

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

ПРОТОПОПОВ МИКОЛА ВАСИЛЬОВИЧ



УДК 577.322

РОЗРОБКА БІОДОСТУПНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ).

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор
академік НАН України
Солдаткін Олексій Петрович,
Інститут молекулярної біології і
генетики НАН України,
завідувач відділу біомолекулярної
електроніки.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Верьовка Сергій Вікторович,
ДУ «Інститут отоларингології ім. проф.
О.С. Коломійченка НАМН України,
завідувач лабораторії біохімії;

доктор фармацевтичних наук, професор
Демченко Анатолій Михайлович,
Ніжинського державного університету
імені Миколи Гоголя.

Захист відбудеться 6 травня 2021 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

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

Автореферат розіслано ___ квітня 2021 року.

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



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Фосфорилування – це один із найбільш розповсюджених механізмів активації та деактивації ензимів і рецепторів. Один із класів ферментів, що забезпечує процес фосфорилування, є протеїнкінази, тому не дивно, що саме цей клас ферментів є однією з найбільш перспективних мішеней для розробки біологічно активних сполук. Людський геном кодує 634 протеїнкінази, які широко залучені в процеси регуляції фізіологічних процесів. На сьогодні 49 (~8 %) представників цього класу ензимів є валідованими мішенями для розробки лікарських засобів. Частка модуляторів активності протеїнкіназ серед усіх розроблених ліків складає 3 %. Серед протеїнкіназ особливу увагу привертає протеїнкіназа СК2. Вона є найбільш плейотропною та, за оцінками, здатна фосфорилувати понад 500 субстратів. Літературні дані свідчать, що гіперактивність і надекспресія протеїнкінази СК2 спостерігається при деяких патологіях, зокрема онкологічних та вірусних захворюваннях, хворобі Альцгеймера, тому інгібітори СК2 можуть бути застосовані при терапії цих захворювань. СК2 є валідованою мішенню для створення лікарських засобів, проте на сьогодні лише один інгібітор СХ-4945 проходить клінічні випробування і визнаний ефективним при лікуванні холангіокарциноми.

Для збільшення ефективності розробки інгібіторів необхідним є застосування методів комп'ютерного моделювання. Так, для зменшення кількості сполук для *in vitro* скринінгу застосовують молекулярний докінг і фармакофорне моделювання. Це значно здешевлює процес пошуку біологічно активних речовин, дає змогу дослідити молекулярні взаємодії сполуки з білком мішенню та передбачити їх афінність. Також комп'ютерні методи використовують для розрахунку фізико-хімічних властивостей, що пов'язані з ADME властивостями, зокрема біодоступності.

Таким чином, розробка нових інгібіторів протеїнкінази СК2 з використанням методів комп'ютерного моделювання є актуальним напрямом наукових досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в рамках бюджетної теми відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.).

Мета і завдання дослідження. Розробка нових низькомолекулярних органічних сполук з інгібувальною активністю щодо протеїнкінази СК2 людини з покращеними показниками біодоступності з використанням методів комп'ютерного моделювання.

Для досягнення цієї мети було поставлено й розв'язано такі завдання:

1. Проаналізувати опубліковані методи розрахунку LogP , визначити коефіцієнти кореляції розрахованих і експериментальних значень LogP для відомих лікарських засобів. Визначити найкращий метод.

2. Виконати віртуальний скринінг бібліотек низькомолекулярних сполук для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2.

3. Визначити активність вибраних віртуальним скринінгом сполук біохімічним тестуванням.

4. Проаналізувати дані біологічного тестування і встановити залежність інгібувальної активності сполук від їх хімічної структури, розробити моделі взаємодії інгібіторів СК2 з АТФ-зв'язувальною кишенею.

5. На основі отриманих моделей розробити рекомендації щодо шляхів оптимізації сполук з урахуванням їх фізико-хімічних властивостей з метою покращення біодоступності.

6. Провести біохімічне тестування оптимізованих сполук.

Об'єкт дослідження: інгібувальна активність низькомолекулярних органічних сполук відносно протеїнкінази СК2 людини та їх фізико-хімічні властивості.

Предмет дослідження: протеїнкіназа СК2 людини, інгібітори протеїнкінази СК2.

Методи дослідження: розрахунок LogP алгоритмами: XLOGP2, JCHEM, OCHEM, ALOGPS, ACLOGP, XLOGP3, KOWWIN, статистичні методи оцінки, гнучкий молекулярний докінг, рескоринг результатів докінгу скоринговою функцією DrugScore, фармакофорне моделювання, біохімічне тестування активності протеїнкіназ із використанням АТФ, міченого ізотопом фосфору ³²P.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено 50 нових інгібіторів протеїнкінази СК2 із значеннями IC₅₀ < 1 мкМ, що належать до трьох класів хімічних сполук: 1,3-тіазол-5-карбонових кислот, 5-гетериламіно-1Н-індазолів та 2-бензіліденбензофуран-3-онів.

Визначено залежність інгібувальної активності сполук від їх структури та розроблено моделі взаємодії знайдених інгібіторів з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані інгібітори можуть бути використані для дослідження сигнальних функцій протеїнкінази СК2, а також для розробки на основі них нових лікарських засобів, зокрема для терапії онкологічних захворювань. Отримані моделі взаємодії знайдених інгібіторів з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 можуть бути використані для розробки нових біологічно активних сполук.

Особистий внесок здобувача. Автором власноруч проведено експерименти, пов'язані з молекулярним моделюванням і біохімічним тестуванням сполук. Проаналізовано методи розрахунку LogP. Виконано напівгнучкий докінг бібліотек низькомолекулярних сполук, проаналізовано молекулярні комплекси, отримані докінгом. Запропоновано моделі взаємодії розроблених інгібіторів з активним сайтом протеїнкінази, а також шляхи хімічної оптимізації знайдених інгібіторів.

Постановку наукових завдань здійснено спільно з д.х.н. С. М. Ярмолюком та к.х.н. В. Г. Бджолою. Кореляційні залежності інгібувальної активності від структури сполук і стратегія їх оптимізації були встановлені спільно з к.х.н. В. Г. Бджолою. Хімічний синтез та оптимізацію похідних аурону і 5-гетериламіно-1Н-індазолу було проведено к.х.н. С.С. Лукашовим. Фармакофорне моделювання та біологічне тестування сполук *in vitro* здійснено спільно з к.б.н. С. А. Старосилою. Автор висловлює слова щирої вдячності науковому керівнику роботи, д.б.н, академіку НАНУ О. П. Солдаткіну за слушні поради, рекомендації та зауваження під час виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на X Міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014), XII Міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016), XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019), VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (Athens, Greece, 2019), XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology» (Lviv, 2020), XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists (Kyiv, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 праць, з них 8 статей у наукових фахових журналах і 7 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у шести розділах, аналізу й узагальнення результатів роботи, аналізу й узагальнення отриманих результатів, висновків і списку використаних джерел, який нараховує 190 найменувань, та додатків. Дисертація містить 54 рисунки і 19 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 207 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури присвячений аналізу сучасних методів розробки лікарських засобів, огляду структури і функції протеїнкінази СК2 людини й основних хімічних класів її інгібіторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Молекулярний докінг проводили за допомогою програмного пакета AUTODOCK. Ліганди і мапи для докінгу готувались програмними пакетами Open Vabel, Vega та MGL Tools. Мішенню для докінгу була просторова структура протеїнкінази СК2, узятая з відкритої бази даних Brookhaven Protein Data Bank (PDBID: 3NSZ, 4UBA).

Рецепторно-орієнтоване фармакофорне моделювання проводили з використанням програмного пакета PharmDeveloper. Фармакофорні моделі будували на основі просторових структур протеїнкінази СК2 з інгібіторами. Ідентифікатори структур, що були використані: 3AT4, 3E3B, 3MB6, 3MB7, 3PE1, 3PE2, 3R0T, 3U4U, 4GRB, 4KWP, 4UB7, 2ZJW, 3AT3, 4ANM.

Рескоринг результатів молекулярного докінгу проводили скоринговою функцією DrugScore.

Параметр LogP органічних сполук оцінювали алгоритмами ALOGP і Jchem.

Біохімічне тестування проводили за допомогою прямого методу оцінки активності протеїнкінази СК2 з використанням очищеного каталітичного домену протеїнкінази СК2 (СК2 α), отриманого рекомбінантним методом, та субстрату, міченого ізотопом фосфору ^{32}P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз методів розрахунку параметра LogP. Проведено аналіз низки методів розрахунку LogP органічних сполук: XLOGP2, JCHEM, OCHEM, ALOGPS, ACLOGP, XLOGP3, KOWWIN. Розраховані коефіцієнти кореляції та стандартні відхилення для цих методів. Найбільшими значеннями коефіцієнтів кореляції характеризуються набори даних, отримані за допомогою методів XLOGP2 (R=0,94), JCHEM (R=0,91) і OCHEM (R=0,9).

Пошук інгібіторів СК2 серед комбінаторних бібліотек органічних сполук. Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних сполук, що налічує понад 160 тисяч структур. Детальним аналізом результатів і візуальною оцінкою взаємодій сполук з найвищими показниками скорингових функцій було відібрано 150 сполук методом молекулярного докінгу та 108 сполук методом рецепторно-орієнтованого фармакофорного скринінгу. Було проведено біологічне тестування 258 сполук, серед яких 19 проявили найкращу інгібувальну здатність відносно СК2, і було визначено їх IC₅₀. Найактивніша сполука **4.19** належить до хімічного класу 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти з IC₅₀ 0,8 мкМ (див. рис 1).

Сполука 2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбонова кислота (**4.19**) взаємодіє з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 (див. рис. 1) таким чином, що 5-хлоро-2-гідрокси-фенільний фрагмент розташовується в аденін-зв'язувальній кишені і через гідрокси групу формує водневий зв'язок з амінокислотним залишком шарнірної ділянки Glu114. Додатково цей фрагмент бере участь у гідрофобних взаємодіях з амінокислотними залишками Val66, Met163, Ile174 та Val116. 5-карбокси-4-метил-тіазол-2-іл направлений углиб АТФ-зв'язувальної кишені, він утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Asp175 і низку гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113. Таким чином, сполука **4.19** взаємодіє з ключовими амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту СК2.

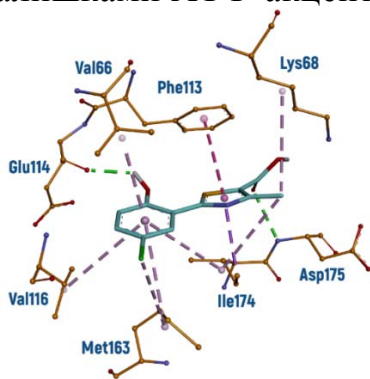


Рис. 1. Спосіб взаємодії сполуки **4.19** з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Для більш детального аналізу похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти було відібрано і протестовано 38 сполук-аналогів. Біологічне тестування *in vitro* виявило серед цих сполук 12, які інгібували протеїнкіназу СК2 більш ніж на 50 % за концентрації сполуки в розчині 10 мкМ. Найактивніші сполуки – 2-(3,4-дихлорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбонова кислота (сполука **4.20**) і 2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбонова кислота (сполука **4.21**) – мали значення IC₅₀ 3,5 і 0,4 мкМ, відповідно.

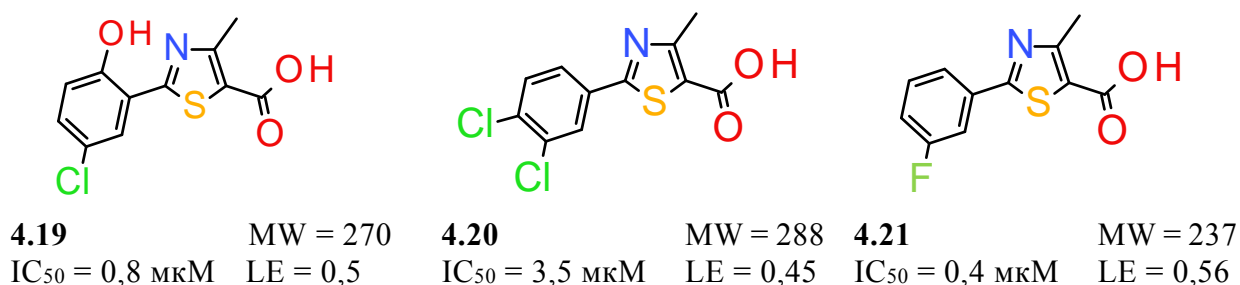


Рис. 2. Структури, значення IC₅₀, LE та молекулярної ваги найактивніших сполук серед похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти

Аналіз способів взаємодії розроблених сполук з АТФ-акцепторним сайтом показав, що сполуки **4.19**, **4.20** і **4.21** (див. рис. 3) мають подібне розташування в АТФ-акцепторному сайті, а відсутність водневого зв'язку сполуки **4.20** з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 не призводить до повної втрати активності. IC₅₀ сполуки **4.20** у 4,75 раза більше, ніж вихідної сполуки **4.19**.

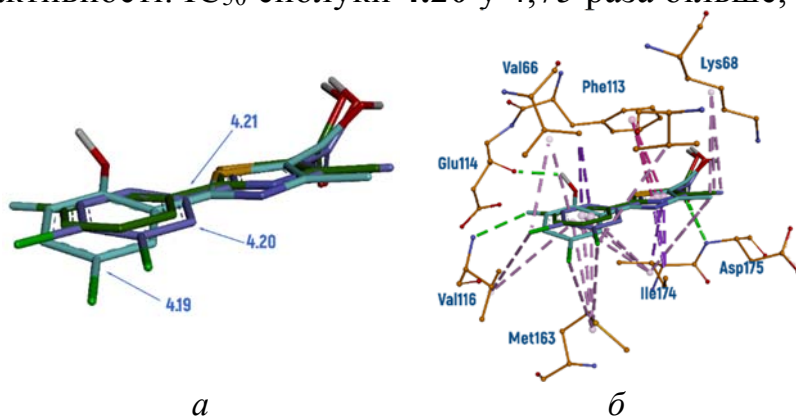


Рис. 3. (а) Накладання сполук **4.19**, **4.20** і **4.21** та (б) їх комплекс з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2

Отже, з використанням методів комп'ютерного моделювання було ідентифіковано нові біодоступні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти. Найкращі сполуки **4.19** і **4.21** мають показники ліпофільної ефективності CLiPE 3,4 та 3,8, відповідно.

Ідентифікація і дослідження похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону як інгібіторів протеїнкінази СК2. Для розробки інгібіторів протеїнкінази СК2 людини було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг 1111 сполук, які належать до різних хімічних класів. Було ретельно досліджено спосіб взаємодії 100 високоскорових сполук з протеїнкіназою СК2 та обрано з-поміж них 12 для біохімічного тестування *in vitro*. З 12 протестованих сполук лише одна – 10-N-циклопентилацетамід-2-(3-метоксифеніл)дигідробензо [4,5]імідазо [1,2-а]піримідин-4-он (сполука **4.58**) – інгібує протеїнкіназу СК2 (IC₅₀ = 6,8 мкМ).

Проаналізувавши базу даних біологічних активностей (ChEMBL), було встановлено, що похідні дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону (див. рис. 4) не досліджували як інгібітори протеїнкінази СК2. Тому для більш глибокого аналізу похідних цього класу було додатково проведено віртуальний скринінг 231 сполуки-аналога й обрано 37 для тестування *in vitro*. Як результат, 32 сполуки інгібували протеїнкіназу СК2 у діапазоні значень IC₅₀ від 2,5 до 7,5 мкМ.

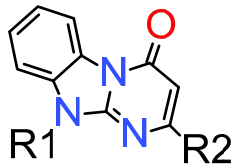


Рис. 4. Загальна хімічна структура похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону

гідрофобних взаємодіях з амінокислотними залишками Met163, Val53 та Ile174. Карбонільна група в 4 положенні гетероциклу утворює водневий зв'язок з аміном амінокислотного залишка шарнірної ділянки Val116. Замісник R2 формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val53 і Lys68. R1 направлений углиб з АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 у бік гідрофобної ділянки I, де бере участь у гідрофобній взаємодії з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113.

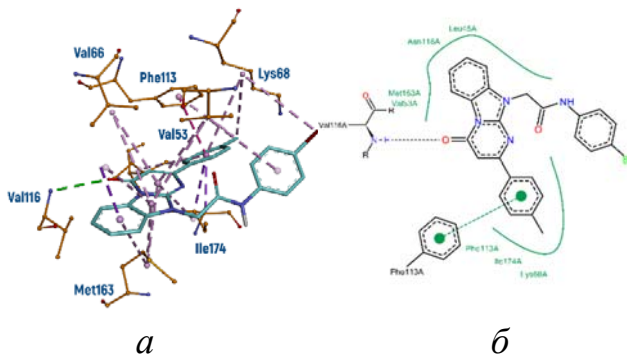


Рис. 5. а - комплекс сполуки 4.105, отриманий з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими; б - двовимірна модель взаємодії сполуки 4.105 з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2

У досліджуваних сполук замісник R2 представлений піридиллом, фенілом, 3-метоксифенілом, 3-хлорфенілом, 4-метоксифенілом і 4-метилфенілом. Аналіз даних тестування *in vitro* показав таку залежність: 4-метилфеніл > 4-хлорфеніл > 4-метоксифеніл. Цю залежність можна пояснити тим, що R2 направлений углиб АТФ-акцепторного сайту в гідрофобну ділянку I. Варіацією замісників у положенні R2 можна впливати на активність похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону щодо СК2 при подальших модифікаціях. Зокрема, варто дослідити введення донорів та акцепторів водневого зв'язку для формування водневого зв'язку з Lys68.

Залежності активності від структури замісника R1 похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону встановити не вдалось. Досліджувані замісники R1 мають ≥ 2 обертальних зв'язків. Це негативно впливає на активність сполук щодо СК2 і, вірогідно, саме тому IC_{50} похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону не опустились до показників менше 1 мкМ. Тому, ввівши в положення R1 замісники з жорсткою структурою, можна вплинути на активність досліджуваних похідних відносно СК2.

Таким чином, було знайдено і досліджено новий клас інгібіторів протеїнкінази СК2 дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-они, що може стати основою для розробки більш активних інгібіторів протеїнкінази СК2.

Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 2-піридону (2-гідроксипіридину). Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг 2088 похідних 2-піридону (див. рис. 6). Для біохімічних тестів було відібрано 15 сполук. З протестованих сполук лише сполука **4.107** – N-(1,3-бензодіоксол-5-іл-метил)-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід – пригнічувала активність протеїнкінази СК2 зі значенням IC_{50} 8,3 мкМ.

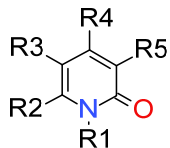
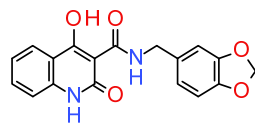
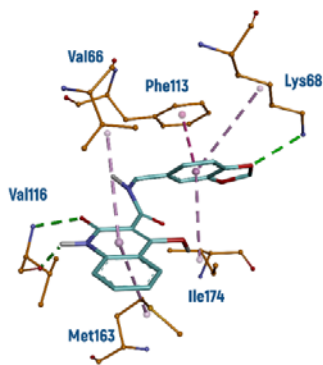


Рис. 6. Загальна хімічна структура похідних 2-піридону

(рис. 7). Цикл 2-піридону розташовується поруч із шарнірною ділянкою АТФ-акцепторного сайту СК2 і задіяний у формуванні 2-х водневих зв'язків. Вони формуються за рахунок атомів Оксигену карбонільної групи і Нітрогену 2-піридону й основним ланцюгом амінокислотного залишка Val116. Замісники R2-R4 орієнтовані в бік виходу із сайту зв'язування та беруть участь в утворенні гідрофобних контактів. Замісник R5 спрямовується в глиб сайту зв'язування і бере участь в утворенні водневого зв'язку з Lys68 за участі атома Оксигену ліганду. Загалом інгібітор **4.107** формує гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val66, Ile95, Met163, Ile174 та Phe113 (π - π стекінг).



4.107
 IC_{50} = 8,3 мкМ
 $LogP$ = 1,2

Рис. 7. а - комплекс сполуки **4.107** з протеїнкіназою СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими; **б** - хімічна структура сполуки **6.1** і значення IC_{50} та $LogP$; **в** - загальна хімічна структура похідних 2-піридону

Незважаючи на кількість обертальних зв'язків у заміснику $R5 \geq 2$, сполука **4.107** і відомі наномолярні інгібітори СК2 FLC26 та FNH79 мали схожий спосіб зв'язування. Також похідні 2-піридону мали доволі низькі значення $LogP$. Тому було проведено хімічну оптимізацію похідних 2-піридону для досягнення кращих інгібувальних властивостей і сконструйовано 9 нових потенційних інгібіторів СК2. Віртуальний скринінг показав, що 2 сполуки мають подібний до сполуки **4.107** спосіб зв'язування та мають кращі показники відношення значення скорингової функції DrugScore до кількості важких атомів (сполуки **4.125** і **4.129**, DrugScore/NAtom яких дорівнює -4,22 та -4,15).

Таким чином, з використанням методів молекулярного моделювання і біохімічного тестування було знайдено нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних класу 2-піридону та розроблено ряд сполук, які потенційно можуть мати інгібувальну активність щодо досліджуваної кінази.

Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних пурин-2,6-діону.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проаналізовано 1943 віртуальних похідних пурин-2,6-діону. За результатами молекулярного докінгу було відібрано 19 сполук для *in vitro* тестування з найкращими показниками скорингової функції та водневими зв'язками із шарнірною ділянкою та/або Lys68/Asp125. Найактивнішою була сполука 1-8-[2-[(3-метилоксифеніл)метиліден]гідразин-1-іл]-3-метил-7-(3-феноксипропіл)-2,3,6,7-тетрагідро-1Н-пурин-2,6-діон (сполука **4.131**), $IC_{50} = 8,5$ мкМ.

Комплекс сполуки **4.131** (рис. 8) з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 був отриманий за допомогою методу молекулярного докінгу. Пурин-2,6-діоновий (ксантиновий) фрагмент сполуки **4.131** розташовується в аденін-зв'язувальному сайті АТФ-зв'язувальної кишені СК2 і формує водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Glu114 та Val116. Ксантиновий гетероцикл залучений у гідрофобні π -алкіл взаємодії з амінокислотними залишками Phe174 і Val66. Метил у третьому положенні направлений у гідрофобну ділянку II. 3-феноксипропіл орієнтований у глиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує водневий зв'язок із залишком амінокислоти Lys68.

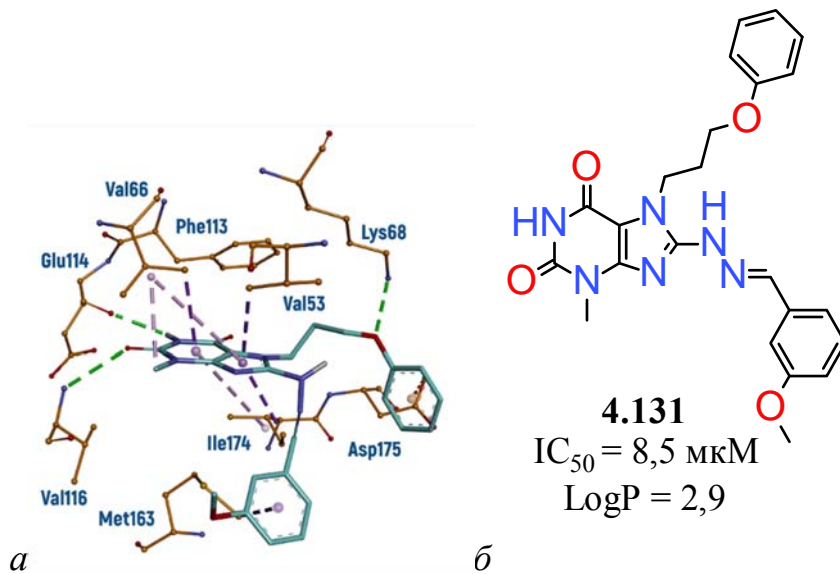


Рис. 8. Спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 (а) сполуки **4.131** і структура (б) сполуки **4.131**. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пунктирними лініями

Уведення бензилу або 4-метилбензилу (сполуки **4.133** і **4.139**) у перше положення гетероциклу веде до втрати інгібувальної здатності щодо СК2. Це може пояснюватися тим, що такі великі гідрофобні замісники призводили до суттєвої зміни орієнтації пурин-2,6-діонового фрагмента в аденін-зв'язувальному сайті та втрати водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Glu114 і Val116.

Сполуки із замісниками у сьомому положенні, що містять у своїй структурі гнучкі лінкери (сполуки **4.132**, **4.134**, **4.137**, **4.138**, **4.140**, **4.145**, **4.149**, **4.141**, **4.142**), мають гіршу активність через дестабілізацію утворення водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68.

Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 проводиться з метою подальшої розробки лікарських засобів на їх основі. Тому важливу роль в оцінці відіграє не лише

значення IC_{50} , а й $LogP$ – показника ліпофільності. $LogP$ досліджуваних сполук знаходиться в діапазоні від -1,5 до 4,2. Сполука **4.131** з IC_{50} 8,5 мкМ має $LogP$ 2,9. Це є оптимальним значенням для проведення подальших модифікацій сполуки з метою оптимізації інгібувальних властивостей похідних цього класу.

Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних піридо[2,3-d]піримідину. Для пошуку активних сполук було проведено молекулярний докінг 3408 віртуальних похідних піридопіримідину і відібрано 14 сполук для проведення біохімічного тестування *in vitro*, з яких лише дві сполуки – N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід (**4.150**) і метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.151**) – інгібували протеїнкіназу СК2 з IC_{50} 19,5 та 6 мкМ, відповідно (див. рис. 9).

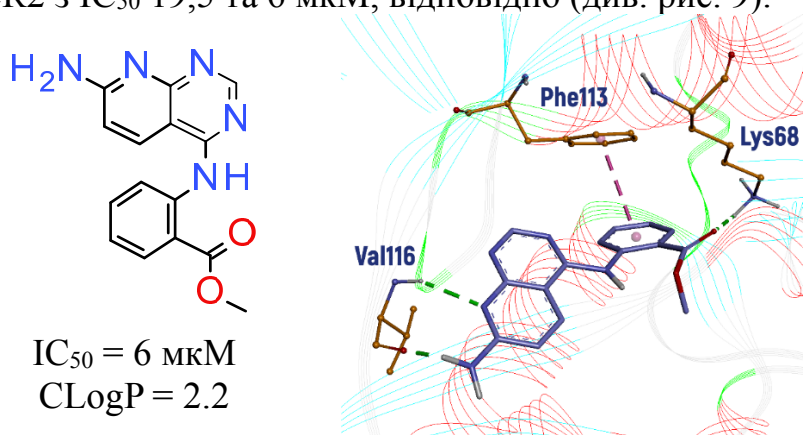


Рис. 9. Структура, значення IC_{50} , $ClogP$ і комплекс із протеїнкіназою СК2 (**4.151**)

За даними молекулярного докінгу, піридо[2,3-d]піримідиновий гетероцикл сполуки **4.150** розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою формується NH-групою піридо[2,3-d]піримідинового гетероциклу і карбонільною групою амінокислотного залишка Val116. Замісник у 6 положенні направлений углиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує гідрофобні взаємодії з Phe113.

Сполука **4.151** має дещо інший тип зв'язування. Піридо[2,3-d]піримідиновий гетероцикл розташований в аденін-зв'язувальній ділянці, але має дзеркальне розташування відносно сполуки N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензаміду. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 формується між карбоксильною і NH групою амінокислотного залишка Val116 та атомом нітрогену в 6 положенні й аміногрупи в 7 положенні піридо[2,3-d]піримідиновий гетероциклу. Замісник у 4 позиції гетероциклу сполуки метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат направлений у глиб АТФ-зв'язувальної кишені. Замісник у 4 положенні формує гідрофобні взаємодії з амінокислотним залишком Phe113 і водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68.

На основі цих даних можна висунути гіпотезу, що саме наявність водневого зв'язку з Lys68 пояснює кращу активність сполуки метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат відносно сполуки N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензаміду.

Зважаючи на особливості будови АТФ-акцепторного сайту, можна припустити, що введення гідрофобних груп, таких як метил, етил, феніл або галогенів (Cl, Br) у

положення 5 піридо[2,3-d]піримідинового гетероциклу і зміна положення COOMe групи в заміснику в 6 положенні може покращити активність похідних досліджуваного класу сполук.

Таким чином, було розроблено 16 похідних сполуки **4.151** та проаналізовано їх за допомогою молекулярного докінгу. Структури і значення скорингової функції сполук, які показали найкращі результати, представлено на рис. 10. Ці сполуки мають схожий спосіб зв'язування з вихідною сполукою **4.150**, що проявила інгібувальну активність щодо СК2 із IC₅₀ 8 мкМ.

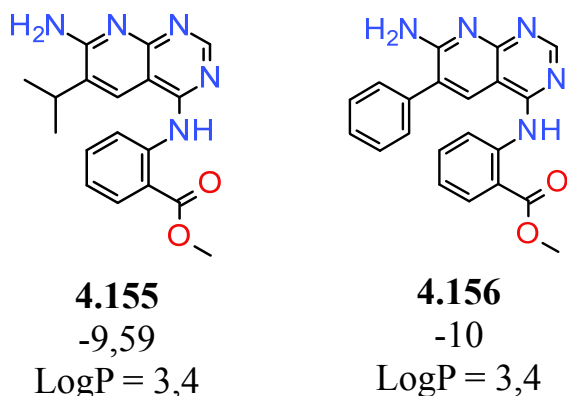


Рис. 10. Хімічні структури і комплекси розроблених сполук **8.6** та **8.7**

Високі значення скорингової функції та подібний спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 робить сполуки **4.152-4.156** перспективними інгібіторами цієї кінрази.

Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу. Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 проводили серед похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу (рис. 11).

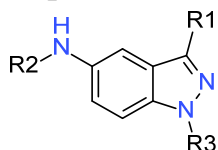


Рис. 11. Загальна хімічна структура похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу

Раніше Лукашовим і колегами було ідентифіковано сполуки серед похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу (**5.5-5.7**), що інгібують СК2 у субмікромолярному діапазоні значень IC₅₀ (рис. 11). Дослідивши спосіб взаємодії отриманих сполук з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2, було встановлено, що активність сполук **5.5-5.7** можна покращити. Тому з метою пошуку більш ефективних інгібіторів було додатково досліджено на здатність інгібувати протеїнкіназу СК2 31 похідне 5-гетериламіно-1H-індазолу. Структури сполук, що найкраще інгібували СК2, представлені на рис. 12, б.

Для з'ясування способу взаємодії похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу з АТФ-акцепторним сайтом СК2 було проведено молекулярний докінг, який показав, що гетероцикл індазолу (на прикладі сполуки **5.23**) розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою формується за участі карбоксильної групи амінокислотного залишка Val116 і Гідрогену в першому положенні гетероциклу. Окрім того, цей гетероцикл бере участь у гідрофобній взаємодії ліганду з амінокислотними залишками Val66, Ile95, Val116, Met163 та Ile174. Таким чином, індазольний гетероцикл відповідає за формування важливого для активності ліганду водневого зв'язку з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 та низку гідрофобних взаємодій, що стабілізують ліганд в АТФ-зв'язувальній кишені.

Замісник у положенні R1 сполуки **5.23** (3,4-дихлорфеніл) орієнтований у бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені СК2. Він бере участь у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотним залишком Val53 (рис. 12, а). Замісник у положенні R2 сполуки **5.23** (хіназолін-4-іл) розташовуються в гідрофобній ділянці 1. Замісник R2 бере участь у формуванні водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68 та формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Phe113, Lys68, Asp175 і Ile174.

б

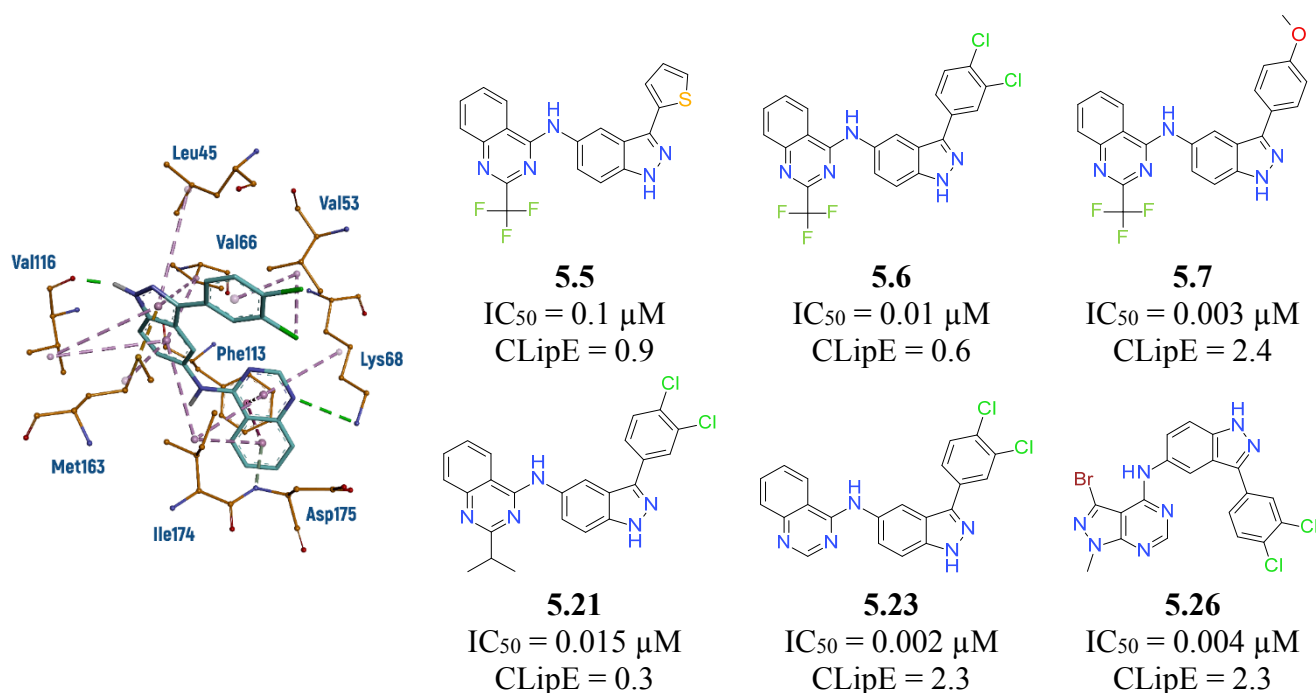


Рис. 12. Спосіб взаємодії сполуки **5.23** з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими (а). Структури, значення IC_{50} і CLipE найбільш активних похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу (б)

Аналіз даних біохімічного тестування дав змогу визначити залежність інгібувальної активності від структури замісника R1: 3,4-дихлорфеніл > 4-метоксифеніл > 2-тієніл. Замісники R2 не проявляють чіткої залежності активності від структури. Така залежність не дивна, адже чим більш гідрофобний замісник, тим більший внесок в активність сполуки він робить за рахунок утворення гідрофобних взаємодій з Val53 і Val66.

Найактивніші сполуки в положенні R2 мали такі замісники: 3-(трифлуорометил)-1-ізохінолін], (6-метилхіназолін-4-іл), [2-(2-хлорофеніл)-6-метил-хіназолін-4-іл], (2-фенілхіназолін-4-іл), [6,7-диметокси-2-(трифлуорометил)хіназолін-4-іл], (1,3-диметилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл) і (1-метилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл). Замісники в положенні R2 повинні формувати гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками гідрофобної кишені I, зокрема, π -alkyl взаємодії та π - π взаємодія з Phe113. Також на заміснику R2 повинні бути донори й акцептори водневого зв'язку, щоб формувати водневі зв'язки з Lys68 та/або Asp175.

Незважаючи на те, що IC_{50} сполук **5.23** і **5.26** дорівнюють 0,002 та 0,004 мкМ, відповідно, значення CLogP цих сполук значно більші за 5 (гранично допустиме

значення LogP за Ліпінським, такі показники погано вплинуть на біодоступність сполук, якщо на основі цих сполук розробляти лікарські препарати). CLipE цих сполук дорівнює 2,3 і 2,3, відповідно. Літературні дані свідчать, що інгібітори протеїнкіназ, які затверджені як лікарські засоби, мають значення параметра LipE в межах від 2 до 8,5. Тому було вирішено оптимізувати знайдені сполуки з урахуванням параметрів CLogP і CLipE.

Таким чином, базуючись на створених моделях взаємодії досліджених сполук з АТФ-акцепторним сайтом СК2 та дослідженнях внеску в загальне CLogP сполуки окремих замісників R1 і R2, було запропоновано 9 нових структур похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу, що можуть інгібувати протеїнкіназу СК2 (структури найкращих сполук представлені на рис. 13). Для оцінки інгібувального потенціалу розроблених сполук (5.35-5.43) було проведено їх молекулярний докінг в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Оскільки в ході дослідження ми порівнювали похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу з відомими інгібіторами СК2 FLC26, докінг проводили в кристалічну структуру протеїнкінази саме з цим інгібітором: PDBID: 4UBA. Рескоринг сполук проводили програмним забезпеченням «Drug Score» – скорингової функції, що базується на даних (knowledge-based scoring function).

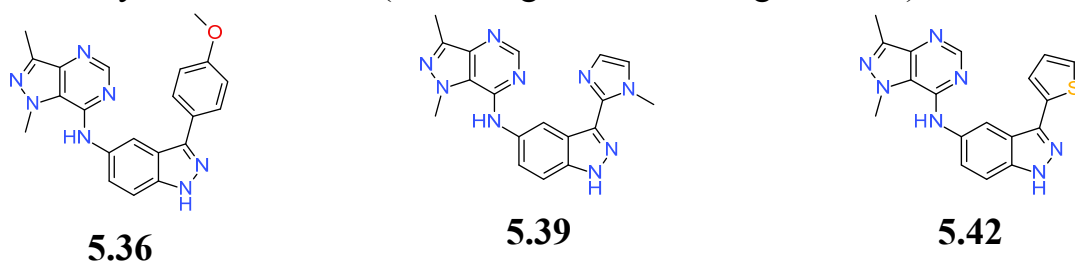


Рис. 13. Структури сконструйованих похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу

Сполуки **5.35–5.43** мають значення скорингової функції в тому самому діапазоні, що й відомий інгібітор протеїнкінази СК2 FLC26 і похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу з відомими значеннями IC₅₀ (**5.6**, **5.23**, **5.26**). Щоб знівелювати вплив розміру сполуки на значення скорингової функції, було розраховано відношення значення «Drug Score» до молекулярної ваги. Таким чином, найкраще відношення «Drug Score» до молекулярної ваги було у FLC26 – 0,22. З огляду на це можна вважати, що сполуки, відношення «Drug Score» до молекулярної ваги яких більше або дорівнює 0,22, мають високий інгібувальний потенціал щодо СК2. Такому параметру відповідає 6 із 9 запропонованих сполук **5.35**, **5.36**, **5.37**, **5.39**, **5.40**, **5.42**. Якщо врахувати ще параметр CLogP для подальшого збільшення ліпофільної ефективності сполуки, то найбільш перспективними сполуками для подальшого дослідження є **5.36**, **5.39** і **5.42**.

Молекулярний докінг показав, що спосіб зв'язування запропонованих сполук із протеїнкіназою СК2 такий самий, як і у сполук **5.1–5.34**.

Таким чином, проведені дослідження та розрахунки підтверджують, що похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу є перспективними інгібіторами протеїнкінази СК2 і можуть бути основою для розробки протипракових лікарських засобів.

Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону (аурону). Для розробки нових ефективних

інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено детальний аналіз структур похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону. Похідні цього класу є структурно схожими до флавонів – відомих наномолярних інгібіторів СК2. На рис. 14 показано зіставлення важливих фармакофорних точок для активності щодо СК2 флавону й аурону.

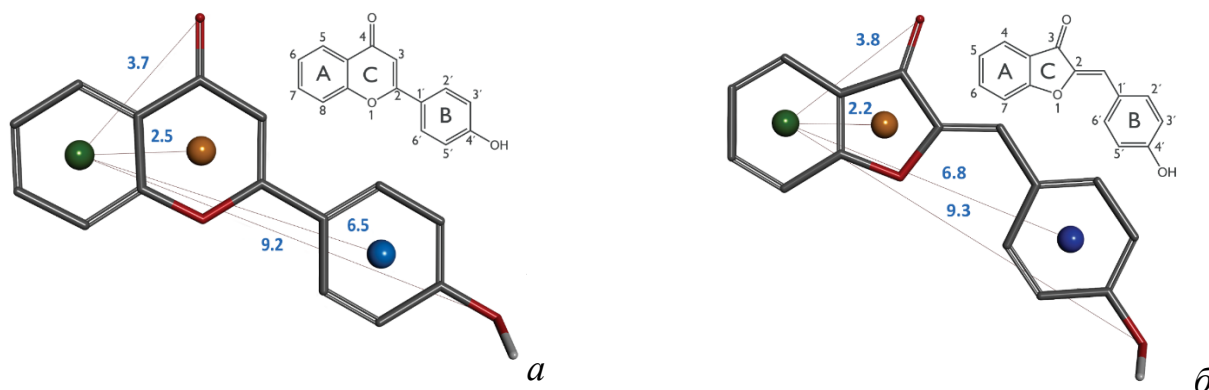


Рис. 14. Порівняння загальної структури 4'-гідроксифлавону (а) і 4'-гідроксиаурону (б). Центр кільця А позначено зеленою сферою, центр кільця В – синьою, центр кільця С – помаранчевою

Аурони та флавони складаються з ароматичної системи А-С (у першому положенні якої міститься атом кисню) і ароматичного кільця В. Відмінністю ароматичної системи А-С флавону від ароматичної системи А-С аурону є те, що у флавону вона налічує 8 атомів, а в аурону – 7. Флаворн містить карбонільну групу в положенні 4, в аурону «аналогічна» карбонільна група розташовується в положенні 3. Загальні положення порівняння геометричних характеристик флавону й аурону представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння геометричних характеристик флавону й аурону

Відстань	Флаворн	Аурон	Δ	Відстань	Флаворн	Аурон	Δ
А-С	2.5 Å	2.2 Å	0.3 Å	А-карбонільна група (на кільці С)	3.7 Å	3.8 Å	0.1 Å
А-В	6.5 Å	6.8 Å	0.3 Å	А-карбоксильна група (4'-позиція кільця В)	9.2 Å	9.3 Å	0.1 Å

Ураховуючи подібність геометрії флавону й аурону та ґрунтуючись на раніше отриманих даних залежності активності від структури похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонів і 4'-гідроксифлавонів, було синтезовано ряд похідних із замісниками ОН, СООН, ОСН₃ та NO₂ в положенні 4'.

За гідрофобними замісниками на кільці А синтезовані сполуки можна поділити на такі групи: 5,7-дихлоро- (6.16–6.31), 4,7-дихлоро- (6.32–6.42) і 5-хлоро-4,6-диметил-заміщені (6.1–6.15) похідні аурону. Загалом було синтезовано 51 похідне аурону для подальшого біохімічного тестування. Сполуки, що найефективніше інгібують СК2, представлені в таблиці 2.

Похідні аурону проявили високу інгібувальну здатність щодо протеїнкінази СК2, тому для інтерпретації даних біохімічного тестування і з'ясування способу зв'язування був проведений молекулярний докінг та проаналізовано низку комплексів похідних аурону з АТФ-зв'язувальною кишеною СК2 (кристалічна структура з ідентифікатором PDB ID: 3NSZ).

Таблиця 2

***In vitro* інгібувальна активність відносно СК2 і значення параметрів CLogP та CLipE найбільш активних похідних аурону**

№ сполуки	IC ₅₀ , μM	CLogP	CLipE	№ сполуки	IC ₅₀ , μM	CLogP	CLipE
6.16 (BFO1)	0.055	4.2	3.06	6.29 (BFO5)	0.0035	5	3.46
6.19 (BFO2)	0.0035	4.9	3.56	6.35 (BFO6)	0.004	4.9	3.5
6.26 (BFO3)	0.0063	5	3.2	6.43 (BFO7)	0.004	5	3.4
6.27 (BFO4)	0.0079	4.1	4	6.44 (BFO8)	0.03	4.1	3.42

За даними комп'ютерного моделювання, для 35 сполук був виявлений спосіб зв'язування, подібний до того, що був встановлений для флавонів за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Відповідно до цього типу взаємодії, кільця А і С знаходяться в аденін-зв'язувальній ділянці, карбонільна група в положенні 3 кільця С формує водневий зв'язок з амінокислотним залишком Val116, що локалізований у шарнірній ділянці. Кільце В направлене вглиб АТФ-акцепторного сайту і формує π-π взаємодію з Phe113. На рис. 15 представлено спосіб зв'язування найактивнішої сполуки **6.29**.

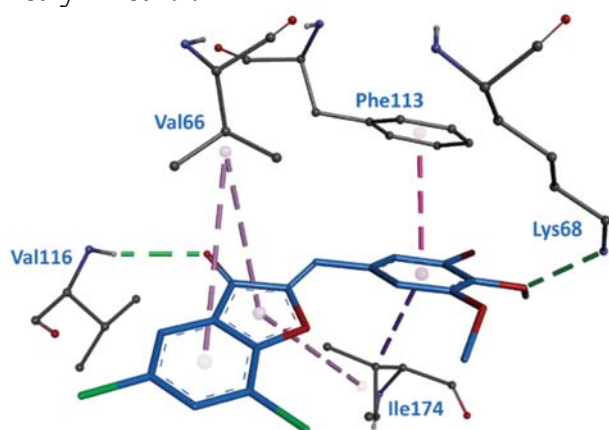


Рис. 15. Спосіб взаємодії сполуки **6.29** з АТФ-зв'язувальною кишеною СК2, отриманий за допомогою молекулярного докінгу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Як було зазначено вище, для флавонів найбільш важливу роль в інгібуванні відігравав замісник у положенні 4' на кільці В. Цей результат був зафіксований і для ауронів. Залежність активності від структури замісника в положенні 4' можна записати таким чином: OH > NO₂ > COOH ≥ OCH₃. Наявність донора чи акцептора водневого зв'язку в положенні 4' важлива для формування водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68.

Наявність акцепторів водневого зв'язку в положеннях 3' і 4' приводить до значного підвищення інгібувальних властивостей сполуки. Залежність активності від структури замісника в положенні 3' можна записати таким чином: $Cl \geq Br \geq NO_2 > OCH_3 > COOH > H$. Додавання гідрофобних замісників у позицію 3' покращує фіксацію інгібітора в сайті зв'язування за рахунок додаткових гідрофобних взаємодій з Phe113, Leu85, Ile174, Ile95, Trp176, а додавання групи NO_2 , підсилює взаємодію з рецептором за рахунок додаткового водневого зв'язку з Asp175. Замісники в положенні 2' не впливають на інгібувальну активність сполук щодо СК2.

Результати аналізу найбільш активних сполук показали, що найкращий показник ліпофільної ефективності був у сполуки **6.27** і дорівнював 4. На рис. 16 зображено розкид значень LipE досліджуваних сполук (червоні кружечки) по відношенню до відомих інгібіторів протеїнази СК2.

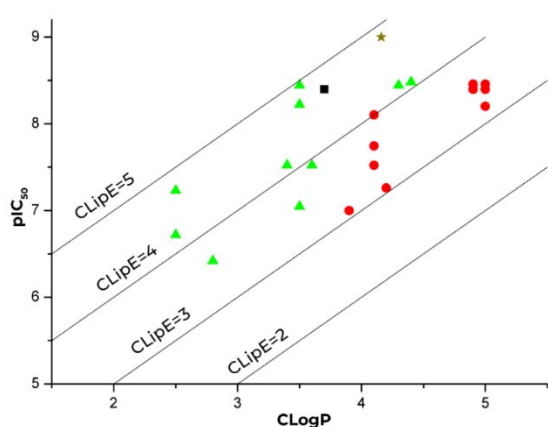


Рис. 16. Графік залежності $CLogP$ від pIC_{50} . Червоними точками показані значення $CLipE$ похідних аурону до оптимізації, зеленими трикутниками – після проведеної оптимізації. $CLipE$ сполуки FLC26 показаний чорним квадратом, а $CLipE$ CX-4945 – темнозеленою зірочкою. Сполуки FLC26 і CX-4945 додані як сполуки порівняння

Високі значення $LogP$ або ліпофільності можуть призвести до виявлення в подальших дослідженнях небажаних побічних ефектів, таких як токсичність або неселективне зв'язування. Тому з метою покращення ліпофільної ефективності похідних аурону було синтезовано 86 сполук для подальшого тестування. Сполуки, що найефективніше інгібують СК2, представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

***In vitro* інгібувальна активність відносно СК2 і значення параметрів $CLogP$ та $CLipE$ найбільш активних похідних аурону після оптимізації ліпофільної ефективності**

Номер сполуки	IC_{50} , μM	$CLogP$	$CLipE$	Номер сполуки	IC_{50} , μM	$CLogP$	$CLipE$
6.53 (BFO9)	0.058	4.3	2.94	6.98 (BFO13)	0.0036	3.5	4.94
6.68 (BFO10)	0.0036	4.3	4.14	6.118 (BFO14)	0.191	2.5	4.22
6.69 (BFO11)	0.006	3.5	4.72	6.118 (BFO14)	0.059	2.5	4.73
6.97 (BFO12)	0.0033	4.4	4.08				

Нові серії сполук можна поділити за замісниками на кільці А: 7-хлор- (6.59–6.72), 5-хлор- (6.73–6.91), 7-бром- (6.92–6.101), 5-бромзаміщених (6.52–6.58), незаміщених (6.102–6.121), 6-гідрокси (6.122–6.133) і 6-гідрокси-7метил- (6.134–6.137) заміщених похідних аурону.

Основною метою синтезу цих сполук було зменшення ліпофільності при збереженні інгібувальних властивостей. Це досягалось шляхом зменшення кількості галогенових атомів на кільці А та заміщення двох С1 на один Вг і введення в це кільце гідрофільних замісників.

Таким чином, було встановлено, що бромозаміщені похідні аурону проявлять вищу інгібувальну активність щодо СК2, ніж хлорозаміщені похідні (сполуки 6.97 і 6.68 з IC_{50} 0,0033 та 0,0036 мкМ відповідно). Незаміщені сполуки по кільцю А, очікувано, проявили значно гіршу інгібувальну здатність щодо СК2 (сполука 6.118, IC_{50} = 0,191 мкМ). Уведення гідрофільного замісника привело до росту активності (сполука 6.133, IC_{50} = 0,059 мкМ), однак підсилення такої заміни гідрофобним замісником у положенні 7 не вплинуло на активність (сполука 6.135, IC_{50} = 0,347 мкМ).

Як результат, було отримано 7 сполук із значеннями показника $CLIP_E$ більше 4 (див. рис. 14, зелені трикутники). Найбільш ефективними серед них були сполуки 6.69, 6.98, 6.97 і 6.133.

Для порівняння способу взаємодії аурону і флавону було проведено молекулярний докінг у просторову структуру протеїнкінази СК2 з інгібітором FLC26, ідентифікатор у PDB – 4UBA.

Було встановлено, що способи взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 сполук FLC26 і 6.98 збігаються. На рис. 17 зображені центроїди кілець А, В та С похідних флавону й аурону (аА, fА; аС, fС та аВ, fВ,). Дані моделювання повністю корелюють з даними *in vitro* тестування цих класів сполук (сполуки FLC26 і 6.98 мають значення IC_{50} 9 та 3,3 нМ, відповідно).

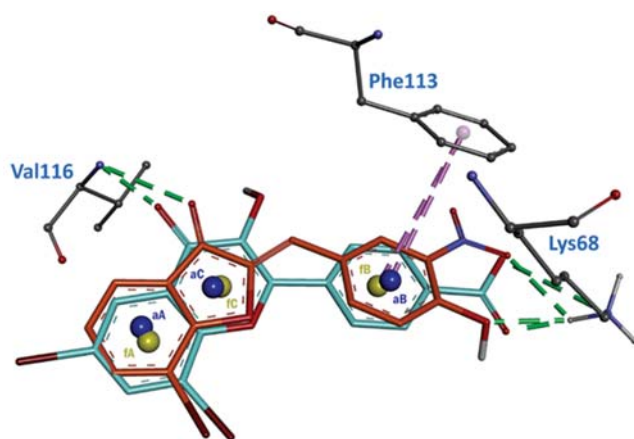


Рис. 17. Порівняння комплексів сполук **FLC26** (бірюзовий, отриманий методом кристалографічного аналізу) і **BFO13** (помаранчевий, отриманий методом молекулярного докінгу). Центроїди кілець А(fA), В(fB) та С(fC) інгібітору **FLC26** позначені жовтими сферами, а центроїди кілець А(aA), В(aB) і С(aC) інгібітора **BFO13** позначені синіми сферами. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, а гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Таким чином було доведено високий потенціал похідних 2-бензиліденбензофуран-3-онів або ауронів як інгібіторів протеїнкінази СК2. Серед 137

синтезованих ауронів було знайдено 41 сполуку з інгібувальною здатністю щодо СК2 в наномолярному діапазоні значень параметра IC_{50} .

За допомогою використання параметра ліпофільної ефективності була розроблена низка високоефективних інгібіторів протеїнкінази СК2. Найкращі сполуки **6.69 (BFO11)**, **6.98 (BFO13)**, **6.97 (BFO12)** і **6.133 (BFO15)** можуть стати перспективними кандидатами для подальших досліджень на клітинах та *in vivo*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі з використанням методів комп'ютерного моделювання і біохімічних досліджень *in vitro* знайдено нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед 7 класів хімічних сполук. Розроблено моделі їх взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 і проведено оптимізацію сполук, що ґрунтувалась на дослідженні залежностей активності та фізико-хімічних властивостей від структури сполук. Отримано 50 нових ефективних інгібіторів протеїнкінази СК2 із значеннями $IC_{50} < 1$ мкМ.

1. Проведено аналіз методів розрахунку параметра LogP органічних сполук та встановлено, що найбільш точними є методи XLOGP2 з коефіцієнтом кореляції $R = 0,94$, JCHEM – $R = 0,91$ і OCHEM – $R = 0,9$. Саме ці методи розрахунку параметра LogP рекомендовано використовувати для оцінки ліпофільності інгібіторів.

2. Виконано рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг сполук щодо протеїнкінази СК2, відібрано 353 сполуки, які мають високі значення скорингових функцій та належать до різних хімічних класів. Показано, що ефективність проведеного віртуального скринінгу становить 14,4 % (біохімічне тестування *in vitro* відібраних сполук виявило 51 новий інгібітор із значенням $IC_{50} \leq 10$ мкМ, з них дві сполуки мали значення $IC_{50} < 1$ мкМ).

3. Розроблено моделі взаємодії нових інгібіторів з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Проведено аналіз моделей і виявлено, що спільною рисою розроблених інгібіторів є утворення ними водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки (Val116 та/або Glu114) і консервативним амінокислотним залишком Lys68, а також гідروفобні взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Phe113, Met163.

4. Встановлено, що заміною гідروفобних замісників на їх біоізостерні аналоги та варіацією їх розташування на каркасній структурі активних сполук можна впливати на їх ліпофільну ефективність (LipE). У результаті таких замінів отримано нові інгібітори СК2 з покращеними значеннями LipE на 21,9 % (сполуки **6.16** і **6.92** CLipE 3,06 та 3,92, відповідно), 22,7 % (сполуки **6.26** і **6.68** CLipE 3,2 та 4,14, відповідно) і 27,7 % (сполуки **6.44** та **6.118** CLipE 3,42 і 4,94, відповідно).

5. Проведено комплексну оптимізацію знайдених інгібіторів з урахуванням залежності як активності, так і фізико-хімічних властивостей від структури. Розроблено 20 нових інгібіторів із значеннями $IC_{50} < 1$ мкМ та покращеними властивостями біодоступності. Серед них сполука **BFO13** має значення параметра ліпофільної ефективності (LipE = 4,94) більше, ніж у інгібітора СК2 CX-4945 (LipE = 4.84), що перебуває на стадії клінічних випробувань.

6. Ураховуючи встановлені способи взаємодії, залежності «структура – активність» і параметри біодоступності серед 7 досліджених хімічних класів інгібіторів протеїнкінази СК2, показано, що найбільш перспективними для подальших досліджень є 5-гетериламіно-1H-індазоли, бензиліденбензофуран-3(2H)-они і похідні 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Протопопов М.В.**, Нипорко О.Ю., Бджола В.Г., Старосила С.А., Ярмолук С.М. Валідація in silico методів визначення ліпофільності/розчинності для раціонального дизайну лікарських засобів. Ukr. Bioorg. Acta. 2013; 11: 44–52. *Особистий внесок здобувача – опис та оцінка кореляції методів розрахунку LogP та LogS з експериментально знайденими значеннями цих параметрів для лікарських засобів. Написання статті та підготовка її до друку.*

2. **Protopopov M.V.**, Volynets G.P., Starosyla S.A., Vdovin V.S., Lukashov S.S., Bilokin Y., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. Identification of 1,3-thiazole-5-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Protein Kinase CK2. Curr Enzym Inhib. 2017;14(2):152–9. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» 1,3-тіазол-5-карбонових кислот, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

3. **Protopopov M.V.**, Starosyla S.A., Borovykov O.V., Sapelkin V.N., Bilokin Y., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. Biopolym Cell. 2017 Aug 31;33(4):291–301. *Особистий внесок здобувача – докінг, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

4. Zinchenko A.N., Muzychka L.V., Smolii O.B., Bdzhola V.G., **Protopopov M.V.**, Yarmoluk S.M. Synthesis and biological evaluation of novel amino-substituted derivatives of pyrido[2,3-d]pyrimidine as inhibitors of protein kinase CK2. Biopolym Cell [Internet]. 2017 Oct 31;33(5):367–78. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано частину статті з описом методик та обговорення результатів молекулярного моделювання та біохімічного тестування.*

5. **Protopopov M.V.**, Ostrynska O.V., Starosyla S.A., Vodolazhenko M.A., Sirko S.M., Gorobets N.Y., Bdzhola V.G., Dosenko S.M., Yarmoluk S.M. Dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine-4-ones as a new class of CK2 inhibitors. Mol Divers. 2018 Nov 29;22(4):991–8. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність», побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальним сайтом СК2, біохімічне тестування. Написання статті та підготовка її до друку.*

6. **Protopopov M.V.**, Ostrynska O.V., Ivanchenko D.H., Starosyla S.A., Bdzhola V.G., Romanenko M.I., Yarmoluk S.M. Developing of protein kinase CK2

inhibitors based on purine-2,6-diones derivatives. Ukr Biochem J. 2017 Oct 25;89(5):32–9. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» пурин-2,6-діонів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

7. Остринська О.В., Українець І.В., Сидоренко Л.В., Старосила Ю.А., **Протопопов М.В.**, Кухаренко О.П., Бджола В.Г., Ярмолюк С.М. Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 2-піридону. Ukr. Bioorg. Acta. 2015; 13: 17-25. *Особистий внесок здобувача – докінг, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

8. **Protopopov M.V.**, Vdovin V.S., Starosyla S.A., Borysenko I.P., Prykhod'ko A.O., Lukashov S.S., Bilokin Y.V., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. Flavone inspired discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones (aurones) as potent inhibitors of human protein kinase CK2. Bioorg Chem. 2020 Sep;102:104062. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» ауронів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

9. **Протопопов М.**, Нипорко О., Бджола В., Ярмолюк С. Валідація *in silico* методів визначення ліпофільності лікарських засобів. X Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології», 2014, Львів.

10. **Протопопов М.**, Приходько А., Волинець Г., Бджола В., Ярмолюк С. Пошук нових хімічних класів інгібіторів протеїнкінази СК2 за використання методів *in silico* та біохімічного тестування. XII Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології», 2016, Львів.

11. **Протопопов М.**, Остринська О, Сірко С, Горобець М, Десенко С, Ярмолюк С. Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2- α]піримідин-4-ону. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017, Львів, Україна.

12. **Protopopov M.**, Vdovin V., Lukashov S., Bilokin Y., Kachaput N., Bdzhola V., Yarmoluk S. Design, synthesis and evaluation of 2-benzylidenebenzofuran-3-ones (aurones) as human protein kinase CK2 inhibitors. VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, 2019, Athens, Greece.

13. **Protopopov M.V.**, Lukashov SS, Ostrynska OV, Starosyla SA, Vdovin VS, Kukharenko OP, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. The synthesis and evaluation of 5-amino-3-phenylindazole as inhibitors of protein kinase CK2. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль.

14. **Protopopov M.V.**, Vdovin V.S., Lukashov S.S., Starosyla S.A., Bdzhola V.H., Yarmoluk S.M. Aurones as human protein kinase CK2 inhibitors. XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology», 2020, Lviv.

15. **Protopopov M.**, Vdovin V., Lukashov S., Bdzhola V., Yarmoluk S. Design of 5-heterylamino-1H-indazole derivatives as novel human protein kinase CK2 inhibitors. XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, 2020, Kyiv.

АНОТАЦІЯ

Протопопов М. В. Розробка біодоступних інгібіторів протеїнкінази СК2. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена пошуку і дизайну нових біодоступних інгібіторів протеїнкінази СК2. Як результат, було ідентифіковано нові інгібітори СК2 серед 7 хімічних класів сполук та побудовано моделі їх взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом. Ураховуючи встановлені моделі взаємодії, залежності «структура – активність» і параметри біодоступності, найбільш перспективними для подальших досліджень є 5-гетериламіно-1Н-індазоли (сполука **9.23** IC₅₀ = 0,002 мкМ), бензиліденбензофуран-3(2H)-они (сполука **6.98** IC₅₀ = 0,0036 мкМ) та похідні 4-метил-1,3-тіазол-5-карбоксихільної кислоти (сполука **4.21** IC₅₀ = 0,4 мкМ). Аналіз розроблених моделей взаємодії знайдених інгібіторів із СК2 показав, що спільною рисою розроблених інгібіторів є утворення ними водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки (Val116 та/або Glu114) і консервативним амінокислотним залишком Lys68, а також гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Phe113, Met163.

Для ряду знайдених інгібіторів проведено комплексну оптимізацію з урахуванням залежностей активності та фізико-хімічних властивостей від структури і розроблено 20 нових інгібіторів із значеннями IC₅₀ < 1 мкМ. Серед них сполука **WFO13** має значення параметра ліпофільної ефективності (LipE = 4.94) більше, ніж у інгібітора СК2 CX-4945 (LipE = 4.84), що перебуває на стадії клінічних випробувань.

Ключові слова: протеїнкіназа СК2, молекулярний докінг, фармакофорне моделювання, інгібітори, скринінг, ліпофільна ефективність, LipE, LogP, ліпофільність.

SUMMARY

Protopopov M. V. Development of bioavailable protein kinase CK2 inhibitors. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

In this research the methods of virtual screening and in vitro inhibitory activity testing were used to search for biologically active compounds against CK2.

Thus, the new inhibitors were found among 1,3-thiazole-5-carboxylic acid, dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine-4-one, 2-pyridone, purine-2,6-dione, pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives. Discovered compounds inhibited CK2 with IC₅₀ values from 0.4 to 20 μM.

Careful binding modes analysis of discovered dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine-4-ones, 2-pyridones, purine-2,6-diones, pyrido[2,3-d]pyrimidines shown two

common features. The first, all of them formed hydrogen bond with hinge region of CK2 (Glu114 or Val116 amino acid residues). The second, core heterocycle of studied compounds located in the adenine-binding region of CK2 ATP-binding site and involved in hydrophobic interactions with amino acid residues Val66, Met163, Val53 and Ile174.

One of the studied inhibitors among 1,3-thiazole-5-carboxylic acid derivative has shown another inhibitor-kinase interactions. Two of three the most active 1,3-thiazole-5-carboxylic acid derivatives formed hydrogen bond with hinge region of CK2 (IC_{50} of these compounds were 0.8 and 0.4 μM) but compound 2-(3,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic didn't formed hydrogen bond with hinge region and inhibited CK2 with IC_{50} 3.5 μM . This thesis proves that the presence of a hydrogen bond with the hinge is not a mandatory for CK2 inhibition.

Also new highly effective protein kinase CK2 inhibitors were identified among 5-hetarylamino-3-aryl-1h-indazole and aurone derivatives by careful SAR analysis of known CK2 inhibitors. IC_{50} of the most active compound among 5-hetarylamino-3-aryl-1h-indazoles N-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-indazol-5-yl]quinazolin-4-amine is 0.002 μM . Indazole heterocycle is involved in the hydrophobic interactions with amino acid residues Val66, Ile95, Phe113, Val116, Met163 and Ile174 in the adenine-binding region. The indazole heterocycle formed a hydrogen bond with Val116 amino acid residues of the CK2 hinge region. R1 substituents oriented to the exit of ATP-binding pocket and formed hydrophobic interaction with Leu45 and Met163. R2 substituents oriented into the hydrophobic pocket I and formed hydrophobic interactions with Phe113, Val53, Lys68 and Ile174. Additionally, R2 formed hydrogen bonds with Lys68 and/or Asp175. According to developed binding mode, SAR-study, and analysis of physicochemical properties the structures of novel high scored 5-amino-3-arylidazole derivatives were designed.

The novel protein kinase CK2 inhibitors were identified among aurones. 21 of them inhibit CK2 with $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$. The binding mode of aurone derivatives were developed. According to the developed binding mode the rings A and C are located in the adenine-binding region, and carbonyl group at position C-3 of the ring C forms a hydrogen bond with Val116 in the hinge region. The ring B is placed deeper in the ATP-binding pocket and forms stacking-like interaction with Phe113. IC_{50} values of the most active compounds **BFO2** and **BFO5** are 0.0035 μM . To enhance the effectiveness and bioavailability of aurones, the property-based optimization was performed. For these reasons, 86 new aurone derivatives were synthesized. As a result of the optimization, 7 nanomolar CK2 inhibitors were developed. IC_{50} of the most active compound **BFO13** is 0.0036 μM and LipE - 4,94.

In general, there were discovered new protein kinase CK2 inhibitors which belongs to 7 chemical classes. 50 of them were identified with IC_{50} value less than 1 μM and belongs to three chemical classes: 5-heteroylamino-1H-indazoles (compound **5.23** $IC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$), benzylidenebenzofuran-3 (2H) -ones (compound **6.98** $IC_{50} = 0.0036 \mu\text{M}$) and 4-methyl-1 derivatives, 3-thiazole-5-carboxylic acid (compound **4.21** $IC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$).

Key words: protein kinase CK2, molecular docking, pharmacophore modeling, inhibitors, screening, lipophilic efficacy, LipE, LogP, lipophilicity.