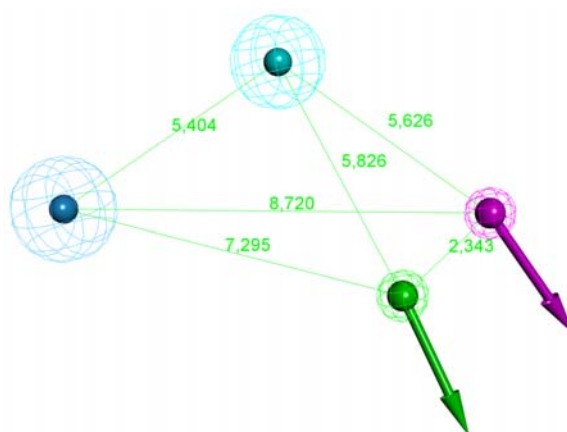


Рис. 5.2 Рецепторно-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази FGFR1, що була використана для фармакофорного скринінгу. Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

В результаті модель містила ароматичну точку, що відповідає гідрофобній ділянці I АТФ-зв'язувального сайту FGFR1, гідрофобну точку в гідрофобній кишені II та донор і акцептор водневого зв'язку, направлені до шарнірної ділянки протеїнкінази FGFR1.

5.2 Фармакофорний скринінг, відбір та тестування сполук *in vitro*

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено фармакофорний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала майже 180000 молекул. Для кожної сполуки було згенеровано не більше 250 конформерів. Для кожного конформера Pharmer робить фармакофорне представлення, тобто визначає всі потенційні фармакофорні точки, котрі прирівнюються до моделі. При цьому програма обраховує середньоквадратичне відхилення між фармакофорними точками досліджуваної сполуки та моделі. Чим менше середньоквадратичне відхилення, тим краще і точніше сполука прирівнюється до точок фармакофорної моделі. Відповідно до значень середньоквадратичного відхилення (RMSD, Å) та візуального аналізу сполук за співпадінням із фармакофорною моделлю, було відібрано та протестовано *in vitro* 61 сполуку.

Серед активних сполук ідентифіковано два хімічні класи інгібіторів протеїнкінази FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти (рис. 5.3) і [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини.

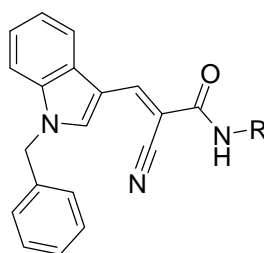


Рис. 5.3 Загальна хімічна структура похідних 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилової кислоти

Серед 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилових кислот досліджено дві сполуки – **5.1** та **5.2**, що пригнічували активність протеїнкінази FGFR1 зі значеннями IC_{50} відповідно 1,4 та 1,5 μM . Графік розтитровування і визначення IC_{50} найбільш активної сполуки **5.1**, приведений на рис. 5.4. Ці сполуки мали подібну активність. Відрізнялися вони наявністю в структурах орто-гідроксифенілу (сполука **5.1**) і тріазолового замісника (сполука **5.2**). Така зміна замісників не впливала на інгібувальну активність сполук. Це можна пояснити тим, що, згідно даних комп'ютерного моделювання, цей замісник направлений на вихід із активного центру протеїнкінази та практично не утворює ніяких взаємодій із амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту FGFR.

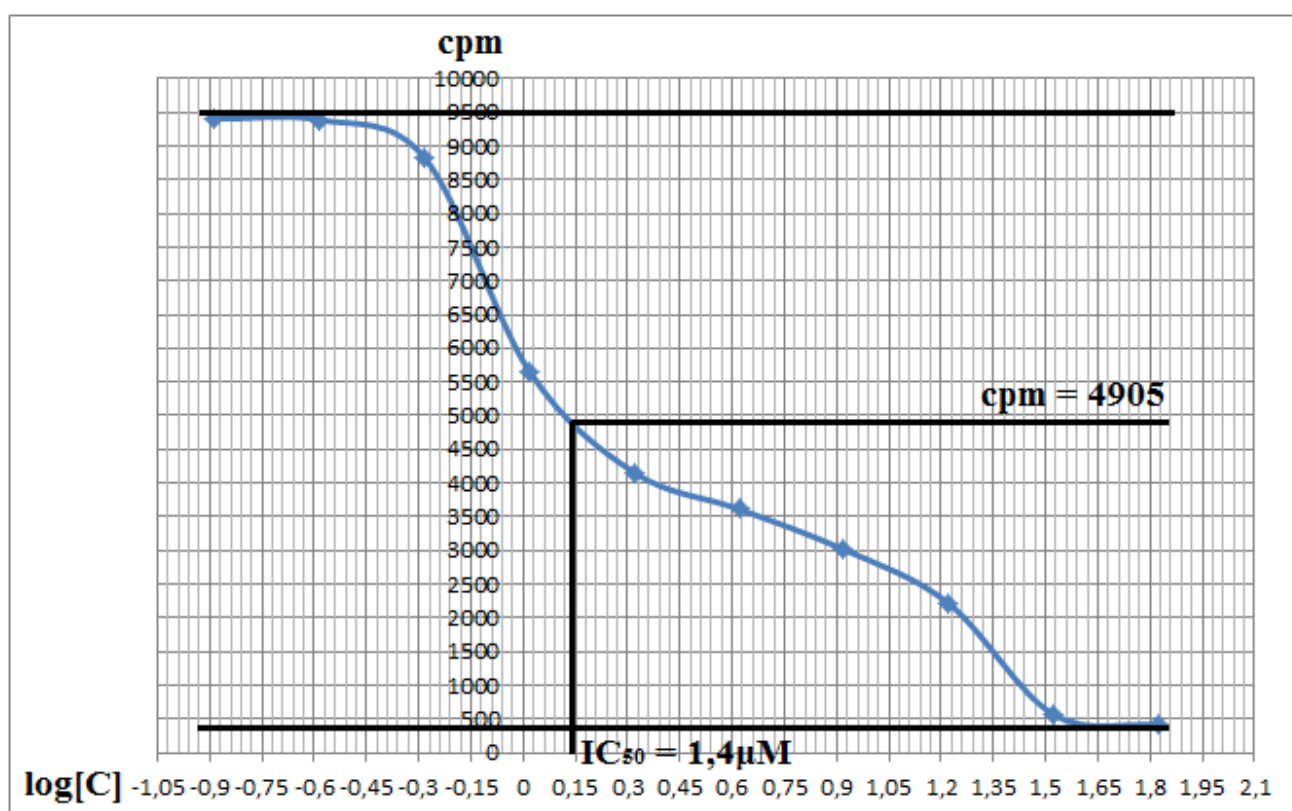


Рис. 5.4 Графік розтитровування і визначення IC_{50} сполуки **5.1**

Згідно даних комп'ютерного моделювання 1-бензиловий замісник на індоловому фрагменті відповідав ароматичній фармакофорній точці моделі в

гідрофобній кишені I, сам індол відповідав гідрофобній точці в гідрофобній кишені II. Ціано-група відповідала акцептору водневого зв'язку, а аміно-група – донору (рис. 5.5).

Інший хімічний клас інгібіторів FGFR1 – [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини був дещо менш активним. Досліджено п'ять сполук цього класу (рис. 5.6). Згідно з даними комп'ютерного моделювання тіоновий замісник відповідав акцептору водневого зв'язку, аміно-група – донору. Феніл фенілметиліденового фрагменту займав гідрофобну кишеню II АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази, якому відповідає гідрофобна точка фармакофорної моделі.

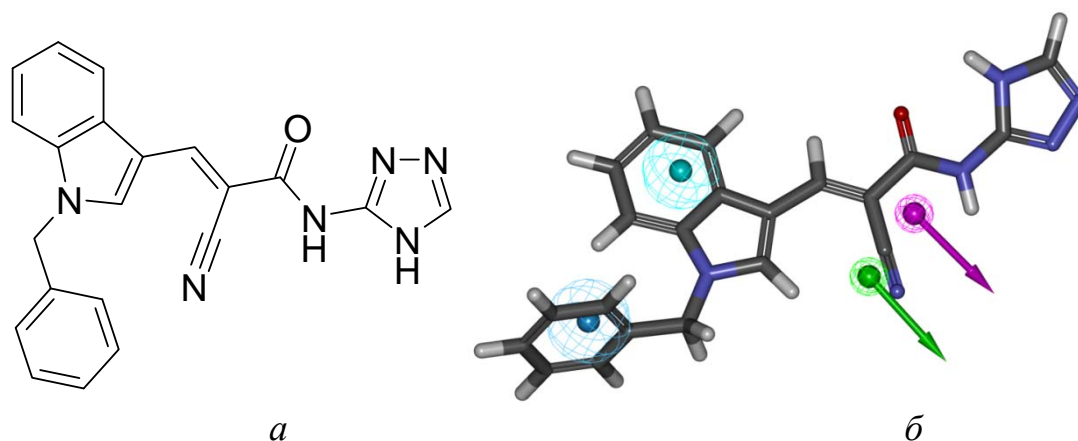


Рис. 5.5 Хімічна структура найбільш активного інгібітора FGFR1, знайденого при скринінгу (а), та його збіг із фармакофорною моделлю інгібіторів FGFR1 (б). Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну точку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Замісник R^1 займав гідрофобну кишеню I, якій відповідає ароматична точка фармакофорної моделі. Порівнявши сполуки **5.3**, **5.6** та **5.7**, зроблено висновок, що на інгібувальну активність інгібіторів впливає не зміна гідрофобності замісника R^1 , а його позиція. Так, мета- чи пара-положення були кращими, ніж орто-.

Головним чином на інгібувальну активність похідних [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини впливала хімічна структура замісника R². Активність похідних цього класу була краща у випадку, коли він ароматичний (сполуки **5.3**, **5.6** та **5.7**), ніж аліфатичний (сполуки **5.4**, **5.5**).

Крім вищезазначених двох класів інгібіторів FGFR1, було знайдено ще вісім активних сполук зі значеннями IC₅₀ від 5,2 μM до 16 μM (рис. 5.7).

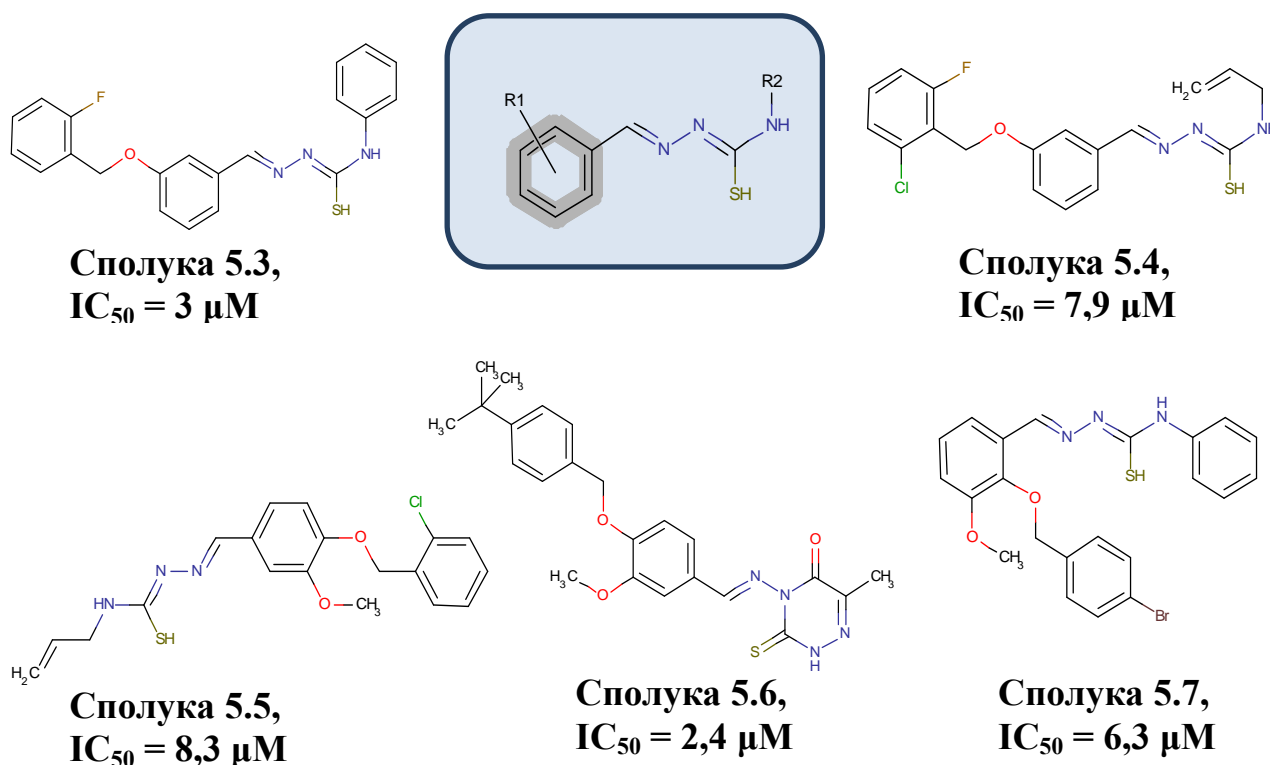
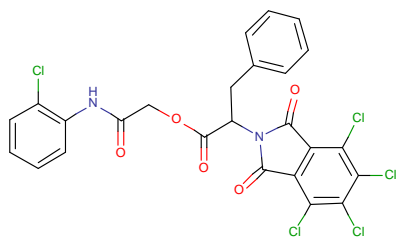


Рис. 5.6 Інгібітори FGFR1 – [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини

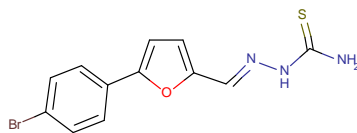
Усі знайдені в результатів проведення фармакофорного скринінгу активні сполуки є сполуками-хітами. Вони можуть використовуватися в біохімічних експериментах при вивченні ролі протеїнкінази FGFR1 на рівні мережі сигнальних шляхів клітини, а також можуть стати основою для подальшої оптимізації з метою розробки лідерних сполук.

Отже, розроблено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель протеїнкінази FGFR1 та проведено фармакофорний скринінг, в результаті якого

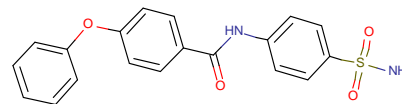
знайдено два нові класи інгібіторів FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти і [(фенілметиліден)-аміно]тіосечовини та низку інших сполук-хітів.



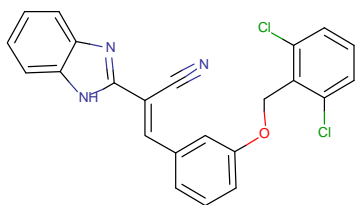
Сполука 5.8,
IC₅₀ = 5,2 μM



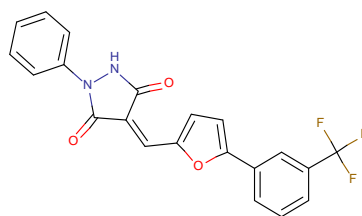
Сполука 5.9,
IC₅₀ = 7,4 μM



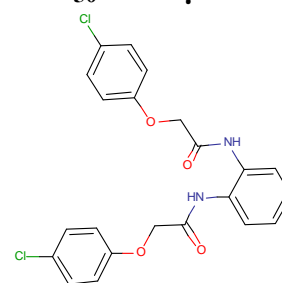
Сполука 5.10,
IC₅₀ = 10 μM



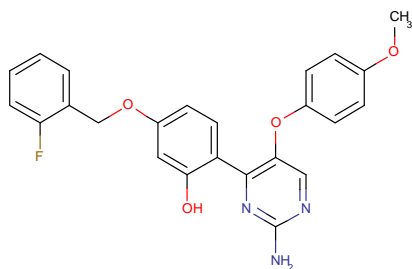
Сполука 5.11,
IC₅₀ = 10 μM



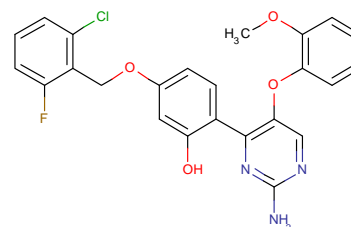
Сполука 5.12,
IC₅₀ = 7 μM



Сполука 5.13,
IC₅₀ = 15 μM



Сполука 5.14,
IC₅₀ = 14 μM



Сполука 5.15,
IC₅₀ = 16 μM

Рис. 5.7 Інгібітори FGFR1, знайдені за допомогою фармакофорного скринінгу

5.3 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази FGFR1

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 був проведений молекулярний докінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала 1257 речовин. За допомогою програми Autodock розраховували енергії взаємодії (скорингова функція, не вільна енергія Гібса) лігандів із АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази FGFR1. Для біохімічного тестування було відібрано 12 сполук із найкращими показниками енергій зв'язування комплексів «рецептор-ліганд».

Для відібраних сполук визначали їх інгібувальну здатність по відношенню до FGFR1 при їх концентрації в реакційній суміші 33 μM . При інгібуванні FGFR1 сполукою **5.16**, залишкова активність кінази становила 11 %. Для цієї сполуки будували титрувальну криву та визначали значення IC_{50} , що становило 1,58 μM . Ще три менш активні сполуки додатково перевіряли при концентрації 10 μM . Залишкова активність протеїнкінази при інгібуванні сполуками **5.17** та **5.18** при цій концентрації становила 33 % та 28 %, відповідно. Для них було встановлено значення IC_{50} : сполука **5.17** – 6,9 μM , сполука **5.18** – 4 μM .

Ці сполуки відносилися до нового класу інгібіторів FGFR1 – піридин-3-карбонітрилів. Вони є перспективними для подальшої оптимізації. Із цією метою було ретельно вивчено комплекси сполук **5.16**, **5.17** та **5.18** із АТФ-зв'язувальним сайтом FGFR1, отримані в результаті проведення молекулярного докінгу, та запропоновано для них способи зв'язування.

Сполука **5.16** взаємодіяла з ключовими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту FGFR1. Кето-група інгібітора утворювала водневий зв'язок із амідною групою Ala564, що знаходиться в шарнірній ділянці кінази. 6,7-дигідро-5H-циклопента[b]піридиновий гетероцикл розташовувався під фосфат-зв'язувальною ділянкою та утворював гідрофобні взаємодії типу π - π , π -алкіл та алкіл-алкіл із амінокислотними залишками Val492, Lys514, Ala640, Leu630, Val561. Фенільний залишок утворював гідрофобні взаємодії (π -алкіл) із Ala640 і

електростатичний зв'язок типу π -аніон із Asp641, а також водневий зв'язок між фенільною групою інгібітора та кето-групою Asn628. Залишок 4-хлорбензену утворював гідрофобні взаємодії типу π - π з Leu484 (рис. 5.8).

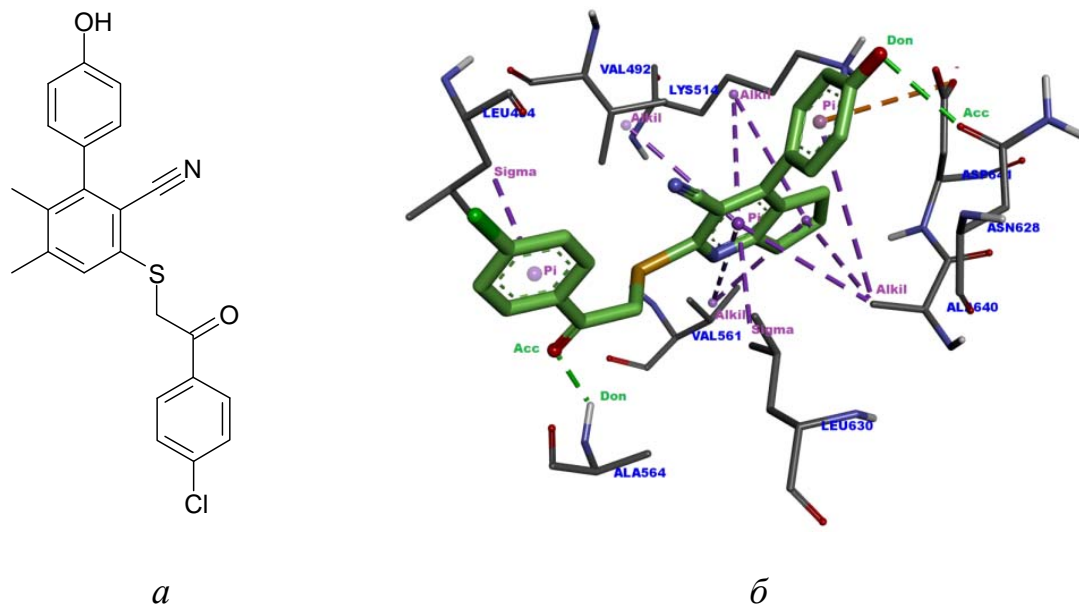


Рис. 5.8 *a* – хімічна структура сполуки **5.16**, *б* – механізм зв'язування сполуки **5.16** із активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні, оранжевими – електростатичні; Pi – π -електронні хмари, Sigma – електронні пари типу σ , Alkil – алкіли

Сполука **5.17** мала подібний спосіб зв'язування з АТФ-зв'язувальним сайтом FGFR1 до сполуки **5.16**. Сполука симетрична, тому щоб уникнути неоднозначностей було пронумеровано однакові частини (I і II) (рис. 5.9). Частина I досліджуваної молекули розташовувалася в аденін-зв'язувальній ділянці кінази. Піридиновий цикл та метильний замісник утворювали гідрофобні взаємодії типу π -алкіл із амінокислотним залишком Leu484, Нітроген піридинового циклу утворював водневий зв'язок з амідною групою Gly567, який знаходиться в шарнірній ділянці протеїнкінази. Частина II цієї молекули займала гідрофобну ділянку під фосфат-зв'язувальним сайтом та утворювала гідрофобні взаємодії типу

π -алкіл та π - δ з гідрофобними амінокислотними залишками Leu630, Ile545, Ala640, Val492, ацетильний замісник піридинового циклу утворював два водневі зв'язки з консервативними амінокислотними залишками Lys514 та Asp641 (рис. 5.9).

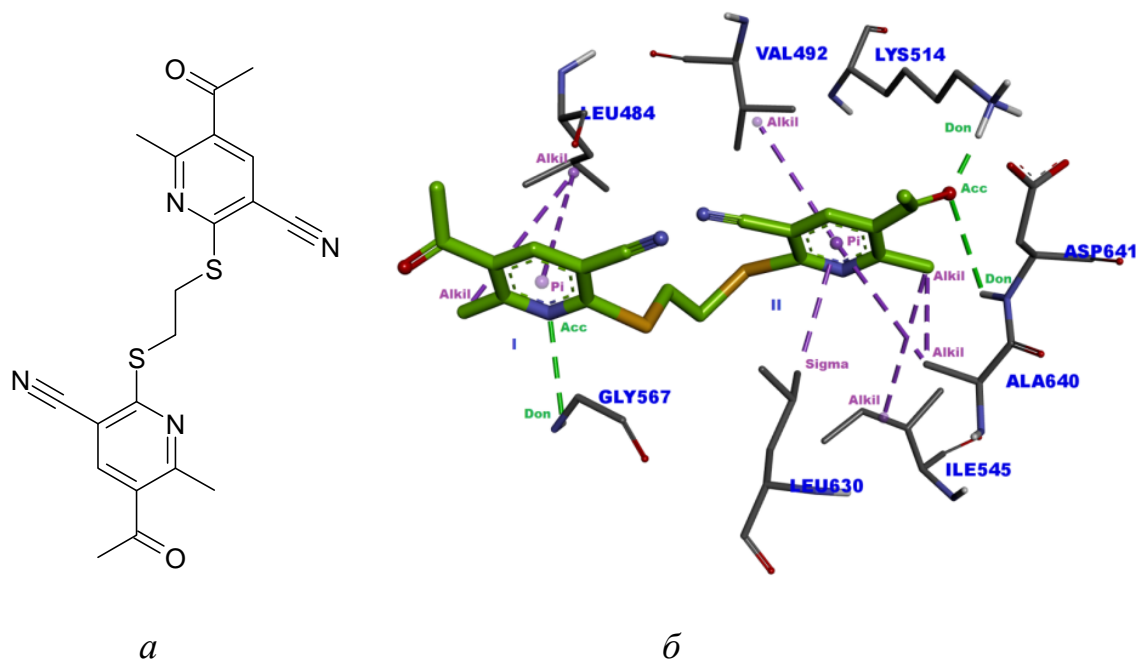


Рис. 5.9 *a* – хімічна структура сполуки **5.17**, *б* – механізм зв'язування сполуки **5.17** із активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні; Pi – π -електронні хмари, Sigma – електронні пари типу δ , Alkil – алкіли

Сполука **5.18** мала подібний спосіб зв'язування з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази FGFR1 як у сполук **5.16** та **5.17** за винятком відсутності водневих зв'язків з шарнірною ділянкою кінази. Натомість інгібітор утворював водневі зв'язки між Нітрогеном піридинового циклу та амідною групою Asn568, і аміногрупою 2-амінопіридинового залишку та карбоксильною групою Glu571. Також піридиновий цикл утворював гідрофобні взаємодії (π -алкіл) з Leu630. Тіофенове кільце розміщувалося в аденін-зв'язувальній ділянці активного центру FGFR1 і утворювало гідрофобні взаємодії, зокрема π -алкіл та π - δ з Leu484, Leu630, Ala564, Ala512, Val492. 4-бутилбензеновий залишок розташовувався в фосфат-зв'язувальній ділянці і також утворював гідрофобні взаємодії (π -алкіл) з

Val492, Lys514 та Ala640 та електростатичні взаємодії з консервативними амінокислотними залишками Lys514 та Asp641 (рис. 5.10).

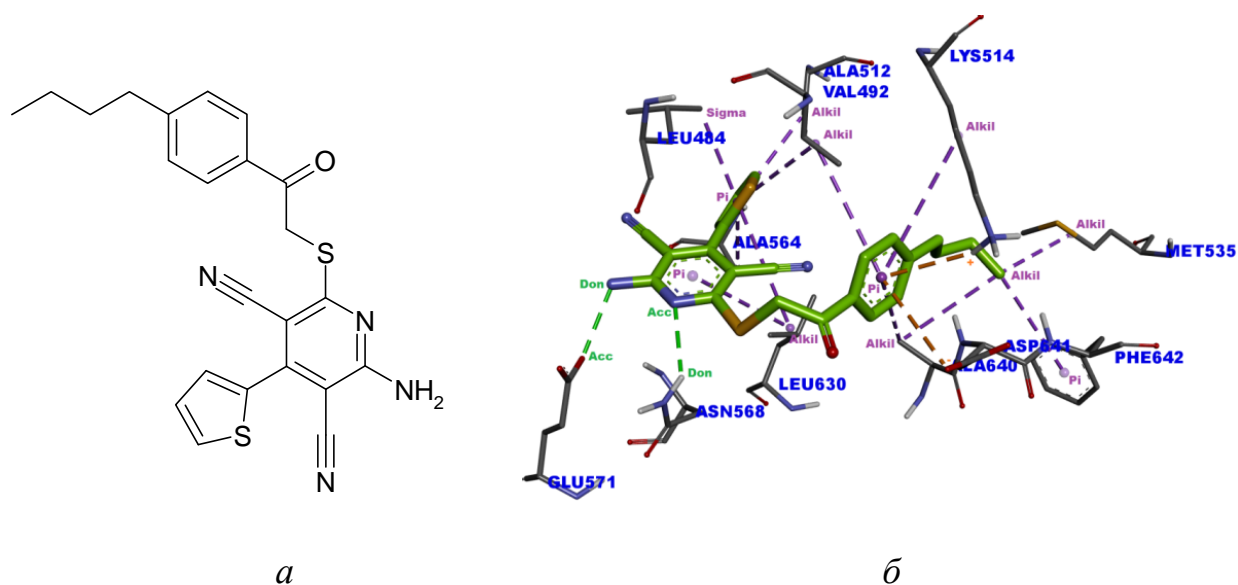


Рис. 5.10 *a* – хімічна структура сполуки **5.18**, *б* – механізм зв'язування сполуки **5.18** із активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні, оранжевими – електростатичні; Pi – π -електронні хмари, Sigma – електронні пари типу σ , Alkil – алкіли

Для співставлення піридин-3-карбонітрилів з розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів FGFR1 було зроблено суперпозицію комплексів сполук **5.16**, **5.17** та **5.18** в активному сайті каталітичної субодиниці протеїнкінази FGFR1, отриманих за допомогою молекулярного докінгу та комплексів протеїнкінази FGFR1 з інгібіторами, на основі яких будувалась модель. Фармакофорні точки було добудовано в ручному режимі з використанням відповідних координат та радіусів, використаних в моделі. В результаті отримано накладення фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1 та сполук **5.16**, **5.17** та **5.18**. Найбільш повно відповідала моделі сполука **5.16** (рис. 5.11). Тому цю сполуку запропоновано надалі використовувати як основу для подальшої оптимізації класу.

Циклопентан циклопента[b]піридин-3-карбонітрилового фрагменту відповідав ароматичній точці моделі в гідрофобній кишені I активного сайту протеїнкінази. Відповідно до цього запропоновано замінити цей фрагмент на аналогічний п'ятичленний ароматичний замісник і синтезувати похідні з різними не великими гідрофобними замісниками на п'ятичленному циклі для поліпшення взаємодії з гідрофобною ділянкою I.

Гідроксифеніловий цикл відповідав гідрофобній точці фармакофорної моделі в гідрофобній кишені II АТФ-зв'язувального сайту FGFR1. Цей замісник можна замінити різними гідрофобними замісниками, зокрема меншого розміру, щоб чіткіше співпадати з фармакофорною точкою.

Карбонітриловий замісник згідно результатів комп'ютерного моделювання не утворював ніяких взаємодій з активним центром протеїнкінази, тому його запропоновано прибрати з корової структури.

Для покращення взаємодії з аденін-зв'язувальною ділянкою АТФ-акцепторного сайту, потрібно синтезувати похідні сполуки з коротшими лінкерними ділянками. Це забезпечить зміщення ароматичного циклу, приєднаного до лінкеру, в аден-зв'язувальний сайт. При цьому потрібно ввести в цей ароматичний цикл гетероатоми та донорні і акцепторні групи, які потрібні для утворення водневих зв'язків з шарнірною ділянкою.

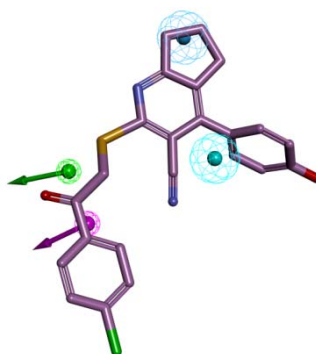


Рис. 5.11 Співставлення сполуки **5.16** з розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів протеїнкінази FGFR1. Кольорами позначено: блакитним – гідрофобну точку, синім – ароматичну ділянку, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Таким чином, за допомогою віртуального рецепторно-орієнтованого скринінгу та біохімічного тестування знайдено нові інгібітори протеїнкінази FGFR1 – 2-((2-(4-хлорофеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(4-гідроксифеніл)-6,7-дигідро-5H-циклопента[b]піридин-3-карбонітрил, 2,2'-(етан-1,2-діілбіс(сульфандиіл))біс(5-ацетил-6-метилнікотинонітрил) та 2-аміно-6-((2-(4-бутилфеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(тіофен-2-іл)піридин-3,5-карбонітрил. Всі три сполуки мали подібний механізм зв'язування з активним центром кінази – утворювали водневі зв'язки з шарнірною ділянкою FGFR1, гідрофобні взаємодії в аденін-зв'язувальній ділянці та водневі, електростатичні і гідрофобні взаємодії з ключовими амінокислотними залишками фосфат-зв'язувального регіону. Ці інгібітори можуть слугувати основою для розробки більш активних та селективних інгібіторів протеїнкінази FGFR1.

Основні наукові результати розділу опубліковані у статтях:

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.

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. Ярмолюк // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 32–37.

РОЗДІЛ 6

РОЗРОБКА ФАРМАКОФОРНОЇ МОДЕЛІ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 ТА ПОШУК НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ЦЬОГО ЕНЗИМУ

6.1 Розробка рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази СК2

Протеїнкіназа СК2 – плейотропна, убіквістична серин/треонінова протеїнкіназа, що залучена до великої кількості сигнальних шляхів у клітині, які регулюють процеси проліферації, виживання, апоптозу, синтезу тРНК, рРНК і клітинної трансформації [117]. СК2 бере участь у процесі туморогенезу за різними механізмами, відіграючи глобальну антиапоптичну роль, посилюючи резистентність до лікарських препаратів, підтримуючи неоваскуляризацію та активуючи шаперонову машинерію, що захищає онкокіном [118]. Надекспресія та надактивація СК2 пов'язані з виникненням різних видів раку людини, зокрема, раку легень [119], нирок [120], голови та шиї [121], простати [122], молочних залоз [123]. В свою чергу, пригнічення активності протеїнкінази СК2 за використання специфічних фармакологічних інгібіторів або сайленсингу гену каталітичної субодиниці, призводило до зниження життєздатності клітин множинної мієломи [124], гострої мієлоїдної лейкемії [125], Т-клітинної гострої лімфобластичної лейкемії [126] та В-клітинної хронічної лімфоцитної лейкемії [127]. Отже, протеїнкіназа СК2 є привабливою молекулярною мішенню в дослідженні раку зі значним терапевтичним потенціалом.

Порушення регуляції активності СК2 пов'язане також із виникненням запальних хвороб [128], болі [129] і вірусних інфекцій [130]. Таким чином, фармакологічне використання інгібіторів СК2 може знаходитися за межами онкології.

Зважаючи на потенційне терапевтичне значення інгібіторів СК2, низка академічних інститутів та фармацевтичних компаній залучені до розробки інгібіторів СК2. На сьогодні розроблено різноманітні стратегії модуляції активності протеїнкінази СК2 та синтезовано значну кількість високо-специфічних, селективних інгібіторів, що здатні проникати в клітину [131-141]. Більшість із них діють на АТФ-зв'язувальний сайт СК2 і належать до похідних флавононів (FNH79) [141], кумаринів (ellagic acid), полігалогенових бензімідазолів (ТВВ), антрахінонів (емодін), піразолотриазинів, індохіназолінів (ІQA) і нафтирідинів (СХ-4945, СХ-5011) [142].

Однак, лише один інгібітор СХ-4945 проходить клінічні випробування для лікування прогресуючих солідних пухлин та множинної мієломи [143]. Слід відмітити, що відомі інгібітори СК2, зокрема ті, що володіють високою активністю, мають дуже обмежену структурну різноманітність. Таким чином, розробка нових активних інгібіторів СК2, особливо з новими структурними корами, є необхідною та важливою для пошуку сполук, що можуть бути попередниками ліків, дія яких спрямована на модуляцію активності СК2.

На сьогодні для раціонального дизайну інгібіторів ензимів широко використовуються технології віртуального скринінгу. Однією з них є віртуальний скринінг із використанням фармакофорних моделей. Фармакофорні моделі застосовуються для швидкого скринінгу великих колекцій сполук *in silico* з метою пошуку нових низькомолекулярних інгібіторів. Використання підходів фармакофорного моделювання дозволяє значно прискорити та знизити вартість проектів, присвячених розробці біологічно активних сполук.

Для розробки фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази СК2 за основу було взято просторову структуру каталітичної субодиниці із інгібітором CDC7 з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (ID: 4ANM).

Трициклічний фрагмент інгібітора CDC7 утворює низку гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази СК2 (Val53, Ile66, Lys68, Val116, Met163 та Ile174). Pharmer ідентифікував ці взаємодії і згенерував три гідрофобні точки з центрами в

геометричних центрах ароматичних кілець інгібітора із стандартними радіусами 1 Å та одну гідрофобну точку на атомі Брому. Також Pharmer згенерував акцептор водневого зв'язку на кето-групі інгібітора, якому відповідає водневий зв'язок з Lys68 та донор водневого зв'язку на гідроксильній групі, якому відповідає водневий зв'язок з Asn161 (рис. 6.1).

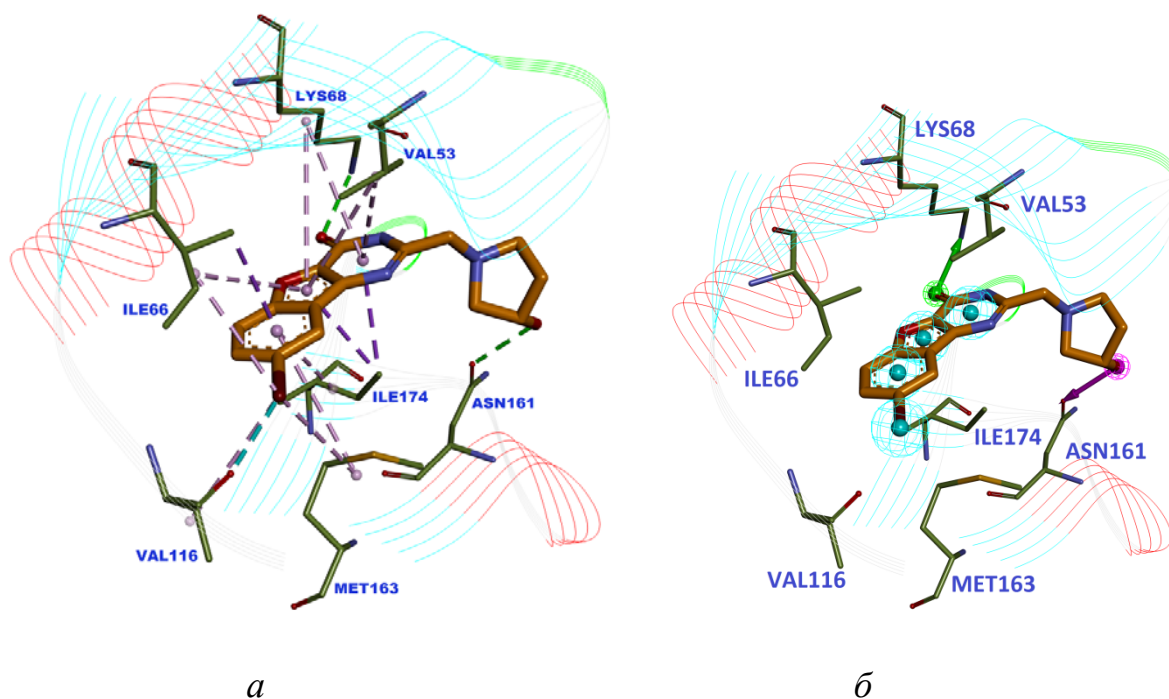


Рис. 6.1 *a* – взаємодії інгібітора CDC7 із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту СК2. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні. *б* – рецепторно-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази СК2, згенерована за допомогою програми Pharmer. Кольорами позначено: блакитним – гідрофобні точки, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донор водневого зв'язку

Першу гідрофобну точку, що знаходиться найближче до шарнірної ділянки протеїнкінази СК2, було змінено на ароматичну точку, відповідно до загальної абстрактної фармакофорної моделі, описаної в літературному огляді. Згідно цієї моделі в аденін-зв'язувальній ділянці повинна бути ароматична точка. Для неї було задано направлений вектор, перпендикулярний до площини циклу, так як

положення циклу в цій ділянці важливе для утворення гідрофобних взаємодій. Радіус був 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, відповідаючи менш важливим гідрофобним взаємодіям, зокрема з конформаційно-активним Lys68.

Донор і акцептор водневого зв'язку залишено без змін. Гідрофобну точку на атомі Брому було змінено на донор водневого зв'язку з вектором, направленим до кето-групи Val116. Наявність донору в цій позиції більш важлива, ніж гідрофобної точки. Атом Брому утворював галогеновий зв'язок із Val116, проте Pharmer не розпізнає такої взаємодії. Водночас водневий зв'язок більш сильніший, ніж галогеновий. Також присутність донора, чи акцептора водневого зв'язку, орієнтованого до шарнірного району є бажаною згідно з раніше проведеним нами дослідженням. Додатково було визначено ще один донор водневого зв'язку на атомі Нітрогену в піролідіновому циклі з направленням до карбоксильної групи Asp175. Цей амінокислотний залишок є каталітичним і консервативним. Також цей донор має хороше геометричне розташування – відстань між атомом Нітрогена інгібітора та Оксигеном карбоксильної групи амінокислоти становить 2.8 Å і ці атоми знаходяться практично один навпроти одного. Такі параметри сприяють утворенню міцного водневого зв'язку. Радіуси для донорів та акцептора водневого зв'язку становили 0.5 Å.

Додатково фармакофорну модель доповнено виключеними об'ємами. Було вибрано всі атоми Гідрогенів активного центру протейнікінази в радіусі 5 Å та згенеровано для них виключені об'єми. Важкі атоми не брали до уваги щоб не обтяжувати модель, оскільки кількість фармакофорних точок впливає на час обчислень при фармакофорному скринінгу. До того ж виключені об'єми на Гідрогенах практично повністю покривали активний центр ензиму. Такі виключені об'єми роблять модель значно точнішою – вони не дозволяють вибирати сполуки при скринінгу, що потенційно будуть перекриватися з амінокислотними залишками активного центру. Таким чином, відібрані сполуки будуть максимально відповідати по об'єму та формі АТФ-зв'язувальному центру.

Радіус виключених об'ємів був встановлений 1.2 Å, що відповідає Ван-дер-Ваальсовому радіусу атома Гідрогена. В результаті фармакофорна модель, яка була використана для скринінгу, містила шість фармакофорних точок – ароматичну та гідрофобну точки, три донори й один акцептор водневого зв'язку і 193 виключених об'ємів (рис. 6.2).

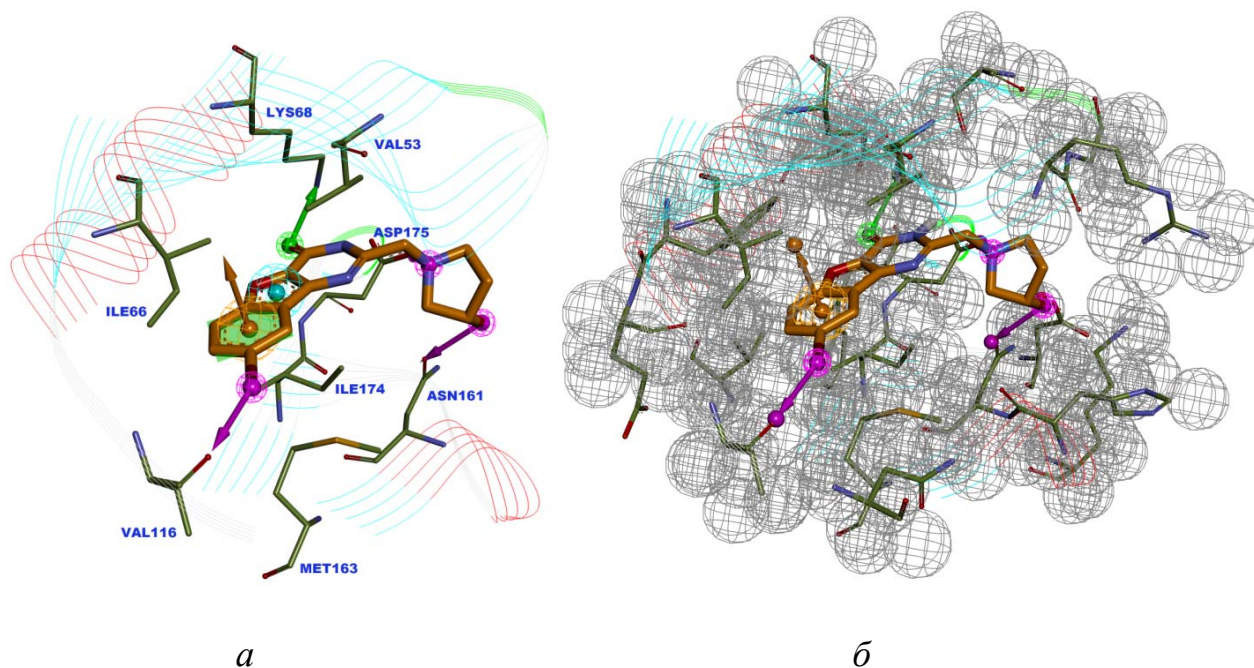


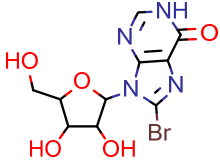
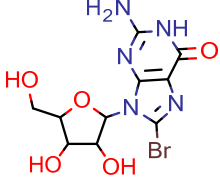
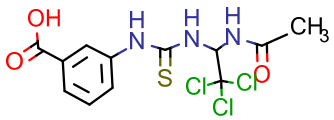
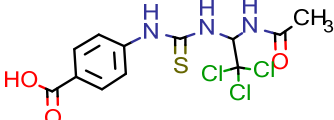
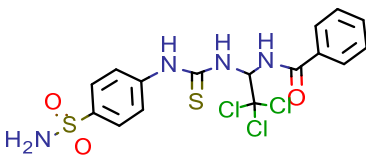
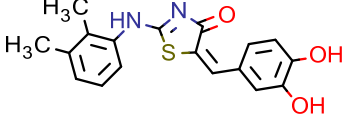
Рис. 6.2 *a* - рецепторно-орієнтована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази СК2, яка була використана для фармакофорного скринінгу. *б* – ця сама модель доповнена виключеними об'ємами

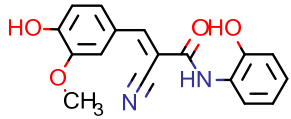
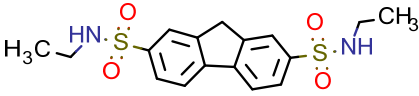
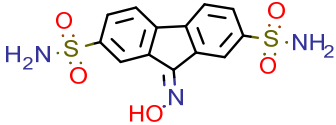
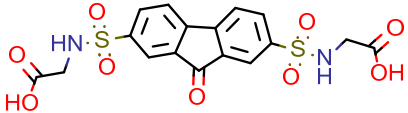
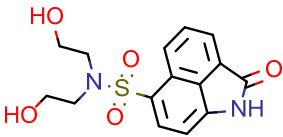
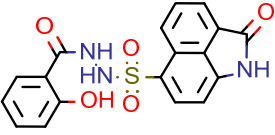
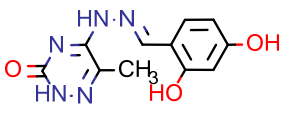
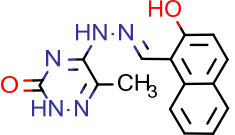
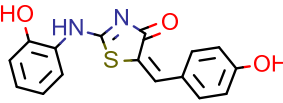
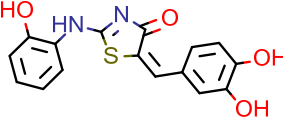
6.2 Фармакофорний скринінг, відбір та тестування сполук *in vitro*

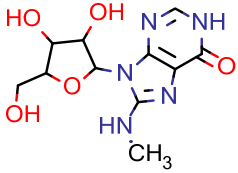
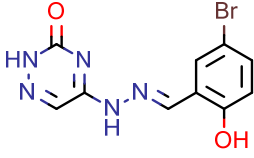
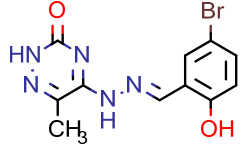
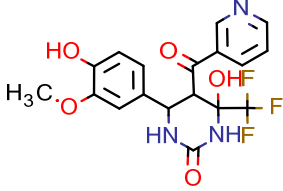
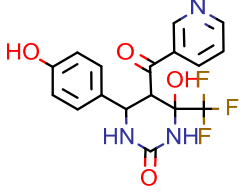
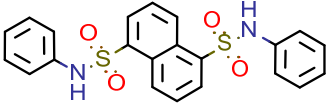
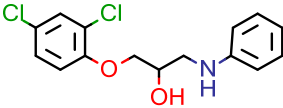
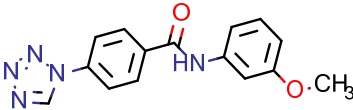
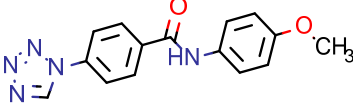
Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено фармакофорний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала майже 180000 молекул. Для кожної сполуки було згенеровано не більше 250 конформерів. Відповідно до значень середньоквадратичного відхилення (RMSD, Å) та візуального аналізу сполук за співпадінням із фармакофорною моделлю, було відібрано та протестовано *in vitro* 55 сполук (табл. 6.1).

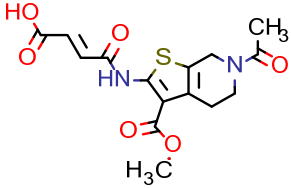
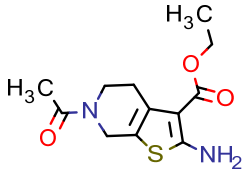
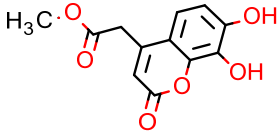
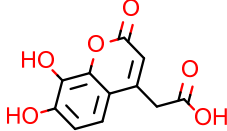
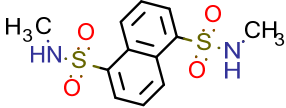
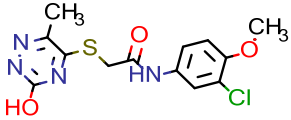
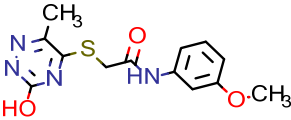
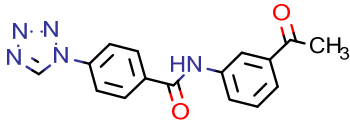
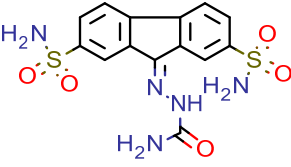
Таблиця 6.1

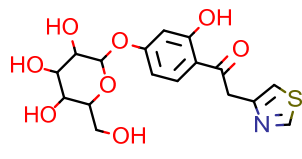
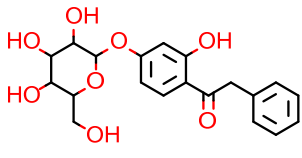
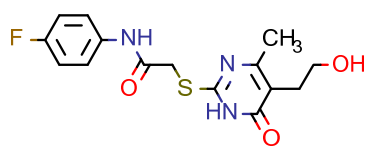
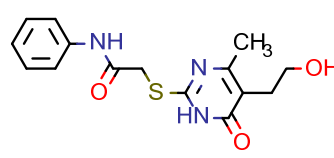
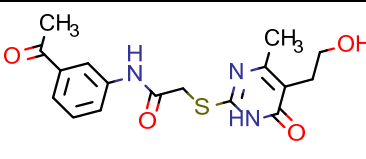
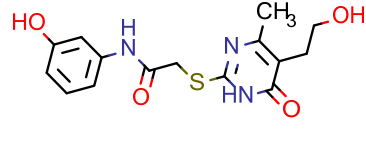
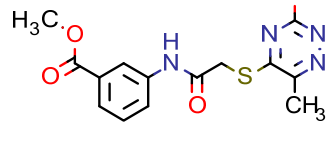
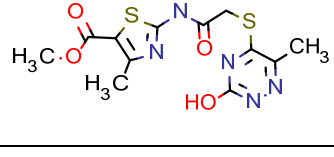
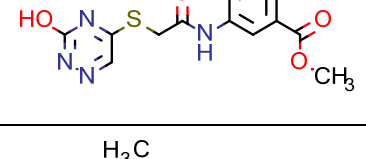
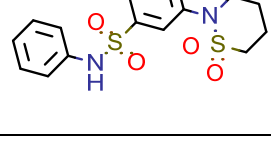
Хімічні структури сполук, відібраних в результаті фармакофорного скринінгу та їх активність по відношенню до протеїнкінази СК2

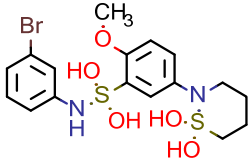
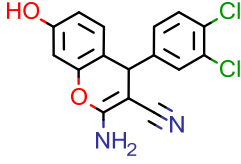
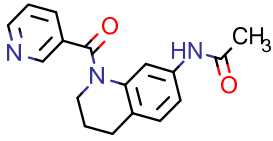
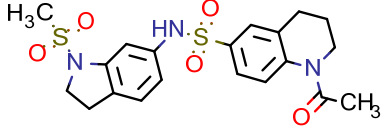
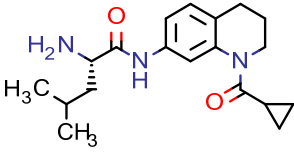
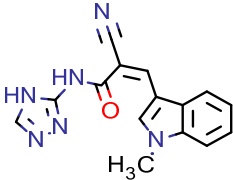
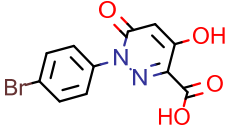
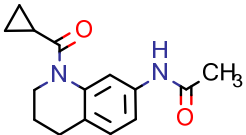
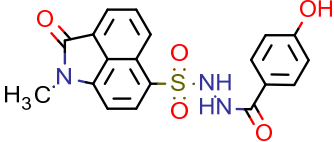
Сполука	Хімічна структура	Залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 33,3 μ M, %	IC ₅₀ , nM
6.1		105	
6.2		74	
6.3		80	
6.4		69	
6.5		77	
6.6		2	250

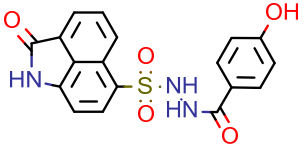
6.7		3	170
6.8		64	
6.9		68	
6.10		85	
6.11		67	
6.12		70	
6.13		71	
6.14		68	
6.15		3	150
6.16		2	150

6.17		74	
6.18		67	
6.19		68	
6.20		73	
6.21		77	
6.22		74	9100
6.23		76	
6.24		48	
6.25		46	

6.26		62	
6.27		59	
6.28		54	
6.29		49	
6.30		80	
6.31		79	
6.32		87	
6.33		58	
6.34		56	

6.35		75	
6.36		85	
6.37		79	
6.38		75	
6.39		99	
6.40		99	
6.41		125	
6.42		74	
6.43		98	
6.44		99	

6.45		116	
6.46		35	
6.47		101	
6.48		106	
6.49		97	
6.50		40	
6.51		92	
6.52		108	
6.53		88	

6.54		44	
------	---	----	--

Як видно з табл. 6.1, найактивніші сполуки **6.6**, **6.7**, **6.15** та **6.16** пригнічували активність протеїнкінази СК2 зі значеннями IC_{50} – 250, 170, 150 та 150 nM, відповідно. Сполуки **6.6**, **6.15**, **6.16** відносяться до нового класу інгібіторів СК2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-онів (рис. 6.3), сполука **6.7** до відомого класу – 2-ціано-N,3-дифенілпроп-2-єнамідів [144]. Графік розтитровування і визначення IC_{50} однієї з найбільш активних – сполуки **6.15**, приведений на рис. 6.4.

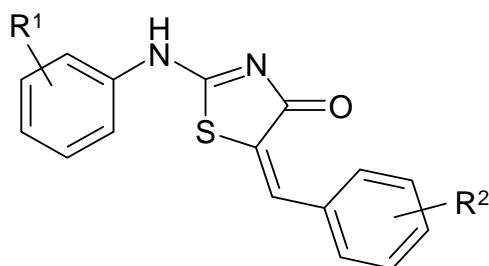


Рис. 6.3 Загальна хімічна структура похідних 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-ону

Сполуки **6.15** та **6.16** відрізнялися наявністю гідроксильної групи в мета-положенні на фенілметиліденовому заміснику. Як видно з результатів тестування, це не впливало на інгібувальну активність сполук. У сполуки **6.6** на феніламіновому фрагменті замість гідроксильної групи в орто-положенні були присутні два метильні замісники в орто- та мета-позиціях. Така структурна зміна викликала зменшення інгібувальної активності інгібітора. Це підкреслює важливість наявності донора водневого зв'язку в цьому положенні.

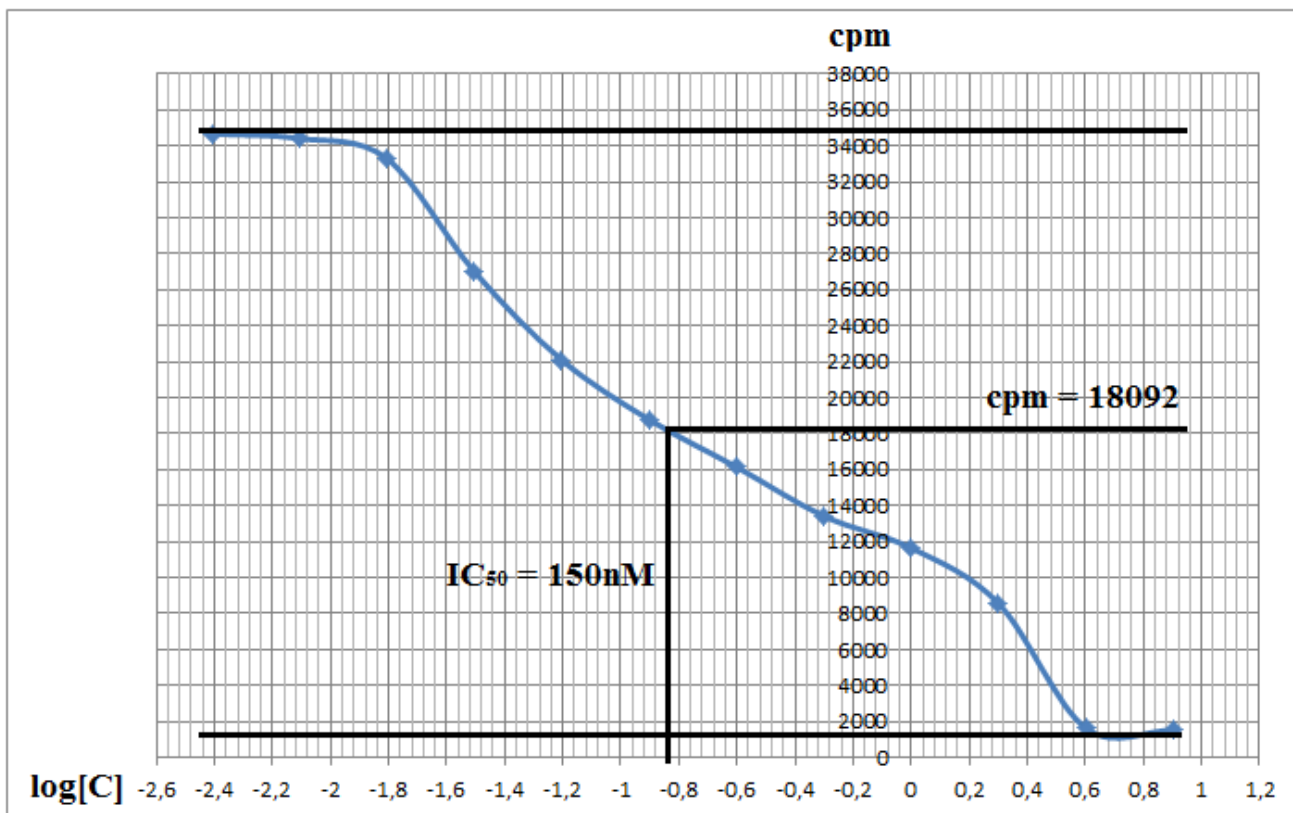


Рис. 6.4 Графік розтитровування і визначення IC_{50} однієї з найбільш активних – сполуки **6.15**

Згідно з результатами дослідження інгібувальної активності сполук по відношенню до СК2, у фармакофорній моделі може бути видалена гідрофобна точка, яка відповідає лінкерним фрагментам знайдених інгібіторів, що утворюють мало взаємодій із активним центром протеїнкінази. Крім того, до моделі може бути додано гідрофобну точку у гідрофобній кишені II, яка згідно з нашими дослідженнями, проведеними раніше, є важливою для прояву хорошої селективності інгібіторів протеїнкіназ. Слід зазначити, що згідно з даними комп'ютерного моделювання, всі знайдені в цій роботі активні сполуки утворювали гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками в гідрофобній кишені II. Положення гідрофобної точки можна встановити в геометричному центрі ароматичних циклів сполук **6.6**, **6.7**, **6.15**, **6.16**, що займали гідрофобну кишеню II (рис. 6.5).

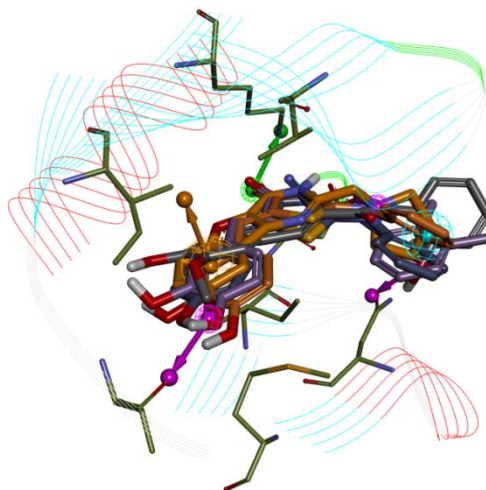


Рис. 6.5 Рекомендована фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази СК2, отримана із урахуванням даних біохімічного тестування

Таким чином, розроблено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель на основі комплексу протеїнкінази СК2 з інгібітором CDC7 та проведено фармакофорний скринінг, в результаті якого знайдено новий клас інгібіторів СК2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они. Отримана фармакофорна модель може бути використана для розробки нових високоактивних та селективних інгібіторів протеїнкінази СК2.

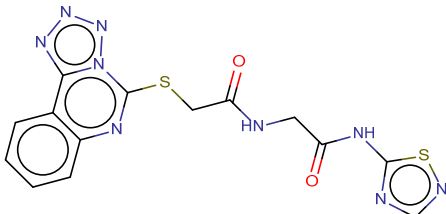
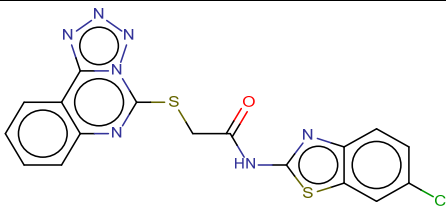
6.3 Розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2

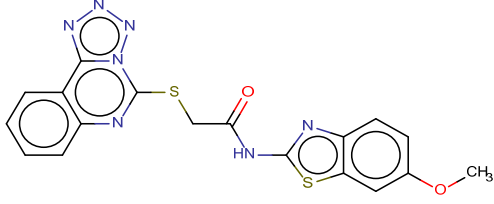
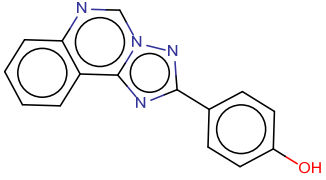
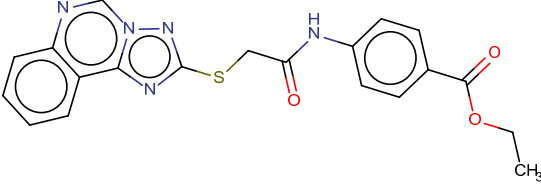
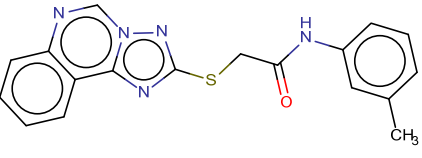
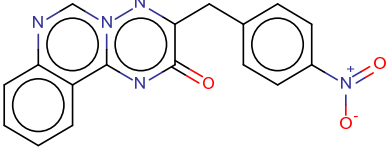
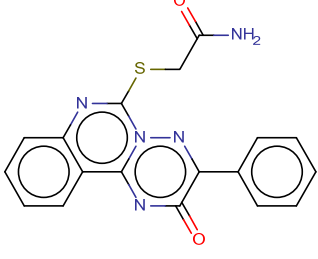
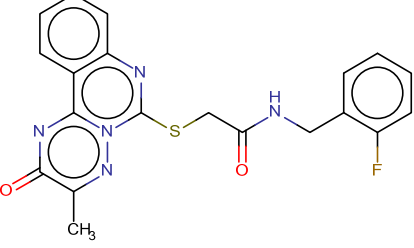
Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 був проведений молекулярний докінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала 1520 речовин. За допомогою програми Autodock розраховували енергії взаємодії (оціночний скор, не вільна енергія Гібса) із АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2. Для біохімічного тестування було відібрано 9 сполук із найкращими показниками енергій зв'язування із рецептором. Вибрані речовини належали до трьох хімічних класів – 2-([1,2,4]тріазоло[1,5-*c*]хіназолінів, 2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтіо)ацетамідів, 2*H*-[1,2,4]тріазино[2,3-*c*]хіназолін-2-онів.

Для цих сполук визначали їх інгібувальну здатність щодо СК2 *in vitro* при концентрації інгібіторів в реакційній суміші 33 μM . Активність проявили 2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтіо)ацетаміди та 2*H*-[1,2,4]тріазино[2,3-*c*]хіназолін-2-они. При інгібуванні СК2 сполукою **6.56**, залишкова активність кінази становила 3 %, сполукою **6.57** – 5 %, сполукою **6.61** – 20 %, сполукою **6.62** – 4 %. Для цих сполук побудовано титрувальні криві та визначено значення IC_{50} . 2*H*-[1,2,4]тріазино[2,3-*c*]хіназолін-2-они виявилися малоактивними – сполука **6.61** мала $\text{IC}_{50} = 33 \mu\text{M}$, а сполука **6.62** була неактивною. 2-(Тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтіо)ацетаміди були активними – сполука **6.56** мала $\text{IC}_{50} = 5,3 \mu\text{M}$, сполука **6.57** мала $\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{M}$ (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Результати біохімічного тестування

Сполука	Хімічна формула	Залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітору 33,3 μM , %	IC_{50} , μM
6.55		82	-
6.56		3	5,3

6.57		5	4,9
6.58		41	-
6.59		76	-
6.60		82	-
6.61		20	33,00
6.62		4	n/a
6.63		80	-

Ці сполуки є перспективними для подальшої оптимізації та 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 та запропоновано для них способи зв'язування з рецептором.

Сполука **6.56** утворювала зв'язки з ключовими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту СК2. 6-хлоро-1,3-бензотіазоловий замісник утворював гідروفобні взаємодії (π -алкіл, π - σ) з Leu45, Glu46, Val53. Тетразоло[1,5-*c*]хіназоліновий гетероцикл утворював гідروفобні взаємодії (π -алкіл, π - π) з Val66, Lys68, Phe113, Ile174, Ile95 та некласичний водневий зв'язок з Asp175 (між π -хмарою тетразолу та амідною групою амінокислотного залишку) (рис. 6.6).

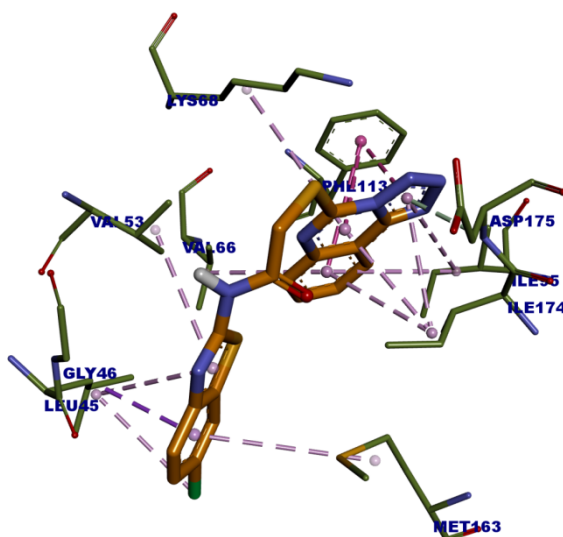


Рис. 6.6 Механізм зв'язування сполуки **6.56** з активним центром протеїнкінази СК2. Оливковими пунктирними лініями показано некласичні водневі зв'язки, фіолетовими – гідروفобні π - σ взаємодії, блідно-рожевими – гідروفобні π -алкіл взаємодії, рожевими – гідروفобні π - π взаємодії

Сполука **6.57** мала подібний до сполуки **6.56** механізм зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом СК2. Інгібітор зміщений в сторону шарнірної ділянки, з якою був водневий зв'язок між Оксигеном метокси-групи ліганду та аміногрупою

Asn118. Зникли π - π зв'язки між тетразоло[1,5-*c*]хіназоліновим гетероциклом та Phe113, з'явилися нові гідروفобні взаємодії з Lys68 та зв'язок між π -хмарою 6-метокси-1,3-бензотіазолового замісника та Сульфуром Met163. Ці зв'язки, зокрема водневий зв'язок з шарнірною ділянкою, вплинули на поліпшення активності сполуки **6.57** (рис. 6.7).

Таким чином, за допомогою віртуального рецепторно-орієнтованого скринінгу та біохімічного тестування знайдено нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтію)ацетамідів. Найактивніша сполука – N-(6-метоксibenзо[*d*]тіазол-2-іл)-2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтію)ацетамід мала $IC_{50} = 4,9 \mu M$. Ці інгібітори можуть слугувати основою для розробки більш активних та селективних інгібіторів протеїнкінази СК2.

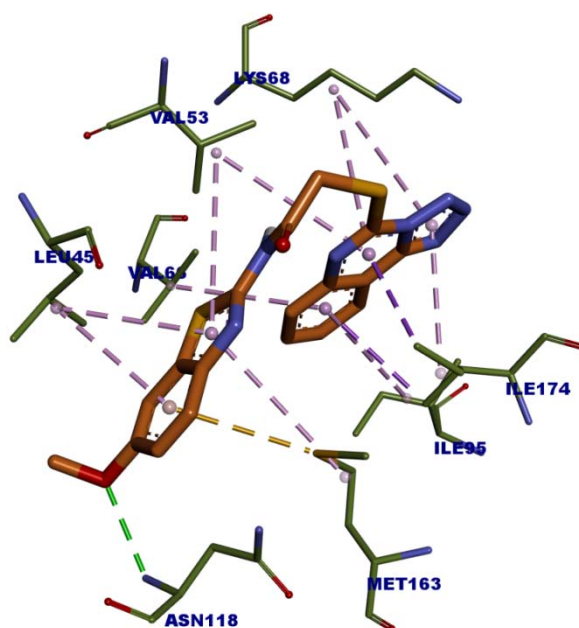


Рис. 6.7 Механізм зв'язування сполуки **6.57** з активним центром протеїнкінази СК2. Зеленими пунктирними лініями показано класичні водневі зв'язки, фіолетовими – гідروفобні π - π взаємодії, блідно-рожевими – гідروفобні π -алкіл взаємодії, жовтими – π -сульфідні-взаємодії

Для співставлення тетразоло[1,5-*c*]хіназолінів з розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів СК2 було зроблено суперпозицію комплексу

сполуки **6.57** в активному сайті каталітичної субодиниці протеїнкінази СК2, отриманого за допомогою молекулярного докінгу та комплексу протеїнкінази СК2 з інгібітором CDC7. Оскільки фармакофорна модель базувалась на CDC7, фармакофорні точки було побудовано в ручному режимі з використанням відповідних радіусів, використаних в моделі. В результаті отримано накладення фармакофорної моделі інгібіторів СК2 та сполуки **6.57** (рис. 6.8).

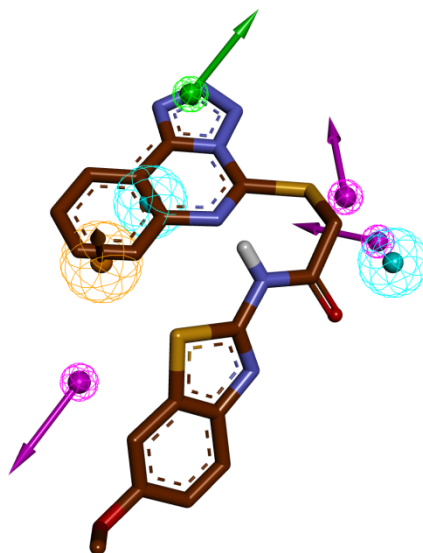


Рис. 6.8 Співставлення сполуки **6.57** з розробленою фармакофорною моделлю інгібіторів протеїнкінази СК2. Кольорами позначено: блакитним – гідрофобні точки, зеленим – акцептор водневого зв'язку, пурпуровим – донори водневого зв'язку, оранжевим – ароматичну точку

Співставлення показало, що сполука **5.57** співпадає з фармакофорною моделлю по трьох точках – тетразоло[1,5-с]хіназолінівий кор відповідає ароматичній і гідрофобній точкам та донору водневого зв'язку. Ці точки відповідають за афінність сполук до активного центру протеїнкінази.

Знайдені сполуки тетразоло[1,5-с]хіназолінів є сполуками-хітами і потребують подальшої оптимізації. Тому відповідно до співставлення із фармакофорною моделлю було запропоновано напрями хімічної оптимізації цього класу інгібіторів. А саме, для забезпечення зв'язування з шарнірною ділянкою протеїнкінази синтезувати похідні з галогеновими замісниками чи замісниками з донорними / акцепторними групами в різних положеннях

бензолового циклу тетраоло[1,5-с]хіназолінового кору. Для можливості взаємодії з гідрофобним карманом II АТФ-зв'язувального сайту СК2, запропоновано зменшити лінкерну ділянку до 1-2 зв'язків і синтезувати похідні переважно з гідрофобними замісниками в цьому положенні. Для взаємодії з гідрофобним карманом I, синтезувати похідні з гідрофобними замісниками в першому положенні тетраолу.

Основні наукові результати розділу опубліковані у статтях:

Похідні тетраоло[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.

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.

РОЗДІЛ 7

РОЗРОБКА АЛГОРИТМУ ОПТИМІЗАЦІЇ ФАРМАКОФОРНИХ МОДЕЛЕЙ І РЕСКОРИНГУ РЕЗУЛЬТАТІВ ФАРМАКОФОРНОГО СКРИНІНГУ

7.1 Підготовка вхідних даних для алгоритму

Опираючись на фармакофорну модель інгібіторів FGFR1 було розроблено новий підхід для пошуку інгібіторів протеїнкіназ з використанням Pharmer – алгоритм оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. Алгоритм реалізований на мові програмування Java, має графічний інтерфейс та систему розпаралелення роботи.

Для валідації різних етапів розробки алгоритму було взято відомі інгібітори протеїнкінази FGFR1 з бази ChEMBL (веб-сторінка: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) – всього 936 сполук. Їх розділено на дві групи. Перша – 312 активних сполук (IC_{50} до 200 nM) і 624 неактивних (IC_{50} більше 200 nM). Дана межа лише формально розділяла ліганди на активні та неактивні і її можна довільно змінювати. Було визначено три критерії якості фармакофорних моделей: кількість активних сполук знайдених при скринінгу, кількість правильно визначених в топі активних сполук і відношення кількості активних до загальної кількості знайдених сполук.

Ядром алгоритму є робота з вагами фармакофорних точок. Такі підходи застосовуються, наприклад, в програмах Accelrys Catalyst і Pharmagist. Вагу точок можна розрахувати при наявності набору активних сполук, щоб визначити скільки сполук вносять вклад в певну точку. Наша початкова модель ґрунтувалась лише на трьох комплексах рецептор-ліганд. Цього не достатньо, так як чим більше сполук, тим більша різниця між вагами фармакофорних точок, а це в свою чергу дає змогу визначити більш важливі точки для зв'язування лігандів з рецептором. Тому було розширено набір комплексів FGFR1 з її інгібіторами (IC_{50}

до 100 nM) до восьми (PDB ID: 4WUN, 4F64, 4F65, 2FGI, 3TT0, 3WJ6, 4NK9, 4NKS).

В програмі Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0 із комплексів було видалено молекули води та зроблено їх суперпозицію. Потім інгібітори та їх рецептори було збережено в окремі файли. Ліганди збережено у форматі .mol2, а рецептори збережено у форматі .pdb.

Первинні моделі для кожного комплексу були згенеровані за допомогою програми Pharmer.

7.2 Розробка модуля усереднення

Наступним кроком була розробка математичного апарату і програмного коду для модуля усереднення сукупності фармакофорних точок після суперпозиції та розрахунку ваг точок. Принцип роботи даного блока подібний до такого в програмі Pharmagist [66]. Якщо фармакофорні точки одного типу знаходяться на відстані меншій ніж певна задана гранична, то вони кластеризуються в одну точку. Далі кластери збираються в одну точку, якщо вони знаходяться теж ближче ніж певна гранична відстань. Процес – ітеративний: з кожною ітерацією кластери зливаються в більші, доки не сформується кінцеві фармакофорні точки.

Вага точки розраховується за формулою:

$$w(f_i) = \sum_i(m(f_i)) \quad (1),$$

де $w(f_i)$ – вага фармакофорної точки, $m(f_i)$ – кількість сполук з суперпозиції, що вносять вклад у точку.

Було сформовано такі параметри для усереднення: чотири граничні відстані в Å між точками різних типів (між ароматичними точками (1,2), між головами векторів донорів/акцепторів (0,8), між хвостами донорів/акцепторів/ароматики (0,8), між іншими точками (1,2)), три граничні

відстані для кластеризування (між кластерами ароматичних точок (0,9), кластерами векторів (0,9), кластерами інших точок (0,9)). Такі параметри за замовчуванням встановлені на основі нашого дослідження по розробці фармакофорної моделі інгібіторів ASK1, в якому однією із задач була параметризація програми Pharmagist. Іншим важливим параметром є мінімальна кількість точок, що можуть усереднюватися (за замовчуванням 2). Дані параметри можна змінювати під конкретні задачі.

В результаті роботи модуля усереднення було отримано початкову фармакофорну модель, що включила в себе дві ароматичні точки, одну гідрофобну, два акцептори водневого зв'язку та один донор. Ваги та радіуси фармакофорних точок приведені в табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Ваги та радіуси фармакофорних точок початкової моделі.

Точка	Вага	Радіус, Å
Don	5	0,5
Acc1	4	0,5
Acc2	7	0,5
Ar1	7	1,1
Ar2	7	1,1
Hyd1	3	1

З даної моделі, шляхом виключення деяких точок, було сформовано ще шість додаткових моделей (в тому числі і модель з нашого попереднього дослідження). Набір моделей дозволяє зробити якісну параметризацію алгоритму, тому всі подальші маніпуляції проводилися з використанням всіх моделей. Відпрацювання на одній моделі могло б дати налаштування алгоритму, що підходять лише для даної моделі і не коректні для інших. Також початкова модель

містила забагато точок для скринінгу невеликої валідаційної вибірки за допомогою Pharmer – програма знаходила мало лігандів і тому було не можливо адекватно дати оцінку роботі алгоритму.

Для всіх моделей використовувались різні набори радіусів фармакофорних точок (табл. 7.2). Для всіх моделей з різними наборами радіусів проведено початкові скринінги з використанням лише Pharmer і обраховано параметри оцінки якості моделей, описані раніше (табл. 7.3). За цими результатами було звужено коло використовуваних моделей для подальших маніпуляцій. Було взято лише моделі, які знаходили мінімум 50 активних сполук.

Таблиця 7.2

Набори радіусів фармакофорних точок, що застосовувалися при скринінгах.

	R, Å		
	D/A	Ar	H
1	0,5	1,1	1
2	0,7	1,3	1,2
3	0,9	1,5	1,4
4	1,1	1,6	1,6
5	1,2	1,6	1,6
6	1,3	1,6	1,6
7	1,4	1,6	1,6

Таблиця 7.3

Результати початкового скринінгу для різних фармакофорних моделей інгібіторів FGFR1 з використанням різних наборів радіусів

Модель	ArArHDAA			ArArHAA		
	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених
1	1	1	100	9	7	71
2	4	4	100	71	30	73
3	7	6	83	126	51	43
4	12	9	89	166	71	45
5	11	8	88	163	71	45
6	15	11	73	162	70	46
7	18	12	75	199	90	41
ArArHDA				ArHDAА		
Модель	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених
1	2	2	100	1	1	100
2	5	4	100	3	3	100
3	14	12	83	7	5	80
4	29	18	67	11	8	75
5	33	21	62	19	11	64
6	34	21	62	25	13	69
7	36	22	59	39	15	47

Продовж. табл. 7.3

Модель	ArHAA			ArHDA		
	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених
1	76	29	31	12	7	43
2	143	57	46	39	21	52
3	211	85	47	75	35	51
4	256	107	38	105	50	50
5	283	120	37	115	53	47
6	315	128	38	136	58	47
7	341	135	37	145	63	46

ArHDA			
Модель	Загальна кількість сполук	Кількість активних сполук	% активних сполук, коректно передбачених
1	100	42	49
2	133	55	44
3	156	69	48
4	199	85	39
5	231	89	38
6	264	98	40
7	280	105	40

Примітки:

1. Нумерація моделей відповідно до використаних наборів радіусів, приведених у табл. 7.2.
2. Сірим кольором виділені моделі, що знайшли при скринінгу більше 50 активних сполук з валідаційної вибірки

7.3 Розробка модуля вагового рескорингу

Далі було розроблено модуль вагового рескорингу. Під час скринінгу за допомогою програми Pharmer ліганди представляються у вигляді набору фармакофорних точок, що прирівнюються до фармакофорної моделі і при цьому обраховується RMSD між фармакофорними точками сполуки і моделлю. Ми розробили власну скорингову функцію на основі ваг фармакофорних точок.

Модуль вагового рескорингу автоматично проводить фармакофорний скринінг з використанням Pharmer, вибирає з результатів конформери сполук з найменшими значеннями RMSD і кожен ліганд представляє у вигляді набору фармакофорних точок. Далі відбувається формування і аналіз комплексів фармакофорних точок лігандів та моделі.

Для кожної пари фармакофорних точок ліганду і моделі, що співпали, обраховується частковий скор, що є добутком скору за замовчуванням (для кожного типу точок власний скор) та ваги точки. При розрахунку часткового скору враховується ступінь перекриття фармакофорних точок ліганду та моделі – чим більше перекриття, тим більше значення скору. Часткові скорі сумуються, утворюючи кінцевий скор. Формула розрахунку кінцевого скору:

$$S = \sum_i w(f_i) * S_{def}(f_i) * \frac{(t-d)}{t} \quad (2),$$

де S – кінцевий 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 та моделі, що співпали.

Для відлаштування роботи модуля вагового рескорингу було проведено ряд скринінгів відносно відібраних моделей, в тому числі і з виключеними об'ємами (генерувалися аналогічно до звичайних точок на атомах гідрогенів амінокислотних залишків активних центрів протеїнкінази FGFR1 з досліджуваних кристалів в радіусі 5 Å від лігандів, важкі атоми для цього не залучалися, щоб не обтяжувати модель). Додатково застосовували ваги фармакофорних точок, що

обраховувались за формулою $w(f_i) = \sum_i \sqrt{m(f_i)}$ (3). В різних випадках це давало кращі результати. Кінцеві результати вагового рескорингу приведені в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Ваговий рескоринг результатів початкового скринінгу із використанням молекулярних дескрипторів та без для різних фармакофорних моделей інгібіторів FGFR1

Модель	Ваговий рескоринг		Ваговий рескоринг + Дескриптори	
	\sqrt{w}	W	\sqrt{w}	w
ArArHAA-3	49	49	53	53
ArArHAA-4	46	44	45	48
ArArHAA-5	51	49	48	49
ArArHAA-6	49	49	49	50
ArArHAA-7	48	49	50	50
ArHAA-2	49	49	51	51
ArHAA-3	38	39	51	49
ArHAA-4	44	42	52	51
ArHAA-5	44	43	53	51
ArHAA-6	42	39	54	50
ArHAA-7	41	37	54	50
ArHDA-4	58	58	60	58
ArHDA-5	53	53	55	53
ArHDA-6	50	50	50	52
ArHDA-7	49	52	51	51

Продовж. табл. 7.4

ArHDA-2	45	45	55	55
ArHDA-3	39	39	57	54
ArHDA-4	38	38	51	58
ArHDA-5	39	39	52	54
ArHDA-6	40	41	45	47
ArHDA-7	39	43	50	50

Примітки:

1. Нумерація моделей відповідно до наборів радіусів фармакофорних точок, приведених в табл. 7.2.
2. Приведені кількості правильно знайдених активних сполук валідаційної вибірки у відсотках.
3. Світло-сірим кольором показані кращі результати для певної моделі при ваговому рескорингу, темно-сірим – при ваговому рескорингу з використанням молекулярних дескрипторів.
4. w – застосування звичайних вагів, \sqrt{w} – застосування квадратних коренів вагів.

В окремих випадках процент правильно знайдених активних сполук збільшився на 7 - 8%, кращий становив – 58%. На цьому етапі було підібрано скори за замовчуванням для різних типів фармакофорних точок: для ароматичної точки – 3.5, для гідрофобної точки – 3, для донорів / акцепторів водневого зв'язку – 2, для зарядженої точки – 1, для співпадіння ароматика->гідрофобна точка – 0,5, для виключеного об'єму – -1.

7.4 Розробка модуля рескорингу на основі молекулярних дескрипторів

Додатково розроблено модуль рескорингу з використанням молекулярних дескрипторів, розрахованих для лігандів. Даний блок працює вже з результатами, переданими модулем вагового рескорингу – він розраховує коефіцієнт, на який множиться кінцевий скор. Дескриптори (кількість атомів, кількість зв'язків різних типів, молекулярна вага, кількість донорів та акцепторів водневого зв'язку, $\log P$, кількість галогенів, топологічна площа полярної поверхні (TPSA), молекулярна рефракція) розраховуються автоматично при роботі модуля конвертування бази для скринінгу чи валідаційної вибірки. Для подальшої роботи алгоритм не використовує дескриптори для яких відношення між середніми значеннями дескриптора активних і неактивних лігандів валідаційної вибірки становить більше 0,9, тобто відрізняється менше ніж на 10%. Для груп активних і неактивних лігандів окремо визначаються відношення середніх відхилень до середніх значень кожного дескриптора. Якщо таке відношення для конкретного дескриптора більше для активних лігандів, то далі використовуються їх параметри – середнє відхилення, середнє значення та додатній корегувальний коефіцієнт, якщо для неактивних – то їх параметри з від'ємним корегувальним коефіцієнтом. Даний коефіцієнт розраховується за формулою:

$$k(d) = \pm \frac{1 - \frac{dev(d)}{aver(d)}}{\sum_i 1 - \frac{dev(i)}{aver(i)}} \quad (4), \text{ де}$$

$k(d)$ – корегувальний коефіцієнт конкретного дескриптора, $dev(d)$ - його середнє відхилення, $aver(d)$ - його середнє значення, $dev(i)$ та $aver(i)$ - середнє відхилення та середнє значення і-того дескриптора.

В результаті створюється таблиця параметрів, в якій для кожного дескриптора внесені його середнє відхилення, середнє значення та корегувальний коефіцієнт.

Схема розрахунку коефіцієнту, на який буде помножений ваговий скор, виглядає таким чином:

1. $K = 1$;
2. $descr(i) > aver(i) - dev(i) \wedge descr(i) < aver(i) + dev(i) \Rightarrow K := K + k(i) * 3$ (5);
3. $descr(i) \leq aver(i) - dev(i) \vee descr(i) \geq aver(i) + dev(i) \Rightarrow K := K - k(i)$ (6), де K - коефіцієнт, на який буде помножений ваговий скор, $descr(i)$ – значення і-того дескриптора досліджуваного ліганду, $aver(i)$ – середнє значення даного дескриптору, взяте з таблиці параметрів, $dev(i)$ – середнє відхилення даного дескриптору, взяте з таблиці параметрів, $k(i)$ – корегувальний коефіцієнт даного дескриптору, взятий з таблиці параметрів.

Результати рескорингу з використанням молекулярних дескрипторів показані в табл. 7.4.

7.5 Розробка модуля оптимізації радіусів, вагів та скорингів за замовчуванням фармакофорних точок

З результатів представлених в табл. 7.3 і 7.4 помітно, що радіуси фармакофорних точок та їх ваги сильно впливають на якісні параметри моделей, причому без чітких закономірностей. Максимально якісну модель можна визначити лише перевіривши всю множину моделей з індивідуальними радіусами для кожної фармакофорної точки (мінюють в заданих межах), а також з різними вагами. Тому було розроблено оптимізатор радіусів фармакофорних точок в моделі, а також оптимізатор ваг фармакофорних точок та скорів за замовчуванням для них.

В оптимізаторі радіусів на основі радіусів первинної фармакофорної моделі створюється матриця $m \times n$, де m – кількість згенерованих моделей, n – радіуси фармакофорних точок. Для генерування матриці задається кількість кроків зміни для кожного радіусу, та величина на яку змінюється радіус за один крок. Кількість згенерованих моделей становить $m = f^n$ (7), де f – кількість кроків, n – кількість радіусів. Для прикладу, матриця згенерована для

фармакофорної моделі, що складалася з трьох точок, з кількістю кроків – 2 та величиною зміни Δ , мала вигляд:

	r1	r2	r3
m1	r1 ₀	r2 ₀	r3 ₀
m2	r1 ₀	r2 ₀	r3 ₀ + Δ
m3	r1 ₀	r2 ₀ + Δ	r3 ₀
m4	r1 ₀	r2 ₀ + Δ	r3 ₀ + Δ
m5	r1 ₀ + Δ	r2 ₀	r3 ₀
m6	r1 ₀ + Δ	r2 ₀	r3 ₀ + Δ
m7	r1 ₀ + Δ	r2 ₀ + Δ	r3 ₀
m8	r1 ₀ + Δ	r2 ₀ + Δ	r3 ₀ + Δ

Далі створюються моделі з використанням згенерованих наборів радіусів для їх фармакофорних точок, проводиться фармакофорний скринінг валідаційної вибірки сполук відносно цих моделей та розраховуються якісні параметри для їх оцінки. На основі цих параметрів формується оціночний загальний скор:

$$q = \frac{a}{a_{max}} + \frac{a/all}{(a/all)_{max}} + \frac{a_r/a}{(a_r/a)_{max}} \quad (8), \text{ де}$$

a – кількість активних сполук з валідаційної вибірки, знайдених під час скринінгу відносно даної моделі, a_{max} – максимальна кількість активних сполук з валідаційної вибірки, знайдених під час скринінгів відносно усіх згенерованих моделей, a/all – відношення кількості активних сполук, знайдених під час скринінгу валідаційної вибірки відносно даної моделі до загальної кількості (активних і неактивних) сполук знайдених при скринінгу, $(a/all)_{max}$ – максимальне відношення кількості активних сполук, знайдених під час скринінгів валідаційної вибірки відносно усіх моделей до загальної кількості (активних і неактивних) сполук знайдених при скринінгах, a_r/a – відношення правильно знайдених активних сполук з валідаційної вибірки під час скринінгу відносно даної моделі до загальної кількості активних сполук, знайдених при скринінгу,

$(a_r/a)_{max}$ – максимальне відношення правильно знайдених активних сполук з валідаційної вибірки до загальної кількості активних сполук, знайдених під час скринінгів відносно усіх згенерованих моделей.

За даним скором моделі сортуються і вибирається краща модель з найбільшим значенням скору, що дозволяє врахувати всі параметри якісної оцінки моделі.

Оптимізатор ваг фармакофорних точок та скорів за замовчуванням для них працює за подібним принципом до оптимізатора радіусів, тільки генерується матриця скорів за замовчуванням для фармакофорних точок. Дані набори скорів за замовчуванням застосовуються до кращих моделей з оптимізованими радіусами фармакофорних точок (кількість моделей можна обирати в ручному режимі). Крім цього застосовуються різні ваги точок відповідно до модифікованої формули (3):

$$w(f_i) = \sum_i \sqrt[n]{m(f_i)} \quad (9),$$

де n – значення від 1 до 6.

Відносно моделей з усіма можливими комбінаціями ваг фармакофорних точок і скорів за замовчуванням для них проводяться скринінги і визначається модель, що знайшла найбільше активних сполук валідаційної вибірки, правильно визначених (ті, які розміщуються в топі згідно вагового рескорингу).

Загальна схема роботи алгоритму представлена на рис. 7.1. Вона складається з трьох основних етапів. Підготовка вхідних даних включає генерування конформерів валідаційної вибірки і скринінгової бази сполук, конвертування їх, генерування молекулярних дескрипторів для цих баз, формування таблиці параметрів дескрипторів, і створення не оптимізованої фармакофорної моделі. Оптимізація фармакофорної моделі включає оптимізацію радіусів фармакофорних точок, їх вагів та скорів за замовчуванням. Скринінг і рескоринг результатів на третьому етапі відбувається у відповідних модулях.



Рис. 7.1 Загальна схема роботи алгоритму

7.6 Валідація алгоритму

В якості контрольного експерименту було проведено повні цикли оптимізацій для розроблених нами фармакофорних моделей інгібіторів СК2 та FGFR1, скринінги валідаційних вибірок відносно них і рескринг результатів.

7.6.1 Валідація алгоритму на основі фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1

Валідаційну вибірку для FGFR1, що включала 936 сполук, було поділено випадковим чином на дві частини. Кількість активних сполук в обох частинах

була рівною. Одна частина використана в якості навчальної вибірки, інша як тестова вибірка. Далі було проведено скринінг тестової вибірки відносно не оптимізованої та оптимізованої фармакофорних моделей.

Оригінальна не оптимізована модель інгібіторів FGFR1 знаходила при скринінгу 50 сполук з валідаційної вибірки, з них активних було 21 і відсоток правильно знайдених активних становив 38%. Оптимізована модель знаходила 98 сполук, з них активних – 43, відсоток правильно знайдених активних становив 60%. Оптимізовані ваги фармакофорних точок та радіуси моделі приведені в табл. 7.5. Оптимізовані скорі за замовчуванням для фармакофорних точок були: для ароматичних точок – 3,7, для гідрофобних – 3,0, для донорів / акцепторів водневого зв'язку – 2,0, для ароматика->гідрофобна точка – 0,7.

Суперпозиція комплексів FGFR1 з інгібіторами, не оптимізована та оптимізована моделі інгібіторів FGFR1 показані на рис. 7.2.

На основі результатів обох скринінгів було пораховано коефіцієнти Метьюса. При скринінгу відносно не оптимізованої моделі коефіцієнт Метьюса становив 0,47, відносно оптимізованої моделі – 0,55. Це вказує на збільшення точності фармакофорної моделі при оптимізації.

Таблиця 7.5

Оптимізовані ваги фармакофорних точок та радіуси фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1

Точка	Вага	Радіус, Å
Don	2,2361	0,9
Acc	2,6458	0,9
Ar	2,6458	1,7
Hyd	1,7321	1,5

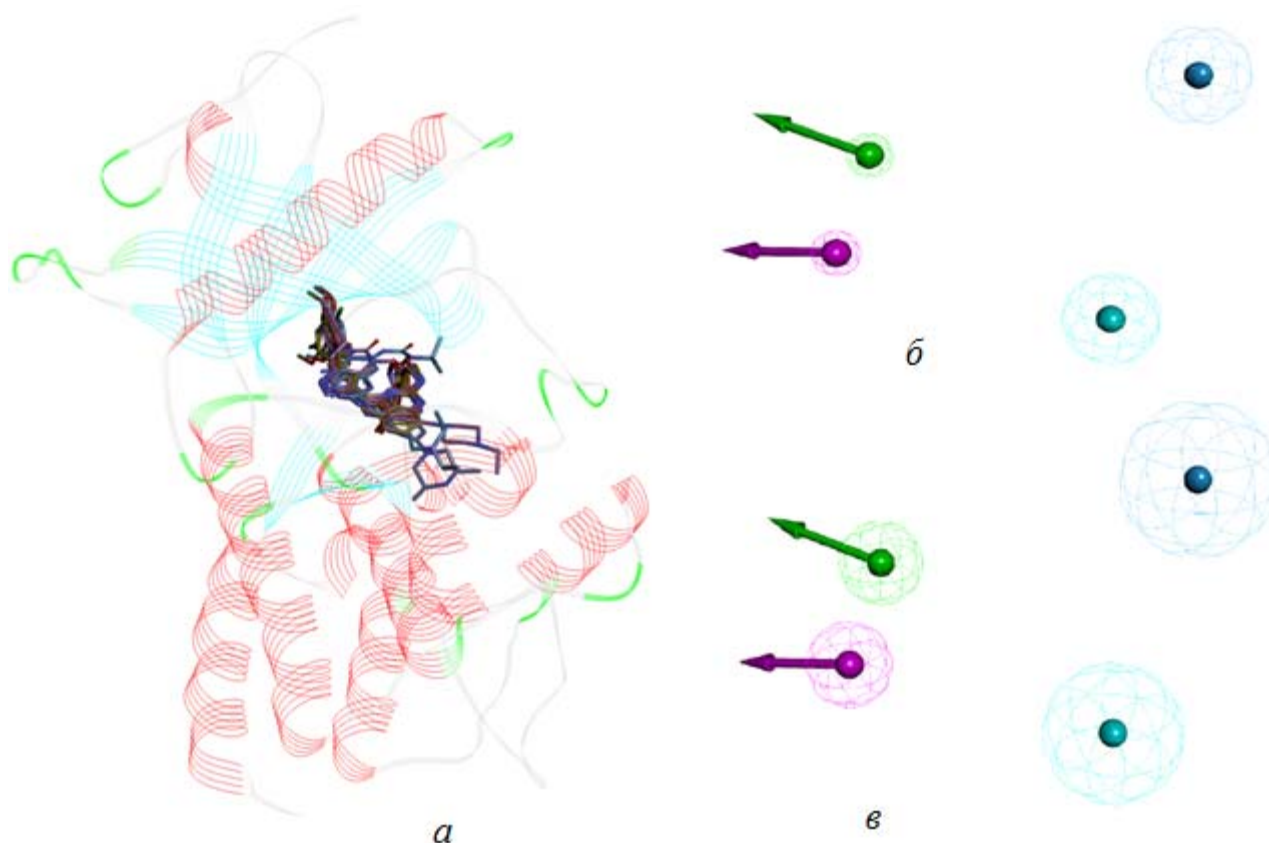


Рис. 7.2 Суперпозиція комплексів FGFR1 з інгібіторами (а), не оптимізована (б) та оптимізована (в) моделі інгібіторів FGFR1. Донори водневого зв'язку позначені пурпуровими векторами, акцептори – зеленими векторами, ароматичні точки – синіми точками, гідрофобні точки – блакитними точками

Також було пораховано Z-скорі. Результати скринінгу були представлені в різних одиницях: для не оптимізованої моделі в RMSD, для оптимізованої моделі у власному скорі алгоритму. Тому щоб дані можна було порівнювати, Z-скорі були представлені у відсотках. Для RMSD мінімальне значення приймалось за 100%, всі інші значення приймались у відсотках відносно нього. Для скорі алгоритму за 100% приймалось максимальне значення, всі інші значення приймались у відсотках відносно нього.

Таким чином при скринінгу відносно не оптимізованої моделі Z-скорі для активних сполук були в межах від 100 до -3,31 і середнє значення становило 1,21,

для неактивних сполук значення були відповідно в межах від 65,4 до -3,31 і середнє значення становило -0,61.

При скринінгу відносно оптимізованої моделі Z-скори для активних сполук були в межах від 100 до -8,49 і середнє значення становило 4,43, для неактивних сполук значення були відповідно в межах від 83,44 до -8,49 і середнє значення становило -2,22.

Це показує, що скори активних сполук при скринінгу відносно оптимізованої фармакофорної моделі мали більше позитивне відхилення від середнього значення всієї вибірки, а також, що скори неактивних сполук мали більше негативне відхилення від середнього значення всієї вибірки, і тому оптимізована модель здатна краще передбачати активні сполуки.

7.6.2 Валідація алгоритму на основі фармакофорної моделі інгібіторів СК2

Для валідаційної вибірки для протеїнкінази СК2 було взято відомі інгібітори СК2 з бази ChEMBL – 1091 сполук. Серед них – 194 активних сполук (IC_{50} до 200 nM) і 897 неактивних (IC_{50} більше 200 nM). Аналогічно до вибірки FGFR1, дану вибірку теж розділили навпіл і використали одну частину для оптимізації фармакофорної моделі СК2, а іншу для скринінгу відносно не оптимізованої та оптимізованих моделей СК2.

Оригінальна модель інгібіторів СК2 містила 6 фармакофорних точок. Для розрахунку ваг фармакофорних точок було взято 14 комплексів протеїнкінази СК2 з її інгібіторами (PDB ID: 3AT4, 3E3B, 3MB6, 3MB7, 3PE1, 3PE2, 3R0T, 3U4U, 4GRB, 4KWP, 4UB7, 2ZJW, 3AT3, 4ANM). Ваги і радіуси фармакофорно моделі приведені в табл. 7.6.

Скринінг валідаційної вибірки відносно цієї моделі не дав результатів, тому було видалено два донори водневого зв'язку в гідрофобному кармані II, так як дані фармакофорні точки мали найменші ваги. Новий скринінг дозволив знайти 22 сполуки з валідаційної вибірки, з них активних було 12 і відсоток правильно знайдених активних становив 58%. Після оптимізації модель знаходила 59 сполук, з них активних – 39, відсоток правильно знайдених активних становив 74%. При

оптимізації ваги фармакофорних точок залишились без змін. Оптимізовані радіуси моделі приведені в табл. 7.6. Оптимізовані скори за замовчуванням фармакофорних точок були: для ароматичних точок – 2,9, для гідрофобних – 2,4, для донорів / акцепторів водневого зв'язку – 1,4, для ароматика->гідрофобна точка – 1,1.

Суперпозиція комплексів СК2 з інгібіторами, не оптимізована та оптимізована моделі інгібіторів СК2 показані на рисунку 7.3.

Таблиця 7.6

Оптимізовані і не оптимізовані ваги фармакофорних точок та радіуси фармакофорної моделі інгібіторів СК2

Точка	Вага	Радіус (не оптимізований), Å	Радіус (оптимізований), Å
Don	11	0,5	1
Acc	13	0,5	0,5
Ar	14	1,1	1,6
Hyd	13	1	1

На основі результатів обох скринінгів було пораховано коефіцієнти Метьюса. При скринінгу відносно не оптимізованої моделі коефіцієнт Метьюса становив 0,57, відносно оптимізованої моделі – 0,72. Це вказувало на суттєве збільшення точності фармакофорної моделі при оптимізації.

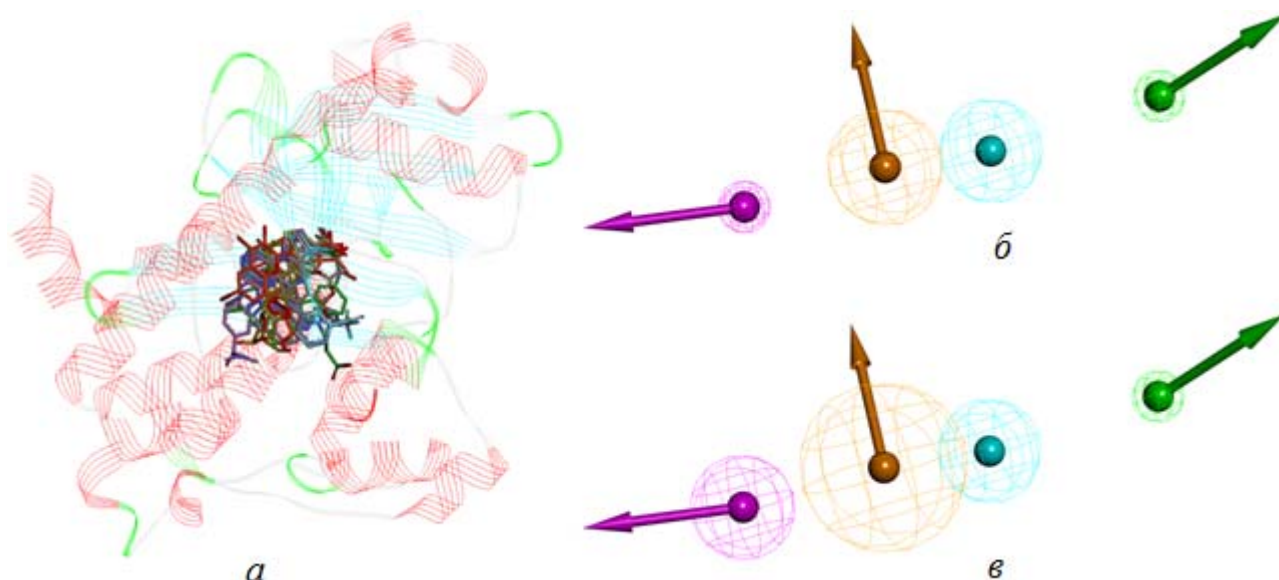


Рис. 7.3 Суперпозиція комплексів СК2 з інгібіторами (*a*), не оптимізована (*б*) та оптимізована (*в*) фармакофорні моделі інгібіторів СК2. Донори водневого зв'язку позначені пурпуровими векторами, акцептори – зеленими векторами, ароматичні точки – помаранчевими векторами, гідрофобні точки – блакитними точками

Також було пораховано *Z*-скорі по аналогічній схемі, як і для FGFR1. Таким чином при скринінгу відносно не оптимізованої моделі СК2 *Z*-скорі для активних сполук були в межах від 100 до -1,83 і середнє значення становило 4,34, для неактивних сполук значення були відповідно в межах від 77,06 до -1,83 і середнє значення становило -0,94.

При скринінгу відносно оптимізованої моделі *Z*-скорі для активних сполук були в межах від 65,36 до -3,57 і середнє значення становило 9,85, для неактивних сполук значення були відповідно в межах від 100 до -3,57 і середнє значення становило -2,13. Це вказувало, що скорі активних сполук при скринінгу відносно оптимізованої фармакофорної моделі мали більше позитивне відхилення від середнього значення всієї вибірки, а також, що скорі неактивних сполук мали

більше негативне відхилення від середнього значення всієї вибірки, і тому оптимізована модель здатна краще передбачати активні сполуки.

Основні наукові результати розділу опубліковані у статті та авторському свідоцтві:

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.

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.

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ

У результаті виконання дисертаційної роботи побудовано фармакофорні моделі для інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2, знайдено нові класи інгібіторів до цих ензимів та розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу.

За допомогою програми Pharmagist було згенеровано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель протеїнкінази ASK1, що з високою точністю передбачала активність сполук у колекції з 106529 лігандів. Зокрема, в результаті фармакофорного скринінгу, було виявлено, що 15 високо активних сполук із трьох хімічних класів потрапили в топ 0,5% сполук із найвищим скором. Серед них були похідні N-{імідазо[1,2-а]піридин-2-іл}бензаміду, N-{[1,2,4]триазоло[1,5-а]піридин-2-іл}бензаміду і 3-(піридин-3-іл)-1H-піроло[2,3-b]піридину. Похідне 3-(тіофен-2-іл)-1H-пірол-о[2,3-b]піридину потрапило в 1% сполук із найвищим скором. Кореляційний коефіцієнт Метьюса для валідації моделі становив 0,67.

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.

Для пошуку нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1 було використано комбінацію методів комп'ютерного моделювання та тестування *in vitro*. Пакет програм DOCK використовували для проведення напівгнучкого докінгу бібліотеки, що налічувала близько 270000 органічних сполук в АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази ASK1. У результаті докінгу з наступною візуалізацією комплексів сполук із 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-Хлоро-феніл)-4-(фуран-2-карбоніл)-3-гідрокси-1-(6-метокси-бензотіазол-2-іл)-1,5-дигідро-пірол-2-он інгібувала ASK1 зі значенням $IC_{50} = 4,2$ μ M. Для того щоб дослідити залежність активності сполук цього класу від їх хімічної структури було синтезовано та тестовано 33 похідних 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-ону. Найбільш активні сполуки мали субмікромолярну інгібувальну активність по відношенню до протеїнкінази ASK1. Знайдений клас інгібіторів протеїнкінази ASK1 узгоджується із розробленою фармакофорною моделлю. Ці інгібітори можуть застосовуватися для подальшого вивчення ASK1 та розробки фармацевтичних препаратів для терапії низки захворювань, пов'язаних із порушеннями функціонування цієї кінази.

За допомогою програми Pharmer було розроблено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель протеїнкінази FGFR1 та проведено фармакофорний скринінг відносно неї, в результаті якого знайдено два нові класи інгібіторів FGFR1 з мікромолярною інгібувальною активністю – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини та низку інших інгібіторів FGFR1. 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.

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 з мікромолярною активністю – піридин-3-карбонітрили. Ці інгібітори є перспективними для подальшої оптимізації і можуть слугувати основою для розробки більш активних і селективних інгібіторів FGFR1.

Розроблено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель протеїнкінази CK2 на основі комплексу цього ензиму з інгібітором CDC7 та проведено

фармакофорний скринінг, в результаті якого було відібрано та протестовано *in vitro* 55 сполук з різних хімічних класів. Знайдено новий клас інгібіторів СК2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они, що є експериментальним підтвердженням дієздатності розробленої фармакофорної моделі інгібіторів СК2. Найбільш активні сполуки мали субмікромолярну інгібувальну активність по відношенню до СК2. Ці інгібітори можна використовувати для вивчення СК2, вони є хорошою основою для розробки фармацевтичних препаратів від захворювань, пов'язаних із надмірною активністю цієї кінази.

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. Мікромолярну активність проявили тетразоло[1,5-с]хіназоліни. Ці сполуки є перспективними для подальшої оптимізації й розробки більш активних та селективних інгібіторів.

Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей та рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. Алгоритм реалізований на мові програмування Java, має графічний інтерфейс та систему розпаралелення роботи. 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 %.

Розроблені фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та СК2 в поєднанні з алгоритмом оптимізації фармакофорних моделей є дієвим інструментом для розробки нових високоактивних та селективних інгібіторів цих протеїнкіназ.

ВИСНОВКИ

Побудовано і валідовано фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2. Знайдено нові інгібітори цих протеїнкіназ. Розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу.

1. Створено рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази CK2. Віртуальним скринінгом відносно цієї моделі знайдено інгібітори CK2 з активністю в наномолярному діапазоні.

2. Знайдено два нові класи інгібіторів CK2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они та тетразоло[1,5-с]хіназоліни. Значення IC_{50} активних сполук було в межах від 150 nM до 5,3 μ M. 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 μ M. 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 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. / [T. Force, K. Kuida, M. Namchuk et al.]. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 1196-1205.
2. Cohen P. Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? / P. Cohen. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2002. – Vol. 4. – P. 309–315.
3. Cohen P. Kinase drug discovery – what’s next in the field? / P. Cohen, D.R. Alessi. // *ACS Chem Biol*. – 2013. – Vol. 8. – P. 96–104.
4. Glossary of terms used in medicinal chemistry. / C.G.Wermuth, C.R. Ganellin, P. Lindberg, L.A. Mitscher. // *Annu Rep Med Chem*. – 1998. – Vol. 33. – P. 385–395.
5. Pharmacophore modeling, quantitative structure-activity relationship analysis, and in silico screening reveal potent glycogen synthase kinase-3 β inhibitory activities for cimetidine, hydroxychloroquine, and gemifloxacin. / [M.O. Taha, Y. Bustanji, M.A. Al-Ghoussein et al.]. // *J Med Chem*. – 2008. – Vol. 51. – P. 2062–2077.
6. Paul M. K. Tyrosine kinase – role and significance in cancer. / M.K. Paul, A.K. Mukhopadhyay. // *Int J Med Sci*. – 2004. – Vol. 1. – P. 101–115.
7. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? / [M. Dowsett, T. Cooke, I. Ellis et al.]. // *Eur J Cancer*. – 2000. – Vol. 36. – P. 170–176.
8. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. / [P. G. Brennan, T. Kumogai, A. Berezov et al.]. // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19. – P. 6093–6101.
9. Giaccone G. HER1/EGFR-targeted agents: predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy. / G. Giaccone. // *Ann Oncol*. – 2005. – Vol. 16. – P. 538–548.
10. Jost M. The EGF receptor – an essential regulator of multiple epidermal functions. / M. Jost, C. Kari, U. Rodeck. // *Eur J Dermatol*. – 2000. – Vol. 10. – P. 505–510.

11. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. / A.C. Dreux, D.J. Lamb, H. Modjtahedi, G.A. Ferns. // *Atherosclerosis*. – 2006. – Vol. 186. – P. 38–53.
12. Modeling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine – origin of the selectivity of CGP 52411. / [P. Furet, G. Caravatti, N. Lydon et al.]. // *Comput Aided Mol Des*. – 1995. – Vol. 9. – P. 465–471.
13. Peng T. 3D-QSAR and receptor modeling of tyrosine kinase inhibitors with flexible atom receptor model (FLARM). / T. Peng, J. Pei, J. Zhou. // *J Chem Inf Comput Sci*. – 2003. – Vol. 43. – P. 298–303.
14. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. / [D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones et al.]. // *Science*. – 1989. – Vol. 244. – P. 707–712.
15. Arteaga C.L. Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. / C.L. Arteaga. // *Breast Cancer Res*. – 2003. – Vol. 5. – P. 96–100.
16. 3D QSAR analyses of novel tyrosine kinase inhibitors based on pharmacophore alignment. / L.L. Zhu, T.J. Hou, L.R. Chen, X.J. Xu. // *J Chem Inf Comput Sci*. – 2001. – Vol. 41. – P. 1032–1040.
17. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. / A.K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh. // *Mol. Cell. Biol*. – 2006. – Vol. 7. – P. 359–371.
18. The discovery of novel vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases inhibitors: pharmacophore modeling, virtual screening and docking studies. / [H. Yu, Z. Wang, L. Zhang et al.]. // *Chem Biol Drug Des*. – 2007. – Vol. 69. – P. 204–211.
19. Pharmacophore modeling and virtual screening studies for new VEGFR-2 kinase inhibitors. / [K. Lee, K.W. Jeong, Y. Lee et al.]. // *Eur J Med Chem*. – 2010. – Vol. 45. – P. 5420–5427.

20. Dual inhibitors of Janus kinase 2 and 3 (JAK2/3): designing by pharmacophore- and docking-based virtual screening approach. / H.Jasuja, N. Chandha, M. Kaur, O. Silakari. // *Mol. Divers.* – 2014. – Vol. 18. – P. 253–267.
21. Pharmacophore modeling study based on known Spleen tyrosine kinase inhibitors together with virtual screening for identifying novel inhibitors. / [H. Z. Xie, L. L. Li, J. X. Ren et al.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – Vol. 19. – P. 1944–1949.
22. Riccaboni M. Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. / M. Riccaboni, I. Bianchi, P. Petrillo. // *Drug Discov Today.* – 2010. – Vol. 15. – P. 517–530.
23. Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. / B.R.Wong, E.B. Grossbard, D.G. Payan, E.S. Masuda. // *Exp Opin Investig Drugs.* – 2004. – Vol. 13. – P. 743–762.
24. Designing of new multi-targeted inhibitors of spleen tyrosine kinase (Syk) and zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70) using hierarchical virtual screening protocol. / M. Kaur, A. Kumari, M.S. Bahia, O. Silakari. // *J Mol Graph Model.* – 2013. – Vol. 39. – P. 165–175.
25. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. / [H. Wang, T. A. Kadlecsek, B. B. Au-Yeung et al.]. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2010. – Vol. 2. – P. a002279.
26. A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. / [E. Mazuc, B.O. Villoutreix, O. Malbec et al.]. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. – Vol. 122. – P. 188–194.
27. Huges D.P. The anti-inflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor- κ B inhibitor ABIN-2. / D.P. Huges, M.B. Marron, N. Brindle. // *Circ Res.* – 2003. – Vol. 92. – P. 630-636.
28. Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. / V. Martin, D. Liu, J. Fueyo, C. Gomez-Manzano. // *Histol Histopathol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 773–780.

29. Pharmacophore modeling studies of type I and type II kinase inhibitors of Tie2. / [Q.Q. Xie, H.Z. Xie, J.X. Ren et al.]. // *J Mol Graph Model*. – 2009. – Vol. 27. – P. 751–758.
30. Substrate and docking interactions in Ser/Thr protein kinases. / [E.J. Goldsmith, R. Akella, X. Min et al.]. // *Chem. Rev.* – 2007. – Vol. 107. – P. 5065–5081.
31. Aranda S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. / S. Aranda, A. Laguna, de la Luna S. // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25. – P. 449–462.
32. Park J. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. / J. Park, W.J. Song, K.C. Chung. // *Cell Mol Life Sci.* – 2009. – Vol. 66. – P. 3235–3240.
33. Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Clk). / [B.T. Mott, C. Tanega, M. Shen et al.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – Vol. 23. – P. 6700–6705.
34. Pan Y. Pharmacophore and 3D-QSAR characterization of 6-arylquinazolin-4-amines as cdc2-like kinase 4 (Clk4) and dual specificity tyrosinephosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) inhibitors. / Y. Pan, Y. Wang, S.H. Bryant. // *J Chem Inf Model.* – 2013. – Vol. 53. – P. 938–947.
35. McNeely S. CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. / S. McNeely, R. Beckmann, A.K. Bence Lin. // *Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 142. – P. 1–10.
36. Pharmacophore modeling and virtual screening studies of checkpoint kinase 1 inhibitors. / [J.J. Chen, T.L. Liu, L.J. Yang et al.]. // *Chem Pharm Bull.* – 2009. – Vol. 57. – P. 704–709.
37. Identification of human IKK-2 inhibitors of natural origin (part I): modeling of the IKK-2 kinase domain, virtual screening and activity assays. / [E. Sala, L. Guasch, J. Iwazskiewicz et al.]. // *Plos ONE.* – 2011. – Vol. 6. – P. e16903.

38. Chow J.P. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. / J.P. Chow, R.Y. Poon, H.T. Ma. // *Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 31. – P. 1478–1491.

39. Synthesis and activity of quinolinyl-methylene-thiazolinones as potent and selective cyclin-dependent kinase 1 inhibitors. / [S. Chen, L. Chen, N.T. Le et al.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2007. – Vol. 17. – P. 2134–2138.

40. Al-Sha'er M.A. Discovery of novel CDK1 inhibitors by combining pharmacophore modeling, QSAR analysis and in silico screening followed by in vitro bioassay. / M.A. Al-Sha'er, M.O. Taha. // *Eur J Med Chem.* – 2010. – Vol. 45. – P. 4316–4330.

41. S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. / B. Hu, J. Mitra, van den Heuvel S., G.H. Enders. // *Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 2755–2766.

42. Use of catalyst pharmacophore models for screening of large combinatorial libraries. / E.A. Hecker, C. Duraiswami, T.A. Andrea, D.J. Diller. // *J Chem Inf Comput Sci.* – 2002. – Vol. 42. – P. 1204–1211.

43. Using pharmacophore models to gain insight into structural binding and virtual screening: an application study with CDK2 and human DHFR. / S. Toba, J. Srinivasan, A.J. Maynard, J. Sutter. // *J Chem Inf Model.* – 2006. – Vol. 46. – P. 728–735.

44. Virtual screening studies to design potent CDK2-cyclin A inhibitors. / S. Vadivelan, B. Sinha, S. Irudayam, S. Jagarlapudi. // *J Chem Inf Model.* – 2007. – Vol. 47. – P. 1526–1535.

45. Towards more accurate pharmacophore modeling: multicomplex-based comprehensive pharmacophore map and most-frequent-feature pharmacophore model of CDK2. / [J. Zou, H. Xie, S. Yang et al.]. // *J Mol Graph Model.* – 2008. – Vol. 27. – P. 430–438.

46. The polo-like kinase inhibitor BI 2536 exhibits potent activity against malignant plasma cells and represents a novel therapy in multiple myeloma. /

[H.J. Stewart, L. Kishikowa, F.L. Powell et al.]. // *Exp Hematol.* – 2011. – Vol. 39. – P. 330–338.

47. Polo-like kinase inhibitors: an emerging opportunity for cancer therapeutics. / P. Chopra, G. Sethi, S. Dastidar, A. Ray. // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2010. – Vol. 19. – P. 27–43.

48. Pharmacophore modeling and virtual screening for designing potential PLK1 inhibitors. / [H. Wang, Z. Cao, L. Li et al.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – Vol. 18. – P. 4972–4977.

49. Ligand-based and structure-based approaches in identifying ideal pharmacophore against c-Jun N-terminal kinase-3. / [B. V. Kumar, R. Kotla, R. Buddiga et al.]. // *J Mol Model.* – 2011. – Vol. 17. – P. 151–163.

50. Kyriakis J.M. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. / J.M. Kyriakis, J. Avruch. // *Physiol Rev.* – 2012. – Vol. 92. – P. 689–737.

51. Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. / [W. Kimberly, J. Zheng, T. Town et al.]. // *J Neurosci.* – 2005. – Vol. 23. – P. 5533–5544.

52. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. / A. Martinez, A. Castro, I. Dorronsoro, M. Alonso. // *Med Res Rev.* – 2002. – Vol. 22. – P. 373–384.

53. Dorronsoro I. Inhibitors of glycogen synthase kinase-3: future therapy for unmet medical needs? / I. Dorronsoro, A. Castro, A. Martinez. // *Expert Opin Ther Patents.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1527–1536.

54. The marine natural-derived inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta phenylmethylene hydantoins: in vitro and in vivo activities and pharmacophore modeling. / [M. Khanfar, B. Asal, M. Mudit et al.]. // *Bioorg Med Chem.* – 2009. – Vol. 17. – P. 6032–6039.

55. Wong M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways in neurological diseases. / M. Wong. // *Biomed J.* – 2013. – Vol. 6. – P. 40–50.

56. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. / C. Tsang, H. Qi, L. Liu, X. Zheng. // *Drug Discov Today*. – 2007. – Vol. 12. – P. 112–124.
57. Pharmacophore modeling, homology modeling, and in silico screening reveal mammalian target of rapamycin inhibitory activities for sotalol, glyburide, metipranolol, sulfametizole, glipizide, and pioglitazone. / M.A. Khanfar, M.M. AbuKhader, S. Alqtaishat, M.O. Taha. // *J Mol Graph Model*. – 2013. – Vol. 42. – P. 39–49.
58. Tanneeru K. Ligand-based 3-D pharmacophore generation and molecular docking of mTOR kinase inhibitors. / K. Tanneeru, L. Guruprasad. // *J Mol Model*. – 2012. – Vol. 18. – P. 1611–1624.
59. Pharmacophore modeling of diverse classes of p38 MAP kinase inhibitors. / [R. Sarma, S. Sinha, M. Ravikumar et al.]. // *Eur J Med Chem*. – 2008. – Vol. 43. – P. 2870–2876.
60. Modeling of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors using the Catalyst™ HypoGen and k-nearest neighbor QSAR methods. / Z. Xiao, S. Varma, Y. Xiao, A. Tropsha. // *J Mol Graph Model*. – 2004. – Vol. 23. – P. 129–138.
61. Dillon R. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. / R. Dillon, W. Muller. // *Cancer Res*. – 2010. – Vol. 70. – P. 4260–4264.
62. Manning B. AKT/PKB signaling: navigating downstream. / B. Manning, L. Cantley. // *Cell*. – 2007. – Vol. 129. – P. 1261–1274.
63. Vyas V. Pharmacophore modeling, virtual screening, docking and in silico ADMET analysis of protein kinase B (PKB β) inhibitors. / V. Vyas, M. Ghate, A. Goel. // *J Mol Graph Model*. – 2013. – Vol. 42. – P. 17–25.
64. Pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies for discovery of novel Akt2 inhibitors. / J. Fei, L. Zhou, T. Liu, X. Tang. // *Int J Med Sci*. – 2013. – Vol. 10. – P. 265–275.
65. Langer T. Pharmacophores and Pharmacophore Searches / T. Langer, R. D. Hoffmann. – Weinheim: WILEY-VCH, 2006. – 395 p.

66. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications / [O. Dror, D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar et al.]. // *J. Chem. Inf. Model.*. – 2009. – Vol.49. – P. 2333–2343.
67. Koes D. R. Pharmer: Efficient and Exact Pharmacophore Search / D. R. Koes, C. J. Camacho. // *J. Chem. Inf. Model.*. – 2011. – Vol.51. – P. 1307–1314.
68. Traxler P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. / P. Traxler, P. Furet. // *Pharmacol Ther.* – 1999. – Vol. 82. – P. 195–206.
69. 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, Vol. 9. – P. 1175-1189.
70. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. / G. M. Morris, D. S. Goodsell, R.S. Halliday [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 1998. – Vol. 19. – P. 1639-1662.
71. Hess B. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. / B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl // *J. Chem. Theory Comput.* – 2008. – Vol. 4, Vol. 3. – P. 435–447.
72. The general atomic and molecular electronic structure system. / M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz [et al.] // *J. Comp. Chem.* – 1993. – Vol. 14. – P. 1347-1358.
73. Open Babel: An open chemical toolbox / [N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James et al.]. // *Journal of Cheminformatics.* – 2011. – Vol. 3. – P. 33.
74. Connolly M. L. MS: molecular surface program, QCPE program 429, quantum chemistry program exchange, Univ. of Indiana, Bloomington, IN <http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature14.html>.
75. <http://accelrys.com/>
76. Clustal W and Clustal X version 2.0 / [M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown et al.]. // *Bioinformatics.* – 2007. – Vol.23. – C. 2947–8.

77. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. / [H. Nishitoh, H. Kadowaki, A. Nagai et al.]. // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P. 1451–1464.

78. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. / [H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Tobiume et al.]. // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1345–1355.

79. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. / [G. H. Cha, S. Kim, J. Park et al.]. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102. – P. 10345–10350.

80. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. / [H. Kadowaki, H. Nishitoh, F. Urano et al.]. // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 19–24.

81. Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. / [E. Yamamoto, K. Kataoka, Y. F. Dong et al.]. // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 54. – P. 633–638.

82. Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. / [T. Nakamura, K. Kataoka, M. Fukuda et al.]. // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 54. – P. 544–551.

83. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. / [Y. Izumiya, S. Kim, Y. Izumi et al.]. // *Circ Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. 874–883.

84. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. / [E. Yamamoto, Y. F. Dong, K. Kataoka та ін.]. // *Hypertension.* – 2008. – Vol. 52. – P. 573–580.

85. Cardiac hypertrophy is associated with altered thioredoxin and ASK-1 signaling in a mouse model of menopause. / T. Ebrahimian, M. R. Sairam, E. L. Schiffrin, R. M. Touyz. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. H1481–H1488.

86. Apoptosis signal-regulating kinase-1 inhibitor as a potent therapeutic drug for the treatment of gastric cancer. / [Y. Hayakawa, Y. Hirata, K. Sakitani et al.]. // *Cancer Sci.* – 2012. – Vol. 103. – P. 2181–2185.

87. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. / [H. E. Tseng, C. H. Tsai, Z. L. Chang et al.]. // *Biochem Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85. – P. 531–540.

88. Discovery and anti-cancer evaluation of two novel non-ATP-competitive FGFR1 inhibitors in non-small-cell lung cancer. / [J. Wu, T. Wei, Q. Tang et al.]. // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15. – P. 276.

89. Activation of FGF receptor signaling promotes invasion of non-small-cell lung cancer. / [D. Zhao, Y. Lu, C. Yang et al.]. // *Tumour Biol.* – 2015. – Vol. 36. – P. 3637–3642.

90. Characterization of fibroblast growth factor receptor 1 in small-cell lung cancer. / [A. Thomas, J. Lee, Z. Abdullaev et al.]. // *J. Thorac. Oncol.* – 2014. – Vol. 9. – P. 567–571.

91. Discovery and identification of new non-ATP competitive FGFR1 inhibitors with therapeutic potential on non-small-cell lung cancer. / [Y. Wang, Y. Cai, J. Ji et al.]. // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 344. – P. 82–89.

92. Lockwood W. MYCxing it up with FGFR1 in squamous cell lung cancer. / W. Lockwood, K. Politi. // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4. – P. 152–154.

93. Ma L. Advances of molecular targeted therapy in squamous cell lung cancer. / L. Ma, S. Zhang. // *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* – 2013. – Vol. 16. – P. 671–675.

94. High rate of FGFR1 amplifications in brain metastases of squamous and non-squamous lung cancer. / [M. Preusser, A. Berghoff, W. Berger et al.]. // *Lung Cancer.* – 2014. – Vol. 83. – P. 83–89.

95. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. / [T. Tran, C. Selinger, M. Kohonen-Corish et al.]. // *Lung Cancer.* – 2013. – Vol. 81. – P. 462–467.

96. Novel FGFR inhibitor ponatinib suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells overexpressing FGFR1. / [M. Ren, M. Hong, G. Liu et al.]. // *Oncol Rep.* – 2013. – Vol. 29. – P. 2181–2190.

97. FGFR1 amplifications in squamous cell carcinomas of the lung: diagnostic and therapeutic implications. / H.U. Schildhaus, L. Nogova, J. Wolf, R. Buettner. // *Lung Cancer Res.* – 2013. – Vol. 2. – P. 92–100.

98. Fibroblast growth factor receptor inhibition is active against mesothelioma and synergizes with radio- and chemotherapy. / [K. Schelch, M. Hoda, T. Klikovits et al.]. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2014. – Vol. 190. – P. 763–772.

99. Frequency of fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in oral tongue squamous cell carcinomas and associations with clinical features and patient outcome. / [R. Young, A. Lim, C. Angel et al.]. // *Oral. Oncol.* – 2013. – Vol. 49. – P. 576–581.

100. Fibroblast growth factor receptor-1 as a potential therapeutic target in sinonasal cancer. / [A. Schröck, F. Göke, P. Wagner et al.]. // *Head Neck.* – 2014. – Vol. 36. – P. 1253–1257.

101. The therapeutic potential of a novel non-ATP-competitive fibroblast growth factor receptor 1 inhibitor on gastric cancer. / [C. Xu, W. Li, P. Qiu et al.]. // *Anticancer Drugs.* – 2015. – Vol. 26. – P. 379–387.

102. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in pancreatic ductal adenocarcinoma. / [N. Lehnen, A. von Mässenhausen, H. Kalthoff et al.]. // *Histopathology.* – 2013. – Vol. 63. – P. 157–166.

103. Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. / [S. Coleman, A. Chioni, M. Ghallab et al.]. // *EMBO Mol. Med.* – 2014. – Vol. 6. – P. 467–481.

104. Fibroblast growth factor receptor 1 gene copy number and mRNA expression in primary colorectal cancer and its clinicopathologic correlation. / [Y. Kwak, S. Nam, A. Seo et al.]. // *Pathobiology.* – 2015. – Vol. 82. – P. 76–83.

105. Fibroblast growth factor receptor 1 as a putative therapy target in colorectal cancer. / [F. Göke, A. Göke, A. von Mässenhausen et al.]. // *Digestion*. – 2013. – Vol. 88. – P. 172–181.

106. Tsimafeyeu I. Fibroblast growth factor receptor 1 as a target for the therapy of renal cell carcinoma. / I. Tsimafeyeu, G. Bratslavsky. // *Oncology*. – 2015. – Vol. 88. – P. 321–331.

107. OM-RCA-01, a novel humanized monoclonal antibody targeting fibroblast growth factor receptor 1, in renal cell carcinoma model. / I. Tsimafeyeu, E. Zaveleva, E. Stepanova, W. Low. // *Invest New Drugs*. – 2013. – Vol. 31. – P. 1436–1443.

108. Prostate cancer cell-stromal cell crosstalk via FGFR1 mediates antitumor activity of dovitinib in bone metastases. / [X. Wan, P. Corn, J. Yang et al.]. // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6. – P. 252ra122.

109. FGFR1 is essential for prostate cancer progression and metastasis. / [F. Yang, Y. Zhang, S. Ressler et al.]. // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – P. 3716–3724.

110. Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting. / [T. Cheng, B. Roth, W. Choi et al.]. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. e57284.

111. Acute myeloid leukemia associated with FGFR1 abnormalities. / [H. Lee, M. Kim, J. Lim et al.]. // *Int. J. Hematol.* – 2013. – Vol. 97. – P. 808–812.

112. KIAA1549: BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas. / [A. Becker, C. Scapulatempo-Neto, A. Carloni et al.]. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2015. – Vol. 74. – P. 743–754.

113. Upregulation of FGFR1 expression is associated with parathyroid carcinogenesis in HPT-JT syndrome due to an HRPT2 splicing mutation. / [J. Lee, S. Kim, E. Mo et al.]. // *Int. J. Oncol.* – 2014. – Vol. 45. – P. 641–650.

114. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma. / [H. Kim, S. Lee, Y. Bae et al.]. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 2562–2572.

115. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals potential targets associated with cell proliferation in uterine leiomyomas. / [P. Cirilo, F. Marchi, C. Barros Filho Mde et al.]. // *PLoS One*. – 2013. – №8. – P. e57901.

116. Increased expression of fibroblast growth factor receptor 1 in endometriosis and its correlation with endometriosis-related dysmenorrhea and recurrence. / [L. Zhao, H. Yang, Y. Xuan et al.]. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2015. – №184. – P. 117–124.

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

118. Ruzzene M. Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? / M. Ruzzene, L. Pinna. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – №1804. – P. 499–504.

119. Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung / [M. Dayamakin, J. Sanghera, T. Mogentale et al.]. // *Cancer Res.* – 1994. – №54. – P. 2262–2268.

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

121. Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2- α inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. / [R. Faust, S. Tawfic, A. Davis et al.]. // *Head Neck.* – 2000. – №22. – P. 341–346.

122. Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate. / [S. Yenice, A. Davis, S. Goueli et al.]. // *Prostate.* – 1994. – №24. – P. 11–16.

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

124. Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. / [F. Piazza, M. Ruzzene, C. Gurrieri et al.]. // *Blood.* – 2006. – №108. – P. 1698–1707.

125. Protein kinase CK2 α as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. / [J. Kim, J. Eom, J. Cheong et al.]. // *Clin. Cancer. Res.* – 2007. – №13. – P. 1019–1028.

126. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability / [A. Silva, J. Yunes, B. Cardoso et al.]. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – №118. – P. 3762–3774.

127. Targeting CK2 overexpression and hyperactivation as a novel therapeutic tool in chronic lymphocytic leukemia. / [L. Martins, P. Lucio, M. Silva et al.]. // *Blood.* – 2010. – №116. – P. 2724–2731.

128. Singh N. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? / N. Singh, D. Ramji. // *J. Mol. Med.* – 2008. – №86. – P. 887–897.

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

130. Biochemical characterization of casein kinase II as a protein kinase responsible for stimulation of HIV-1 protease in vitro. / [E. Haneda, T. Furuya, S. Asai et al.]. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – №275. – P. 434–439.

131. Prudent R. New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box. / R. Prudent, C. Cochet. // *Chem. Biol.* – 2009. – №16. – P. 112–120.

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

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

134. 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. – №51. – P. 752–759.

135. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. / [S. Sarno, S. Moro, F. Meggio et al.]. // *Pharmacol. Ther.* – 2002. – №93. – P. 159–168.

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

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

138. Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. / [M. Pagano, M. Andrzejewska, M. Ruzzene et al.]. // *J. Med. Chem.* – 2004. – №47. – P. 6239–6247.

139. Synthesis and biological evaluation of substituted (thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acids as inhibitors of human protein kinase CK2. / [A. Golub, V. Bdzhola, N. Briukhovetska et al.]. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – №46. – P. 870–876.

140. Discovery and characterization of synthetic 4'-hydroxyflavones – New CK2 inhibitors from flavones family / [A. Golub, V. Bdzhola, O. Ostrynska et al.]. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – №21. – P. 6681–6689.

141. Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2. / [A. Golub, V. Bdzhola, I. Kyshenia et al.]. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011. – №356. – P. 107–115.

142. ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update. / [S. Sarno, E. Papinutto, C. Franchin et al.]. // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – №11. – P. 1340–1351.

143. Discovery, 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. Chua, S. O'Brien et al.]. // *J. Med. Chem.* – 2011. – №54. – P. 635–654.

144. Inhibition of Protein Kinase CK2 by Flavonoids and Tyrphostins / [G. Lolli, G. Cozza, M. Mazzorana та ін.]. // *A Structural Insight. Biochemistry*. – 2012. – №51. – P. 6097–6107.