

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Протопопов Микола Васильович**

УДК 577.322

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЗРОБКА БІОДОСТУПНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2**

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ М. В. Протопопов

Науковий керівник: **Солдаткін Олексій Петрович**, доктор біологічних наук,  
професор, академік НАН України

Київ – 2021

## 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 та генетики Національної академії наук України, Київ, 2021.*

Дисертаційна робота присвячена розробці нових інгібіторів протеїнкінази СК2 з використанням методів комп'ютерного моделювання для подальшого їхнього використання задля створення лікарських засобів.

Процес їхньої розробки є ключовим у фармацевтичній галузі зокрема та охороні здоров'я загалом. Він є достатньо довготривалим та високовартісним процесом. Тому впровадження розрахункових методів є важливим для пришвидшення та здешевлення різних етапів дослідження.

Метою дисертаційної роботи є розробка нових біодоступних низькомолекулярних органічних сполук з інгібувальною активністю щодо протеїнкінази СК2 людини з використанням методів комп'ютерного моделювання.

Для досягнення поставленої мети дисертаційної роботи було проведено аналіз низки методів розрахунку LogP органічних сполук: XLOGP2, JCHEM, OCHEM, ALOGPS, ACLOGP, XLOGP3, KOWWIN. Обчислено коефіцієнти кореляції та стандартні відхилення для цих методів. Найбільшими значеннями коефіцієнтів кореляції характеризуються набори даних, отримані за допомогою методів XLOGP2 ( $R=0,94$ ), JCHEM ( $R=0,91$ ) та OCHEM ( $R=0,9$ ). Саме ці методи розрахунку параметру LogP рекомендовано використовувати для оцінки ліпофільності знайдених інгібіторів.

Для пошуку біологічно активних сполук застосовували методи віртуального скринінгу (рецепторно-орієнтований фармакофорний скринінг та молекулярний

докінг) в поєднанні з *in vitro* тестуванням інгібувальної здатності сполук із використанням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}\text{P}$ .

Знайдено новий хімічний клас інгібіторів протеїнкінази СК2 – похідні 1,3-тіазол-5-карбонової кислоти. Сполуки з найкращою активністю цього класу були: 2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксільна кислота, 2-(3,4-дихлорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксільна кислота та 2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксільна кислота. Значення  $\text{IC}_{50}$  цих сполук 0,8, 3,5 та 0,4 мкМ, відповідно. Було встановлено спосіб зв'язування похідних 1,3-тіазол-5-карбонової кислоти з АТФ-зв'язувальною кишенею. Фенільний фрагмент розташовується в аденін-зв'язувальній кишені, а замісники на цьому фрагменті відповідають за формування водневого зв'язку з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2. Також цей фрагмент утворює гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Met163, Ile174 та Val116. 5-карбоксі-4-метил-тіазол-2-іл, направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та через карбоксільну групу утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Asp175. Також цей фрагмент формує низку гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113. Сполуки досліджуваного класу фіксуються в сайті зв'язування та, відповідно, мають хороші показники інгібувальної активності.

Вперше досліджено похідні дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону як інгібітори протеїнкінази СК2. Ідентифіковано 32 сполуки, що інгібували протеїнкіназу СК2 в діапазоні значень  $\text{IC}_{50}$  від 2,5 до 7,5 мкМ. Досліджено спосіб зв'язування знайдених сполук з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2. Показано, що дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-оновий гетероцикл розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці. Карбонільна група в 4 положенні гетероциклу утворює водневий зв'язок із шарнірною ділянкою та формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Met163, Val53 та Ile174. R1 направлений до виходу з АТФ-зв'язувальної кишені та бере участь у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Leu45 та Ile174. Замісники в R2 направлені вглиб АТФ-зв'язувальної кишені. Через R2 формується водневий зв'язок з Lys68 та гідрофобна взаємодія з Val66, Ile95, Lys68 та Phe113.

Знайдено новий інгібітор протеїнкінази СК2 серед похідних 2-піридону. Сполука N-(1,3-бензодіоксол-5-іл-метил)-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід інгібує протеїнкіназу СК2 зі значенням  $IC_{50}$  8,3 мкМ. Досліджено спосіб взаємодії знайденої сполуки з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 та запропоновано структури нових похідних 2-піридону, що мають високі показники скорингової функції.

Знайдено новий інгібітор протеїнкінази СК2 серед похідних пурин-2,6-діону. 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 інгібує протеїнкіназу СК2 зі значенням  $IC_{50}$  8,5 мкМ. Значення  $LogP$  знайденої сполуки становить 2,9, що робить її перспективним кандидатом для подальшої оптимізації.

Знайдено два нових інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних піридо[2,3-d]піримідину. Сполуки N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід та метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат інгібують протеїнкіназу СК2 з  $IC_{50}$  19,5 та 6 мкМ відповідно. Досліджено взаємодії знайдених сполук з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 та запропоновано низку структур, що мали високі значення скорингової функції.

Знайдено низку нових високоефективних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 5-гетериламіно-1Н-індазолу.  $IC_{50}$  найкращої сполуки N-[3-(3,4-дихлорфеніл)-1Н-індазол-5-yl]хіназолін-4-аміну становить 0,002 мкМ. Гетероцикл індазолу знайдених сполук розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-акцепторному сайті СК2 та формує водневий зв'язок із шарнірною ділянкою. Також гетероцикл індазолу бере участь у гідрофобній взаємодії ліганду з амінокислотними залишками Val66, Ile95, Val116, Met163 та Ile174. Замісник в положенні R1 орієнтований в бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені СК2. Він бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val53. Замісник в положенні R2 розташовується в гідрофобній ділянці I та бере участь у формуванні водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68 та гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Phe113, Lys68, Asp175 та Ile174.

Встановлено залежність інгібувальної активності від структури замісника R1 похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу: 3,4-дихлорофеніл > 4-метоксифеніл > 2-тієніл. Замісники R2 найактивніших сполук представлені: 3-(трифлуорометил)-1-ізохінолін], (6-метилхіназолін-4-іл), [2-(2-хлорофеніл)-6-метил-хіназолін-4-іл], (2-фенілхіназолін-4-іл), [6,7-діметокси-2-(трифлуорометил)хіназолін-4-іл], (1,3-диметилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл) та (1-метилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл).

Запропоновано ряд нових структур похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу з покращеними фізико-хімічними параметрами біодоступності, що мають схожий спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 та високі показники скорингової функції. Ці сполуки можуть бути перспективними для подальших досліджень.

Ідентифіковано нові високоефективні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону (аурону). IC<sub>50</sub> 21 інгібітору серед досліджуваних сполук становить менше ніж 1 мкМ. Аналіз способу взаємодії похідних аурону показав, що бензофуран-3-оновий каркас розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-акцепторного сайту СК2 та формує водневий зв'язок із шарнірною ділянкою, а також низку гідрофобних взаємодій з такими амінокислотними залишками як Phe174 та Val66. Бензиліденовий фрагмент орієнтований вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує низку гідрофобних взаємодій, головною з яких є взаємодія з Phe113; додатково замісники на цьому фрагменті формують водневий зв'язок з амінокислотними залишками Lys68 та/або Asp175.

Залежність інгібувальної активності від структури замісників на кільці А бензиліденбензофуран-3(2H)-онового каркасу є наступна: 5-хлоро-4,6-диметил- << 4,7-дихлоро- ≤ 5,7-дихлорозамішені похідні аурону. Залежність активності від структури замісників на кільці В у положенні 4': OH > NO<sub>2</sub> > COOH ≥ OCH<sub>3</sub>; а в положенні 3': Cl ≥ Br ≥ NO<sub>2</sub> > OCH<sub>3</sub> > COOH > H.

IC<sub>50</sub> найкращих інгібіторів **BFO2** та **BFO5** становило 0,0035 мкМ.

Проведено оптимізацію даного класу сполук з урахуванням активності та фізико-хімічних параметрів для покращення їхньої біодоступності та запропоновано

для синтезу 86 нових похідних аурону. Метою оптимізації було зменшення ліпофільності при збереженні високої афінності сполук щодо протеїнкінази СК2 для покращення біодоступності інгібіторів цього класу сполук. Як результат проведеної оптимізації було розроблено 7 наномолярних інгібіторів СК2, найкращий з яких – сполука **WFO13** ((2Z)-7-бромо-2-[(4-гідрокси-3-нітрофеніл)метиліден] бензофуран-3-он), значення  $IC_{50}$  якої становить 0,0036 мкМ, а ліпофільна ефективність – 4,94.

Отже, у дисертаційній роботі було досліджено 7 хімічних класів інгібіторів протеїнкінази СК2. Отримано 53 нові ефективні інгібітори протеїнкінази СК2 із значенням  $IC_{50} < 1$  мкМ. Найбільш перспективними класами сполук для подальших досліджень є: 5-гетериламіно-1H-індазоли (сполука **5.23**  $IC_{50} = 0,002$  мкМ), бензиліденбензофуран-3(2H)-они (сполука **6.98**  $IC_{50} = 0,0036$  мкМ) та похідні 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти (сполука **4.21**  $IC_{50} = 0,4$  мкМ).

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

## Список публікацій здобувача за темою дисертації:

### Статті у наукових фахових виданнях:

1. **Протопопов МВ**, Нипорко ОЮ, Бджола ВГ, Старосила СА, Ярмолук СМ. 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 LogP та LogS для бази лікарських засобів. Власноруч написано основну частину статті.*
2. **Protopopov MV**, Volynets GP, Starosyla SA, Vdovin VS, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. 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-тіфзол-5-карбоксільних кислот, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*
3. **Protopopov MV**, Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell [Internet].* 2017 Aug 31;33(4):291–301. *Особистий внесок здобувача – докінг, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*
4. Zinchenko AN, Muzychka L V., Smolii OB, Bdzhola VG, **Protopopov MV**, Yarmoluk SM. 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» піридо[2,3-d]піримідинів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано частину статті з*

описом методик та обговорення результатів молекулярного моделювання та біохімічного тестування.

5. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Starosyla SA, Vodolazhenko MA, Sirko SM, Gorobets NY, Bdzhola VG, Dosenko SM, Yarmoluk SM. 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» дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-онів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

6. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Ivanchenko DH, Starosyla SA, Bdzhola VG, Romanenko MI, Yarmoluk SM. 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 CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

7. Остринська ОВ, Українець ІВ, Сидоренко ЛВ, Старосила ЮА, **Протопопов МВ**, Кухаренко ОП, Бджола ВГ, Ярмолюк СМ. Пошук нових інгібіторів протеїнкінази CK2 серед похідних 2-піридону. Ukr. Bioorg. Acta. 2015; 13: 17-25. *Особистий внесок здобувача – докінг, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність» 2-піридону, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

8. **Protopopov MV**, Vdovin VS, Starosyla SA, Borysenko IP, Prykhod'ko AO, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. 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» бензиліденбензофуран-3(2H)-онів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-*



зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.

### Тези наукових доповідей на конференціях

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 CK2 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 CK2 серед похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2- $\alpha$ ]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., Bdzholo 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 MV**, Lukashov S.S., Ostrynska O.V., Starosyla S.A., Vdovin V.S., Kukharenko O.P., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M. The synthesis and evaluation of 5-amino-3-phenylindazole as inhibitors of protein kinase CK2. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль.

14. **Protopopov MV**, Vdovin V.S., Lukashov S.S., Starosyla S.A., Bdzholo 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.

## 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.*

The aim of this work is to develop new bioavailable small molecule organic compounds with inhibitory activity against human protein kinase CK2 using computer modeling methods.

Drug development is a key process in the pharmaceutical industry and health care in general. Drug development is a long time and expensive process. Therefore, the using of computational methods in drug development are important for accelerating and reducing risks and cost of different stages of research.

The aim of this work is to develop new bioavailable small molecule organic compounds with inhibitory activity against human protein kinase CK2 using computer modeling methods.

To achieve the goals, the methods (XLOGP2, JCHEM, OCHEM, ALOGPS, ACLOGP, XLOGP3, KOWWIN) of organic compounds LogP calculating were analyzed. Correlation coefficients and standard deviations for these methods were calculated. The highest values of correlation coefficients were characterized by data sets obtained using the methods XLOGP2 (R = 0.94), JCHEM (R = 0.91) and OCHEM (R = 0.9). These methods of LogP calculation were recommended to be used for an assessment of lipophilicity of the found inhibitors.

Virtual screening (receptor-oriented pharmacophore screening and molecular docking) and in vitro inhibitory activity testing were used to search for biologically active compounds against CK2.

1,3-thiazole-5-carboxylic acid derivatives were identified as protein kinase CK2 inhibitors. The most active compounds 2-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid, 2-(3,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid and 2-(3-fluorophenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid were inhibited CK2 with IC<sub>50</sub> value of 0.8, 3.5 and 0.4  $\mu$ M. The binding mode of 1,3-thiazole-5-carboxylic acid derivatives were developed. According to the developed binding mode fluorophenyl, 5-chloro-2-hydroxyphenyl and 3,4-dichlorophenyl is located in adenine-binding site and is involved in hydrophobic interactions with amino acid residues Val66, Met163, Ile174 and Val116. Additionally, fluorophenyl and 5-chloro-2-hydroxyphenyl form hydrogen bond with Val116 (hinge region CK2). Also 4-methyl-1,3-thiazol is located in hydrophobic pocket I and forms  $\pi$ - $\pi$  interaction with Phe113 and  $\pi$ -alkyl interaction with Ile174. Methyl group is implicated in hydrophobic interaction with sidechain of Lys68 and carboxyl group builds hydrogen bonds with Asp175 and/or Lys68. It was revealed that 2-(3,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid show non classic binding mode and did not form hydrogen bond with CK2 hinge region.

Dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine-4-one derivatives for the first time were identified as protein kinase CK2 inhibitors. 32 compounds inhibit CK2 with IC<sub>50</sub> values from 2.5 to 7.5  $\mu$ M. The binding mode of dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine-4-one derivatives were developed. According to binding mode dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-4-one heterocycle is located in the adenine-binding region of the ATP-acceptor site and forms hydrophobic contacts with Met163, Val53 and Ile174. The ketone group in the 4<sup>th</sup> position makes a hydrogen bond with amine of Val116. The R1 group forms hydrophobic contacts with Leu45 and Ile174. The R2 group is directed toward the hydrophobic region I, where hydrophobic interactions occur with Val66, Ile95, Lys68 and Phe113. Also, R2 forms a hydrogen bond with catalytic Lys68.

New protein kinase CK2 inhibitor was identified among 2-pyridone derivatives. Compound N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1H-quinoline-3-carboxamide inhibit CK2 with IC<sub>50</sub> value of 8.3 μM. The binding mode of 2-pyridone derivatives were developed. According developed binding mode and SAR-study the structures of novel high scored 2-pyridone derivatives were designed.

New protein kinase CK2 inhibitor was identified among purine-2,6-dione derivatives. IC<sub>50</sub> of the most active compound 8-[2-[(3-methoxyphenyl)methylidene]hydrazine-1-yl]-3-methyl-7-(3-phenoxypropyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purine-2,6-dione is 8.5 μM. LogP value of this compound was 2.9. Which makes it a promising candidate for further optimization.

Two novel protein kinase CK2 inhibitors were identified among pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives. Compounds N-(4-Anilino-7-oxo-7,8-dihydropyrido-[2,3-d]pyrimidin-6-yl)-4-methoxybenzamide and methyl 2-[(7-aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino]benzoate inhibit CK2 with IC<sub>50</sub> values 19.5 and 6 μM, respectively. The binding mode of pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives were developed. According developed binding mode and SAR-study the structures of novel high scored pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives were designed.

The novel protein kinase CK2 inhibitors were identified among 5-hetarylamino-3-aryl-1h-indazole derivatives. IC<sub>50</sub> of the most active compound 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.

The structure-activity relationships of 5-amino-3-arylindazole derivatives were determined. According to biochemical data the order of potency for the substituent at R1 is as follows: 3,4-dichlorophenyl > 4-methoxyphenyl > 2-thienyl. R2 of the most active

compounds presented by 3-(trifluoromethyl)-1-isoquinolyl, 2-isopropyl-6-methyl-quinazolin-4-yl, 2-(2-chlorophenyl)-6-methyl-quinazolin-4-yl, 2-phenylquinazolin-4-yl, 6,7-dimethoxy-2-(trifluoromethyl)quinazolin-4-yl, 1,3-dimethylpyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl and 1-methylpyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl.

According to developed binding mode, SAR-study, and analysis of physicochemical properties the structures of novel high scored 5-amino-3-arylindazole derivatives were designed.

The novel highly effective protein kinase CK2 inhibitors were identified among aurones. 21 compounds inhibit CK2 with  $IC_{50} < 1 \mu M$ . 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.

Based on the obtained results of biochemical tests, the order of potency for the substituents of the ring A is as follows: 5-chloro-4,6-dimethyl-  $\ll$  4,7-dichloro-  $\leq$  5,7-dichloro-substituted derivatives of aurones. Among the substituents of the ring B, R4' has the most significant impact on the inhibitory activity toward protein kinase CK2. According to the experimental results, the order of potency for the substituent at C-4' position of the ring B is as follows: OH > NO<sub>2</sub> > COOH  $\geq$  OCH<sub>3</sub>.

$IC_{50}$  values of the most active compounds **BFO2** and **BFO5** are 0.0035  $\mu M$ .

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  $\mu M$  and LipE - 4,94.

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

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

**List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

**Articles**

1. **Protopopov MV**, Nyporko AYu, Bdzhola VG, Starosyla SA, Yarmoluk SM. In silico validation of methods for estimation of drugs lipophilicity/solubility. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2013; 11: 44–52.
2. **Protopopov MV**, Volynets GP, Starosyla SA, Vdovin VS, Lukashov SS, Bilokin YV., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Identification of 1,3-thiazole-5-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Protein Kinase CK2. *Curr Enzym Inhib.* 2017;14(2):152–9.
3. **Protopopov MV**, Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell.* 2017 Aug 31;33(4):291–301.
4. Zinchenko AN, Muzychka L V., Smolii OB, Bdzhola VG, **Protopopov MV**, Yarmoluk SM. 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.
5. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Starosyla SA, Vodolazhenko MA, Sirko SM, Gorobets NY, Bdzhola VG, Dosenko SM, Yarmoluk SM. 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.
6. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Ivanchenko DH, Starosyla SA, Bdzhola VG, Romanenko MI, Yarmoluk SM. Developing of protein kinase CK2 inhibitors based on purine-2,6-diones derivatives. *Ukr Biochem J.* 2017 Oct 25;89(5):32–9.
7. Ostrynska OV, Ukrainets IV, Sidorenko2 LV, Starosyla YuA, **Protopopov MV**, Kukharenko OP, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Search of new inhibitors of protein kinase CK2 among 2-pyridone derivatives. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2015; 13: 17-25.

8. **Protopopov MV**, Vdovin VS, Starosyla SA, Borysenko IP, Prykhod'ko AO, Lukashov SS, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Flavone inspired discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones (aurones) as potent inhibitors of human protein kinase CK2. *Bioorg Chem.* 2020 Sep;102:104062.

### Conference abstracts

9. **Protopopov M**, Nyporko A, Bdzhola V., Yarmoluk S. In silico validation of methods for estimation of drugs lipophilicity. X International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology», 2014, Lviv.

10. **Protopopov M**, Prykhod'ko A., Volynets G., Bdzhola V., Yarmoluk S. Discovery of novel CK2 inhibitors using in silico methods and biochemical tests.. XII International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology», 2016, Lviv.

11. **Protopopov M**, Ostrynska O., Sirko S., Gorobets N., Dosenko S., Yarmoluk S. Discovery of novel protein kinase CK2 inhibitors among dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-4-one derivatives. XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology», 2017, Lviv.

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 MV**, Lukashov S.S., Ostrynska O.V., Starosyla S.A., Vdovin V.S., Kukharenko O.P., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. The synthesis and evaluation of 5-amino-3-phenylindazole as inhibitors of protein kinase CK2. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль.

14. **Protopopov MV**, 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.



## ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Раціональний дизайн лікарських засобів.....	25
1.2. Комп'ютерні методи розробки лікарських засобів.....	27
1.2.1. Рецепторно-орієнтовані методи розробки лікарських засобів.....	28
1.2.1.1. Молекулярний докінг.....	30
1.2.1.2. Ліганд-орієнтовані методи розробки лікарських засобів.....	31
1.3. Протеїнкаіаза СК2.....	32
1.3.1. Структура протеїнкаіази СК2.....	33
1.3.2. Будова АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкаіази СК2.....	34
1.3.3. Функцій протеїнкаіази СК2 (протеїнкаіаза СК2 як мішень для розробки ліків).....	36
1.3.4. Інгібування протеїнкаіази СК2.....	38
1.3.4.1. Огляд інгібіторів протеїнкаіази СК2.....	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	45
2.1. Молекулярне моделювання.....	45
2.1.1. Молекулярний докінг.....	46
2.1.1.1. Підготовка молекул лігандів.....	46
2.1.1.2. Підготовка молекули рецептора.....	47
2.1.1.3. Створення мап для молекулярного докінгу.....	47
2.1.1.4. Гнучкий докінг.....	48
2.1.1.5. Ранжування результатів молекулярного докінгу.....	49
2.1.1.5.1. Рескоринг результатів молекулярного докінгу.....	49
2.1.2. Фармакофорне моделювання.....	50
2.1.2.1. Підготовка молекул рецептора для фармакофорного моделювання.....	50
2.1.2.2. Підготовка молекул лігандів для фармакофорного моделювання.....	50
2.1.2.3. Побудова фармакофорних моделей.....	51
2.1.2.4. Ранжування результатів фармакофорного моделювання та відбір сполук.....	51

2.2. Біохімічне тестування .....	52
2.3. Розрахунок LogP органічних сполук.....	53
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ МЕТОДІВ РОЗРАХУНКУ ПАРАМЕТРУ LOGP.....	57
РОЗДІЛ 4. ПОШУК ІНГІБІТОРІВ СК2 СЕРЕД КОМБІНАТОРНИХ БІБЛІОТЕК ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК .....	66
4.1. Ідентифікація та дослідження похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти як інгібіторів протеїнкінази СК2 .....	66
4.1.1. Рецепторно орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних сполук .....	66
4.1.2. Дослідження інгібувальної активності відібраних сполук.....	68
4.1.3. Аналіз типу зв'язування знайдених інгібіторів з протеїнкіназою СК2.....	72
4.1.4. Хімічна оптимізація похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти	78
4.2. Ідентифікація та дослідження похідних .....	86
дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону як інгібіторів протеїнкінази СК2 .....	86
4.3. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 2-піридону (2- гідроксипіридину) .....	99
4.4. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних пурин-2,6-діону .....	111
4.5. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних піридо[2,3- d]піримідину .....	121
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ 5-ГЕТЕРИЛАМІНО-1Н-ІНДАЗОЛІВ .....	129
РОЗДІЛ 6. РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ АУРОНУ .....	148
6.1 Порівняльний аналіз геометрії флавонів та ауронів.....	149
6.3. Оптимізація похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону з урахуванням афінності та фізико-хімічних параметрів .....	155
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	163
7.1 Аналіз та узагальнення знайдених інгібіторів протеїнкінази СК2 .....	163

7.2 Аналіз та узагальнення використаних методів комп'ютерного моделювання .....	166
7.3 Аналіз та узагальнення фізико-хімічних властивостей знайдених інгібіторів .....	167
ВИСНОВКИ.....	172
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	174
ДОДАТОК А.....	194
ДОДАТОК Б.....	198
ДОДАТОК В.....	202

**СПИСОК СКОРОЧЕНЬ**

PDB	–	Банк даних білків
PDBID	–	Ідентифікатор структур в банку даних білків
BLAST	–	Basic Local Alignment Search Tool (засіб пошуку основного локального вирівнювання)
QSAR	–	Quantitative Structure-Activity Relationship (пошук кількісних співвідношень структура-властивість)
CK2	–	Casein Kinase II (Казеїн кіназа II)
DMSO	–	Диметилсульфоксид
IC <sub>50</sub>	–	Концентрація напівмаксимального інгібування
LogP	–	Коефіцієнт розподілу між октанолом і водою
CLogP	–	Розрахунковий коефіцієнт розподілу між октанолом і водою
LipE	–	Ліпофільна ефективність
CLipE	–	Розрахункова ліпофільна ефективність
АТФ	–	Аденозинтрифосфат (АТФ), аденозинтрифосфорна кислота
ЯМР	–	Ядерний магнітний резонанс

## ВСТУП

### 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  $\text{LogP}$ , визначити коефіцієнти кореляції розрахованих і експериментальних значень  $\text{LogP}$  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 <sup>32</sup>P.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розроблено 50 нових інгібіторів протеїнкінази СК2 із значеннями IC<sub>50</sub> < 1 мкМ, що належать до трьох класів хімічних сполук: 1,3-тіазол-5-карбоксихильних кислот, 5-гетериламіно-1H-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 науковим керівником д.б.н, академіком НАНУ О. П. Солдаткіним. 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-1H-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.

**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 188 найменувань. Дисертація містить 54 рисунки і 19 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 198 сторінок.



## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Раціональний дизайн лікарських засобів

Впровадження нових лікарських засобів потребує значних фінансових інвестицій, людської роботи та часу. За підрахунками, розробка лікарського засобу може тривати в середньому від 10 до 15 років та потребувати вкладень в розмірі від 800 мільйонів до 1,5 мільярдів доларів США [1]. Інновації у сфері комбінаторної хімії та розвиток високопродуктивного скринінгу [2] сприяли пришвидшенню процесу розробки ліків, але, тим не менш, в останні 10 років спостерігається тенденція до зменшення кількості розроблених лікарських засобів. Саме тому провідні фармацевтичні фірми почали впроваджувати досягнення комп'ютерних наук для створення методів раціональної розробки необхідних препаратів. Створення суперкомп'ютерів, використання підходу розпаралелення процесів та постійне вдосконалення програмного забезпечення значно підвищило ефективність ідентифікації лідерних сполук в процесі фармацевтичного дослідження. Впровадження розрахункових алгоритмів мало на меті оптимізувати процес розробки лікарських засобів, зокрема зменшити вартість процесу розробки та оптимізувати її етапи. Серед обчислювальних методів широко використовують статистичні підходи та методи, що базуються на знаннях просторової структури білка-мішені [3].

В сучасному розумінні розробка лікарського препарату – це мультидисциплінарний процес із залученням знань структурної біології, комп'ютерної хімії, органічного синтезу та фармакології, а також комп'ютерних наук, статистики, новітніх підходів з використанням штучного інтелекту [4]. Процес розробки лікарського препарату складається з декількох стадій: ідентифікація мішені, її валідація, ідентифікація та оптимізація лідерних сполук,

преклінічні дослідження та клінічні дослідження, що проводяться в чотири стадії [5].

Починається процес розробки лікарського засобу з ідентифікації молекулярної мішені. Це – молекула в організмі, зазвичай білок, що пов'язаний з певним захворюванням та може бути використана для модуляції іншою сполукою для отримання бажаного терапевтичного ефекту [6]. Наразі репозиторій Therapeutic Targets Database налічує близько 3500 молекулярних мішеней, проте лише 461 з них отримали своє підтвердження як можливі мішені для лікарських засобів, а понад 1100 мішеней знаходиться на стадії валідації [7].

Наступним процесом після ідентифікації молекулярної мішені є її валідація. Людський геном нараховує близько 35000 генів [8], які можуть кодувати потенційні молекулярні мішені. Але це не враховуючи того факту, що інфекційні хвороби, що спричиняються патогенними організмами (вірусами, бактеріями чи найпростішими) також мають геноми, що кодують потенційні молекулярні мішені. Таким чином, перевірка таких кількостей мішеней за допомогою «мокрого» експерименту фактично є неможливою, тому на цьому етапі також застосовуються методи комп'ютерного моделювання.

Коли нарешті отримано валідовану молекулярну мішень, наступним процесом є пошук біологічно активних сполук відносно неї. Однак наразі відомо близько  $10^{60}$  сполук, що можуть стати потенційними лікарськими засобами [9]. Вражаюча кількість сполук, більшість з яких не синтезовані і навряд чи колись будуть. Але це не означає, що їх не потрібно перевіряти. Таким чином було розроблено низку методів віртуального скринінгу, методології, що дозволяє оцінювати імовірність тієї чи іншої сполуки проявляти активність щодо молекулярної мішені, яка нас цікавить. Сполуки, які отримали високу оцінку при комп'ютерному моделюванні є сенс синтезувати та перевіряти біологічну активність в експерименті *in vitro* [10].

При наявності біологічно активної сполуки або краще серії біологічно активних сполук постає необхідність в оптимізації їхніх властивостей, зокрема покращення афінності активних сполук щодо цільової молекулярної мішені,

покращення фізико-хімічних властивостей та оптимізація ADME/Tox властивостей сполуки. Це стадія оптимізації лідерних сполук. Оптимізація проводиться шляхом поєднання *in silico* та *in vitro* методів, методів органічного синтезу [11]. По суті під час цієї фази відбувається декілька циклів комп'ютерних експериментів, органічного синтезу та біохімічних випробувань, під час яких досинтезуються нові похідні активної сполуки та відсіюються менш ефективні сполуки. У результаті дослідники отримують повну картину залежності активності від структури сполук в контексті взаємодії з молекулярною мішенню та метаболізму в цілому [12].

Після стадії оптимізації лідерних сполук, необхідно перевірити токсичність розроблених сполук перед тим як тестувати препарат на людях. Це стадія преклінічних досліджень, під час якої відбувається розробка синтезу та рецептури лікарського засобу. Тестування на тваринах дозволяє визначити токсичність лідерних сполук, а також, визначення дозування для перших тестів у клініці [13].

Останній і найбільший рубіж, що має здолати сполука перед тим як стати лікарським засобом – це клінічні випробування. Процес із чотирьох стадій з жорстким протоколом, метою якого є встановлення дозування, побічних ефектів, фармакодинаміки та фармакокінетики кандидатів в лікарські засоби. Варто зазначити, що препарати, які перебувають на останній (IV) фазі клінічних випробувань, доступні в аптеках, але за їхніми побічними діями продовжують слідкувати експерти, тож лікарський засіб може бути відкликаний вже після процесу масового виробництва та продажу [14].

Незважаючи на такий короткий опис стадій розробки лікарських засобів, цей процес і досі триває десятиліттями, щорічно фармацевтична індустрія витрачає понад 50 мільярдів доларів США на розробки.

## **1.2. Комп'ютерні методи розробки лікарських засобів**

Комп'ютерні методи раціонального моделювання біологічно активних сполук діляться на дві великі групи: структурно-орієнтовані (рецепторно-

орієнтовані) методи та ліганд-орієнтовані методи. Перші базуються на знанні тривимірної структури молекули-мішені (ензима, рецептора чи молекули нуклеїнових кислот) та побудові на основі їхніх моделей для скринінгу лігандів з подальшим синтезом, біологічним тестуванням та оптимізацією. При ліганд-орієнтованому підході моделі будуються на базах хімічних сполук з максимально різноманітною структурою, але відомою активністю відносно конкретної мішені або групи мішеней.

Ці методи використовуються як окремо один від одного, так і в поєднанні, при чому комбінування цих підходів значно покращує ефективність моделювання та підвищує вірогідність знаходження сполуки хітів. [3]

### **1.2.1. Рецепторно-орієнтовані методи розробки лікарських засобів.**

Використання знань про тривимірну (3D) структуру молекулярної мішені, а саме сайту зв'язування, є основою рецепторно-орієнтованого підходу в розробці ліків. Відповідно до цього ідентифікація молекулярної мішені та отримання знань про її тривимірну структуру є першочерговим етапом розробки.

Технологічний прогрес таких методів як рентгенівської кристалографії, ядерного магнітного резонансу (ЯМР) та кріо-електромікроскопії сприяло накопиченню інформації про тривимірну структуру різноманітних макромолекул. Таким чином було сформовано Protein Data Bank (PDB) – базу даних тривимірних структур. Згодом почав розвиватись напрям цифрового аналізу цих даних, зокрема, розробка алгоритмів гомологічного моделювання просторової структури, молекулярної динаміки та віртуального скринінгу [3].

Станом на сьогоднішній день, відсутність тривимірної структура молекулярної мішені в відповідних базах даних не є критичною для застосування рецепторно-орієнтованого підходу. У випадках, коли структура молекулярної мішені не була визначена експериментальним шляхом, на допомогу приходять методи передбачення, що базуються на знаннях про послідовність білка. Існують два найбільш розповсюджених методи побудови тривимірної структури молекулярної мішені: *ab initio* (група методів, що базується виключно на первинній

структурі мішені (тобто амінокислотній або нуклеотидній послідовності)) [15] та гомологічне моделювання (група методів, що для передбачення тривимірної структури мішені використовує відому структуру схожого білка чи нуклеїнової кислоти) [16].

При гомологічному моделюванні необхідно знайти білок з відомою третинною структурою. Це можна зробити, використовуючи алгоритми порівняння послідовностей NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [17]. Білок із відомою структурою використовується як шаблонний при побудові моделі.

Принципову відмінність від гомологічного моделювання мають методи *ab initio* або *de novo* моделювання. Вони використовуються, коли 3D-структура гомологічного білка теж не відома. Методи *de novo* моделювання використовують виключно відомості про послідовність білка для побудови третинної структури. Оскільки такий вид моделювання потребує значних обчислювальних ресурсів, частіше тривимірну структуру будують за гомологією [18].

Знаючи 3D-структуру молекулярної мішені, необхідно визначити сайт зв'язування, для якого буде проводитись віртуальний скринінг. В ідеалі – це западина або увігнута область, що містить декілька функціональних груп для взаємодії з лігандом. Як правило сайт зв'язування більший за інші кишені, які можна ідентифікувати у мішені. У 83% ферментів, що складаються з одного ланцюга, ліганд зв'язується з амінокислотними залишками найбільшої кишені на поверхні білка [19].

Джерелом інформації для рецепторно-орієнтованого підходу можуть бути просторові структури молекулярної мішені разом з природнім субстратом або з уже відомим інгібітором, отримані методом рентгеноструктурного або ЯМР-аналізу. Ключові амінокислотні залишки можна ідентифікувати безпосередньо, вивчаючи просторову структуру молекулярної мішені з природнім субстратом, або відомою активною речовиною, або з використанням підходу сайт-направленого мутагенезису [20].

Якщо інформації про сайт зв'язування немає, постає необхідність проводити додаткові дослідження. Наразі існує ряд розрахункових методів, що

здатні передбачати сайт зв'язування. Серед них: PASS [21], Q-SiteFinder [22], MDPocket [23], POOL [24], та ін. Ці методи діляться на дві великі групи: ті, що базуються на геометрії та ті, що опираються на енергію зв'язування. Проте слід пам'ятати, що всі ці розрахункові методи можуть бути корисними в пошуку сайтів зв'язування, однак якість результату залежить від низки факторів і може трактуватись виключно як прогнозована і така, що потребує підтвердження в тестуванні *in vitro* [25].

Рецепторно-орієнтовані методи розробки ліків діляться на два типи. Перший – *de novo* базується на підборі малих фрагментів, що якнайкраще взаємодіють з сайтом зв'язування, з подальшим лінкуванням цих фрагментів в цілісну молекулу. Таким чином з невеликих фрагментів формується принципово нова сполука, що потім синтезується для подальшого *in vitro* скринінгу. Окремо варто зазначити, що зараз починають створюватись методології на основі штучного інтелекту, при яких потенційні сполуки-хіти генеруються з «нуля» на основі характеристик сайту зв'язування та відомих інгібіторів [26, 27]. Другий метод – це віртуальний скринінг бібліотек малих органічних молекул.

**1.2.1.1. Молекулярний докінг.** Найбільш відомим та широко застосованим рецепторно-орієнтованим методом є молекулярний докінг. Одна із перших праць, що описує його алгоритми датується 1980-ми роками, і наразі існує низка програм, що застосовують різні алгоритми молекулярного докінгу, серед них AutoDock4 [28], GOLD [29] Glide [30], та FlexX [31]. Ціллю даного методу є передбачення способу взаємодії сполуки з конкретним сайтом зв'язування та афінності комплексу ліганд-білок. Кількісна оцінка взаємодії обраховується скоринговою функцією, яка на основі розрахунків взаємодії молекули ліганду з хімічно-активними групами сайту зв'язування кількісно виражає силу цієї взаємодії. З цього виходить, що ретельність оцінки взаємодії та точності ранжування результатів є ключовим етапом віртуального скринінгу. Найбільш відомі скорингові функції можна розділити на три великі групи: 1) на основі силових полів; 2) емпіричні та 3) ті, що використовують дані з трейнінгових сетів [32].

У цій роботі використовувався пакет молекулярного докінгу AutoDock4, що використовує комбіновану скорингову функцію оцінки афінності ліганда з мішенню.

#### **1.2.1.2. Ліганд-орієнтовані методи розробки лікарських засобів.**

Незважаючи на те, що Protein Data Bank нараховує понад 174 тисячі структур різноманітних макромолекул (<https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>), існує великий пул вже відомих молекулярних мішеней для лікарських препаратів, 3D-структура яких невідома та не може бути передбачена методами гомологічного або *de novo* моделювання. Альтернативою стають методи ліганд-орієнтованого моделювання активних сполук, в основі яких лежить дані, що зв'язуються з певною молекулярною мішенню [33].

Умовно ліганд-орієнтовані методи можна розділити на три групи: методи, що базуються на схожості, фармакофорне моделювання та QSAR (quantitative structure–activity relationship) моделювання.

Основа методів, що базуються на подібності лігандів – це використання фінгерпринтів, що описують фізико-хімічні та структурні особливості відомих ліків. На основі цих знань виконується пошук сполук із схожими властивостями, що ймовірно матимуть подібний механізм дії [3].

Фармакофорне моделювання – це група методів, при яких будують моделі на основі структур відомих активних сполук. Унікальною особливістю такого моделювання є те, що фармакофорні моделі можна покращувати маючи знання про тривимірну структуру білка-мішені [34].

QSAR (quantitative structure–activity relationship) моделювання використовує статистичну кореляцію біологічної активності до різноманітних дескрипторів, що описують молекулу ліганда. Основою цих методів є твердження, що структурно подібні сполуки проявлять схожу біологічну активність [35].

Варто зазначити, що в розробці лікарських засобів широко використовуються алгоритми машинного навчання. Воно може використовуватись в побудові QSAR моделей, в алгоритмах передбачення способу зв'язування ліганда

з молекулярною мішенню, при молекулярному докінгу, а також при розрахунках афінності комплексу ліганд-рецептор [36, 37].

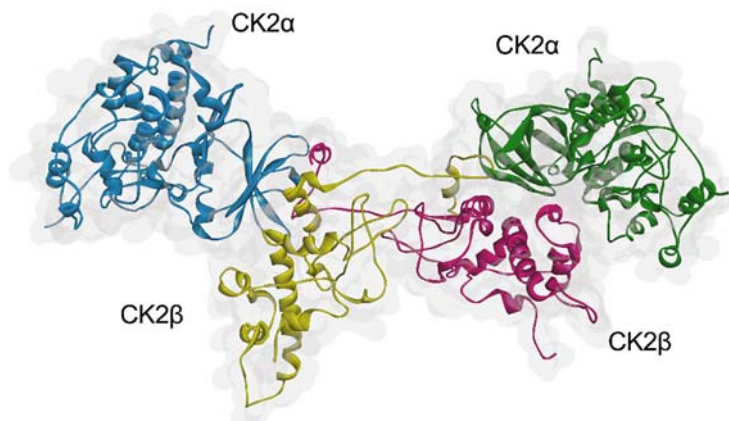
### 1.3. Протеїнкіназа СК2

Протеїнкіназа СК2 (традиційна назва казеїн кіназа II (від англійського «casein kinase 2»)) була вперше знайдена в 1954 році і є однією з перших досліджених кіназ. Першим дослідженим субстратом даного ензиму був казеїн, саме від нього була дана назва казеїн кіназа. Але подальші дослідження показали, що СК2 фосфорилує казеїн лише *in vitro* і не здатна робити це в організмі [38].

СК2 належить до родини кіназ CMGC. Це родина серин/треонінових протеїнкіназ (CDK, MAPK, GSK3 та CLK), що беруть участь в регуляції таких процесів як клітинний ріст, відповідь на стресові фактори, клітинний цикл, сплайсинг та метаболізм. Унікальність СК2 полягає в тому, що вона є конститутивно активною серин/треоніновою кіназою. Дана протеїнкіназа є убіквістичною, тобто зустрічається у всіх компартментах клітини. На сьогодні відомо щонайменше 307 білкових субстратів СК2, а за даними Беіна СК2 може фосфорилувати 605 сайтів в 356 білкових субстратах [39]. Серед них: більше третини залучені в експресію генів та білковий синтез, велика кількість транскрипційних факторів, структурних ефекторів ДНК та РНК, трансляційні елементи, сигнальних білків, вірусних білків та білків, що є ключовими для їхнього життєвого циклу. Не дивно, що об'єднавши в собі таке різноманіття розташування та субстратів, протеїнкіназа СК2 є однією з найбільш цікавих терапевтичних мішеней. Чисельні дослідження повідомляють про причетність СК2 до розвитку ряду патологій, зокрема, кардіоваскулярних та ракових захворювань, неройдегенеративних хвороб (хвороби Альцгеймера та Паркінсона, ішемія мозку) та вірусних інфекцій [40].



**1.3.1. Структура протеїнкінази СК2.** Вперше СК2 була закристиалізована Ніфіндом та колегами в 2001 році (кристал в RCSB PDB з кодом 1JWH) [41] (див. рис 1.1).



**Рис. 1.1.** Згальна будова холоензиму протеїнкінази СК2, адаптовано до [41]

Протеїнкіназа СК2 людини це тетрамер, що складається з двох каталітичних ( $\alpha$ ) та двох регуляторних ( $\beta$ ) субодиниць. Наразі відомо три ізоформи каталітичних субодиниць  $\alpha$ ,  $\alpha'$  та  $\alpha''$  і лише одна регуляторна ізоформа  $\beta$  (проте, наприклад, у *Saccharomyces cerevisiae* ідентифіковані множинні ізоформи СК2 $\beta$ ) [42]. Тетрамер протеїнкінази СК2 може містити дві однакових каталітичні субодиниці (СК2 $\alpha$ СК2 $\alpha$ СК2 $\beta$ СК2 $\beta$  та СК2 $\alpha'$ СК2 $\alpha'$ СК2 $\beta$ СК2 $\beta$ ) та різні – СК2 $\alpha$ СК2 $\alpha'$ СК2 $\beta$ СК2 $\beta$  [43]. Субодиниці холоензиму мають здатність до самозбирання в умовах *in vitro*. Така властивість вказує на те, що цей механізм запрограмований в первинній структурі білка. Також цікаво зазначити, що афінність СК2 $\alpha$  до СК2 $\beta$  в 12 разів вища ніж СК2 $\alpha'$ . Це пояснює, чому в організмі переважають комплекси саме СК2 $\alpha$  з СК2 $\beta$ .

СК2 $\alpha$  і СК2 $\alpha'$  кодуються різними генами та розташовані у різних хромосомах, але мають послідовність з 90% ідентичністю. Довжина амінокислотних послідовностей каталітичних субодиниць  $\alpha$  та  $\alpha'$  людини 391 та 350 залишків відповідно. Їхні розміри після очищення *in vitro* менші, ніж їхні теоретичні молекулярні маси (45,144 та 41,213 кДа), внаслідок модифікації протеолітичного розщеплення на С-кінці [41, 44].

Каталітична субодиниця СК2 має типову для еукаріотичних протеїнкіназ архітектуру [45, 46]. Тобто складається з двох доменів: N-термінальний, основою

якого є  $\beta$ -складчасті структури та С-термінальний з  $\alpha$ -спіралей. Активний сайт розташований у розриві між двома доменами [41, 44-46].

На основі аналізу 478 відомих ферментів типова протеїнкіназа має висококонсервативний каталітичний домен, що формується залишками приблизно 300 амінокислот. Він виконує три основні ролі:

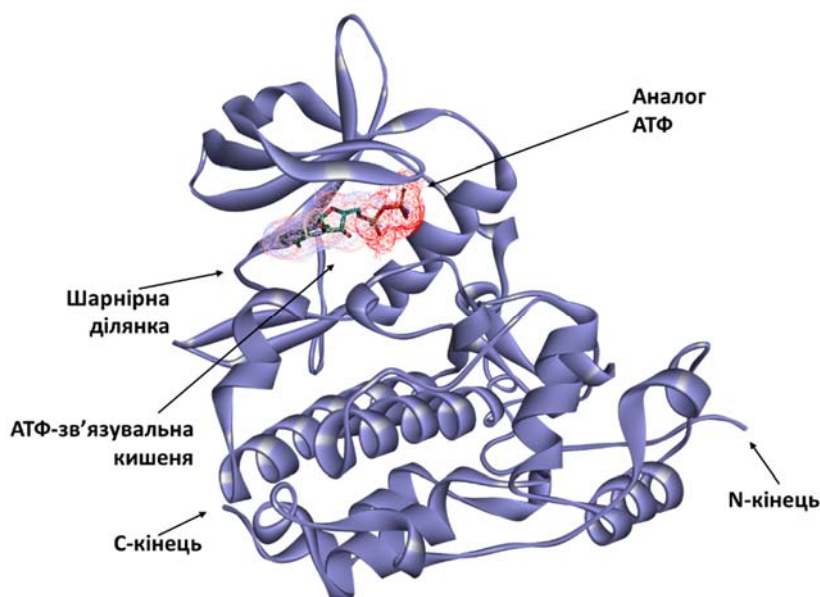
1. Взаємодія із донором фосфату (частіше всього ним виступає АТФ) в комплексі з двовалентним металом (зазвичай  $Mg^{2+}$  або  $Mn^{2+}$ );
2. Взаємодія з білковим субстратом;
3. Перенесення  $\gamma$ -фосфату з нуклеотидтрифосфату на гідроксильний фрагмент акцепторного амінокислотного залишку субстрату.

Субодиниця  $\beta$  набагато менша ніж  $\alpha$  (близько 25 кДа), однак згідно даних кристалографічного аналізу, димер саме цих субодиниць становить каркас структури тетрамера СК2 [47]. N-кінцевий домен СК2 $\beta$  складається з  $\alpha$ -спіралей. Чотири цистеїни (cys109, cys114, cys137 та cys140), що розташовуються на С-кінцевому «хвості» СК2 $\beta$ , утворюють цинкові пальці, структуру подібну до такої, що є у ДНК зв'язувальних білків. Йони Zn відіграють важливу роль в утворенні тетрамеру [48]. Мутації Cys109 та Cys114 призводять до порушення взаємодії субодиниць.

Важливо наголосити на тому, що *in vitro* вільна СК2 $\alpha$  є активною. Це означає що СК2 $\beta$  не відіграє роль «вимикача», як це є у інших кіназ (наприклад CDK2) [49].

**1.3.2. Будова АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2.** Як вже було зазначено, АТФ-акцепторна ділянка протеїнкінази СК2 знаходиться між двома доменами (рис. 1.2). N-кінцевий, що складається з 5 антипаралельних  $\beta$ -стрендів і однієї  $\alpha$ -спіралі, та С-кінцевий, що складається переважно з  $\alpha$ -спіралей. Ці домени з'єднуються між собою ланцюгом з 6-9 амінокислотних залишків (так званім хіндж-регіоном або шарнірною ділянкою), яка, в свою чергу, закінчується амінокислотним залишком, який називається гейткіпер [50] (від англійського

«gatekeeper» - воротар, сторож). У протеїнкінази СК2 цю роль виконує амінокислота Phe113.



**Рис. 1.2.** Розташування АТФ-зв'язувальної кишені в субодиниці СК2 $\alpha$  разом із аналогом АТФ. Рисунок зроблений з кристалічної структури, що взята з PDB databank [94]

АТФ зв'язувальний сайт містить гліцин-збагачену петлю, яка у більшості кіназ виглядає так: «G-X-G-X-X-G». Унікальність СК2 полягає в тому, що третій гліцин замінений на Ser51, що є абсолютно консервативним для СК2. Ще однією характерною відмінністю СК2 від інших протеїнкіназ – наявність Val66 та Trp176 замість аланіну та фенілаланіну, як у більшості протеїнкіназ [51].

Завдяки цим заміщенням АТФ-зв'язувальна ділянка СК2 є більшою, ніж у інших кіназ. Така особливість робить можливим використання ГТФ, як косубстрат, так само добре, як і АТФ [52].

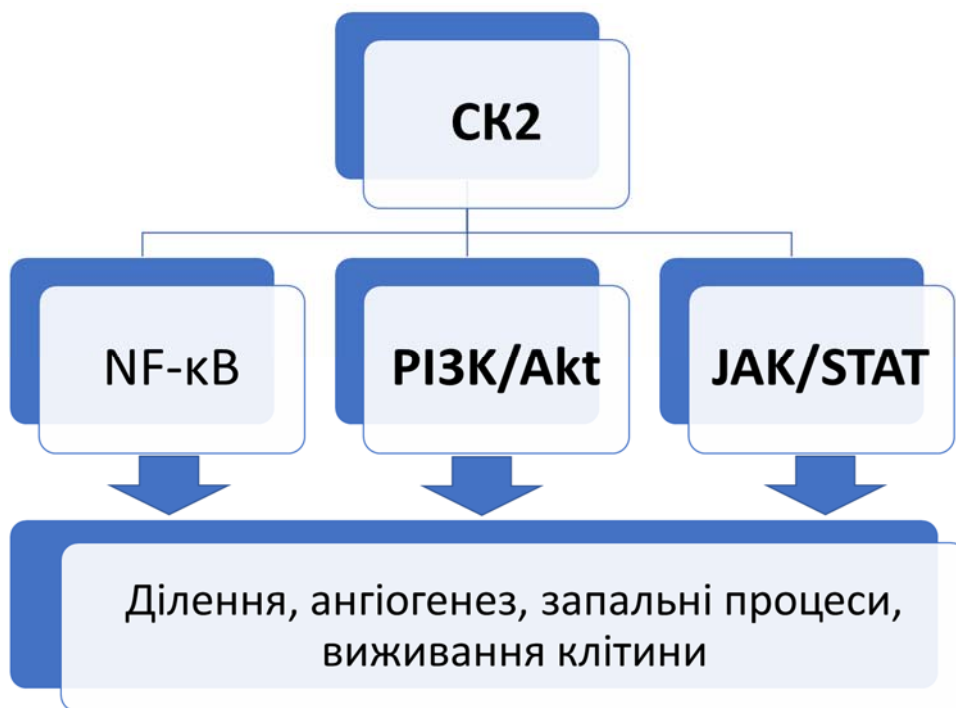
Трекслер створив ефективну фармакофорну модель АТФ-акцепторного сайту протеїнкіназ, що також підходить для створення інгібіторів СК2. Фармакофорна модель складається з шарнірної ділянки та гейткіпера, трьох гідрофобних ділянок: аденін-зв'язувальна ділянка, гідрофобна ділянка I та II; та двох гідрофільних ділянок: кишеня, де розташовується залишок цукру, та ділянка зв'язування фосфору. Розмір амінокислотного залишку гейткіпера визначає розміри гідрофобних ділянок I та II, а отже визначає селективність [53].

Гідрофобний регіон I формують амінокислотні залишки Leu85, Ile95, Leu111, Phe113, Ile174, гідрофобний регіон II – з Leu45 та His115, а аденін-зв'язувальну ділянку – Val53, Val66, Val116 і Met163. Шарнірну ділянку

утворюють амінокислотні залишки Val116 та Glu114, а гейткіпером виступає Phe113.

Відповідно, оскільки значну частину АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2 формують гідروفобні залишки амінокислот, гідروفобність інгібіторів СК2 є важливою складовою активності [54]. Однак високі значення LogP є неприпустимі при розробці сполук як лікарських засобів. Тому в цій роботі будуть застосовуватись метрики, які поєднують афінність сполук з параметром LogP для оцінки їхньої ефективності.

**1.3.3. Функцій протеїнкінази СК2 (протеїнкіназа СК2 як мішень для розробки ліків).** Протеїнкіназа СК2 при різних умовах може розташовуватись в усіх компартментах клітини. Зокрема було показано локалізацію СК2 в ядрі клітини між хроматином та ядерним матриксом, що засвідчує залученість СК2 навіть в регуляцію експресії генів. Високу концентрацію СК2 помічено також при мітозі, що характерно для процесів росту, як нормальних, так і в патологічних клітинах (тобто в ракових пухлинах). Також дана протеїнкіназа залучена до регуляції процесів деградації протеїнів (рис. 1.3) [55].



**Рис. 1.3.** Схема залучення протеїнкінази СК2 в важливі клітинні процеси, адаптовано до [55]

Залученість до регуляції низки сигнальних каскадів, таких як Wnt, NF-κB, ЯК / STAT та PTEN/PI3K/Akt-ПКВ робить СК2 однією з ключових протеїнкіназ як для виживання клітини (організму), так і для розвитку патологічних процесів [56].

Так, наприклад, у мишачих ембріонів піком активності СК2 є 12 день вагітності та різко падає після народження. При делеції СК2α ембріони гинуть після 11 днів вагітності, а при делеції СК2β – після 6,5днів. Цікаво також відмітити, що при делеції СК2α' мишачі ембріони виживають, але самці, що розвивались без СК2α', стають нездатними до розмноження.

Іншою стороною підвищеної активності СК2 в клітинах, що активно діляться, є залученість СК2 до розвитку онкогенних захворювань. Наразі доведено залученість СК2 до розвитку таких ракових захворювань як рак легень, уротеріальна карцинома, рак сечового міхура, плоскоклітинний рак голови та шиї, злоякісна мезотеліома, гепатоцелюлярний рак, аденокарцинома шлунку, аденокарцинома та плоскоклітинна карцинома стравоходу, холангокарцинома, колоректальний рак, рак підшлункової залози, гліобластома, меланома, рак

яєчників та простати, рак молочної залози, лейкемія, мієлома, лімфома та ін. [56]. В таблиці 1.1 наведено рівень експресії субодиниць СК2 при різних видах ракових захворювань.

*Таблиця 1.1.*

**Рівень експресії СК2 при різних видах ракових захворювань [56]**

Тип раку	Рівень експресії СК2
Карцинома легень	СК2 $\alpha$ , СК2 $\alpha'$ та СК2 $\beta$ ↑
Карцинома молочної залози	СК2 $\alpha$ , СК2 $\beta$ ↑, СК2 $\alpha'$ ↓
Уротеліальна карцинома	СК2 $\alpha$ ↑
Карцинома голови та ший	СК2 $\alpha$ , СК2 $\alpha'$ та СК2 $\beta$ ↑
Месотеліома	СК2 $\alpha$ ↑
Гепатоцелюлярна карцинома	СК2 $\alpha$ та СК2 $\alpha'$ ↑
Карцинома шлунку	СК2 $\alpha$ ↑
Карцинома стравоходу	СК2 $\alpha$ ↑
Холоангіокарцинома	СК2 $\alpha$ та СК2 $\beta$ ↑
Меланома	СК2 $\alpha$ ↑

**1.3.4. Інгібування протеїнкінази СК2.** Інгібітори протеїнкіназ класифікують відповідно до їхнього способу зв'язування з ферментом. Класично всі інгібітори даного типу ферменту розділяють на три групи.

*Інгібітори першого типу.*

Більшість розроблених інгібіторів протеїнкіназ належать саме до цього типу. Сполуки I типу інгібування є АТФ конкурентними інгібіторами і зв'язуються з АТФ-акцепторним сайтом активної форми протеїнкінази. Для інгібіторів I типу є характерним водневий зв'язок із шарнірною ділянкою. В цілому взаємодію можна описати фармакологічною моделлю Тракселра [53]. Оскільки інгібітори є АТФ-конкурентними, а сайт зв'язування із АТФ є висококонсервативним, селективності досягати дуже важко.

*Інгібітори другого типу.*

Інгібітори цього типу зв'язування проявляють афінність до неактивної форми протеїнкінази. Інгібітор взаємодіє з АТФ-акцепторним сайтом як інгібітори першого типу є АТФ-конкурентними, але зв'язок із шарнірною ділянкою не є обов'язковим. Взаємодія з інгібітором призводить до значних конфірмаційних змін в структурі білка, відкритті глибокої гідрофобної кишені, взаємодія з якою визначає цей тип інгібування. Наразі відомо що лише деякі протеїнкінази можуть мати інгібітори другого типу.

#### *Інгібітори третього типу.*

Сполуки цього типу інгібування не є АТФ-конкурентними і взаємодіють з алостеричним сайтом протеїнкінази. Оскільки алостеричні сайти є специфічними для кожної кінази, інгібітори такого типу зв'язування можуть проявляти високу селективність, на відміну від АТФ-конкурентних інгібіторів I та II типу [38, 50].

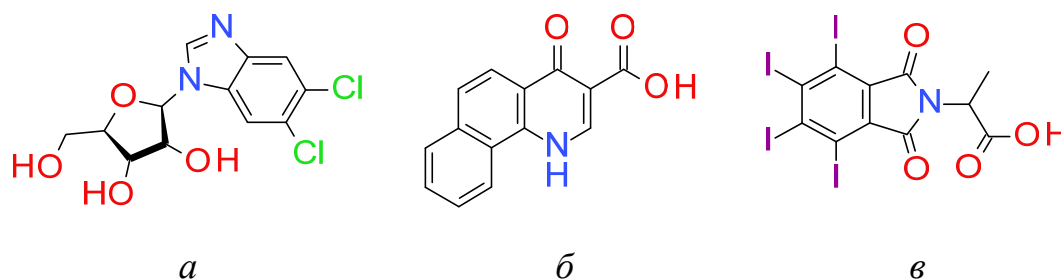
**1.3.4.1. Огляд інгібіторів протеїнкінази СК2.** Як вже зазначалось, протеїнкіназу СК2 було вперше досліджено в 1954 році. Однак перший інгібітор СК2 був описаний лише у 1986 році (5,6-дихлоро-1(b-D-рибофураносил)бензімідізол (рис. 1.4, a). За наступні понад 30 років було розроблено понад 1000 (за даними бази даних ChEMBL) сполук, що здатні інгібувати СК2. Переважна більшість цих сполук є АТФ конкурентними інгібіторами I типу. І лише одна почала проходити перші стадії клінічних досліджень [38].

Особливу увагу необхідно звернути на розробки лабораторії відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом доктора хімічних наук, професора Ярмолюка С.М., адже саме ця лабораторія розробила перший запатентований інгібітор даної кінази (2004 рік) (див. рис. 1.4, б, в) [57, 58]. В ході досліджень співробітником цієї ж лабораторії було створено наступну концепцію «ідеального інгібітора» протеїнкінази СК2:

1. Наявність локалізованого між гідрофобними залишками амінокислот Phe113, Ile174 та Val66 жорсткого як мінімум двох конденсованих ароматичних кілець.

2. Наявність донорно-акцепторних груп, що зможуть розташовуватись в ділянці амінокислотних залишків Lys68, Asp175, Glu81, для утворення міжмолекулярних водневих зв'язків.

3. Відсутність розгалужених та об'ємних замісників. Кількість обертальних зв'язків має бути обмеженою до 2-3. На конденсованих кільцях мають бути донорно-акцепторні групи, спрямовані в сторону шарнірної ділянки для формування міжмолекулярних водневих зв'язків з амінокислотними залишками Val116 або/та Glu114 [54].

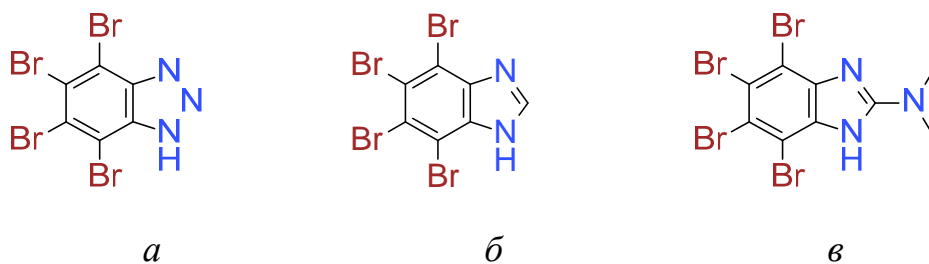


**Рис. 1.4.** Структури інгібіторів протеїнкінази СК2 5,6-дихлоро-1(β-D-рибофураносил)бензімідазолу (а), 3-карбоксо-4(1H)-хінолону (б) та 4,5,6,7-тетрагалогено-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діону (в), адаптовано до [38, 57, 58]

За даними PubMed в останні 20 років було надруковано понад 190 статей, в заголовках яких згадується формулювання «інгібітор(-и) СК2». Це свідчить про значний інтерес наукової спільноти до розробки інгібіторів даної протеїнкінази.

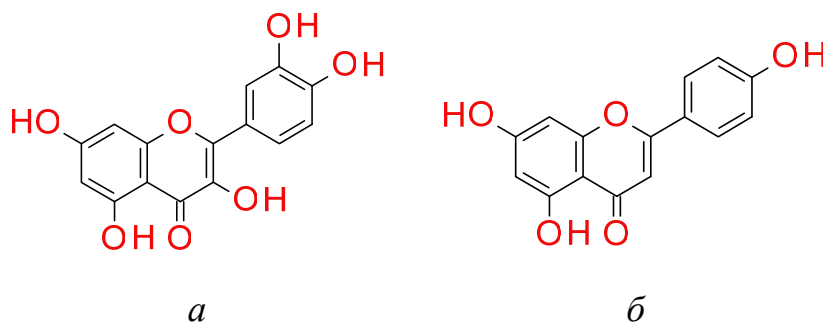
Першим описаним інгібітором СК2 був 5,6-дихлоро-1-(β-D-рибофуранозил)-бензімідазол (скорочено DRB). Цей галогенизований рибонуклеозид з  $K_i$  4,5 мкМ був описаний у 1986 році та став першим з чисельних похідних бензімідазолів, що проявляють інгібувальну активність відносно СК2 [59]. Пізніше ідентифікували ще два інгібітори СК2 серед похідних цього класу сполук: 4,5,6,7-тетрабромомбензтріазол (ТБВ) (рис. 1.5, а) та 4,5,6,7-тетрабромобензімідазол (ТБІ) (рис. 1.5, б). Варто зазначити, що ТБІ є більш ефективним, ніж ТБВ. Найбільш ефективним інгібітором серед похідних ТБІ є 4,5,6,7-тетрабромом-2-(диметиламіно)бензімідазол (DMAT) (рис. 1.5, в). Його  $K_i$  становить 0,04 мкМ та на відміну від ТБВ він не проявляє побічних ефектів на мітохондрії до концентрації в 10 мкМ [60, 61].





**Рис. 1.5.** Структури інгібіторів протеїнкінази СК2 4,5,6,7-тетрабромомбензотріазолу (*a*), 4,5,6,7-тетрабромобензімідазол (*б*) та 4,5,6,7-тетрабромом-2-(диметиламіно)бензімідазол (*в*), адаптовано до [60, 61]

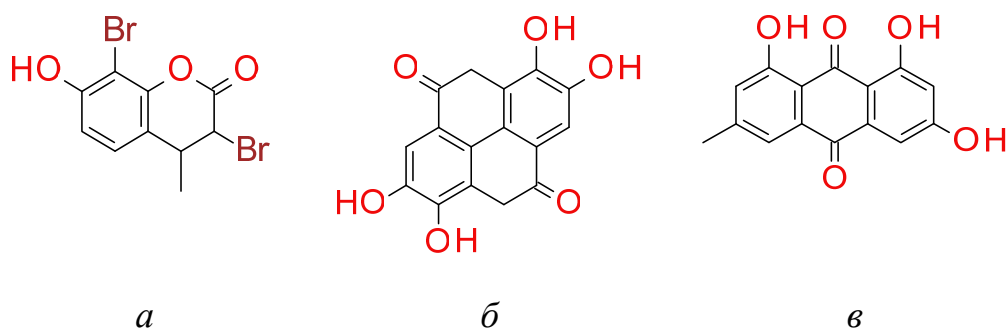
Важливою групою інгібіторів протеїнкінази СК2 є похідні флавоноїдів, кумаринів та антрахінонів. Серед природних флавоноїдів найбільш відомими інгібіторами СК2 є кварцетин та епігенін (рис. 1.6). Проте слід зазначити, що флавоноїди мають широку біологічну активність серед багатьох ферментів, тому пов'язувати клітинну відповідь на ці сполуки з активністю відносно СК2 повністю не можна.



**Рис. 1.6.** Структури інгібіторів протеїнкінази СК2 кварцетину (*a*) та епігеніну (*б*), адаптовано до [61, 63]

Серед похідних кумаринів найбільш представницькими інгібіторами СК2 є 3,8-дибромо-7-гідрокси-4-метилхромен-2-он (DBC) (рис. 1.7, *a*) та елагова кислота (рис. 1.7, *б*) зі значеннями  $K_i$  0,06 та 0,02 мкМ відповідно [62, 63].

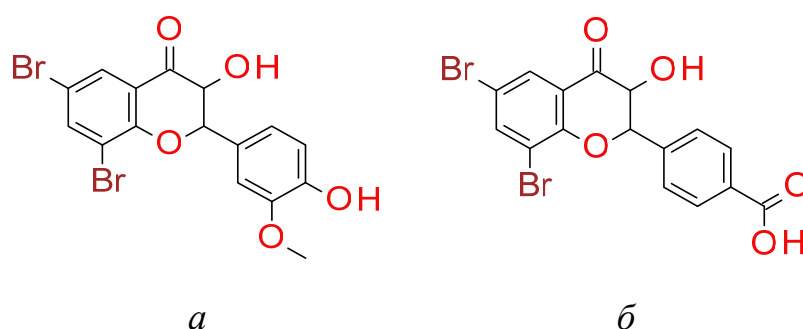
Серед похідних антрахінонів важливими представником є (1,3,8-тригідрокси-6-метил-антрахінон) або емодінін – природний засіб з протизапальною та протираковою дією.  $K_i$  емодініну становить 1,5 мкМ [64] (рис. 1.7, *в*). Кристалографічне дослідження показує, що емодінін розташовується в АТФ-зв'язувальній кишені та має спосіб зв'язування, що частково нагадує спосіб зв'язування АТФ (PDBID: 1F0Q) [65].



**Рис. 1.7.** Структури інгібіторів протеїнкінази СК2 3,8-дибромо-7-гідрокси-4-метилхромен-2-ону (*a*), елагової кислоти (*б*) та емодину (*в*), адаптовано до [62-64]

Як було сказано, флавоноїди, кумарини та антрохінони – це природні сполуки, але в контексті розгляду інгібіторів протеїнкінази СК2 не можна пропустити і їхні синтетичні аналоги, які мають активність щодо неї.

Синтетичні похідні флавону 3-гідрокси-4'-карбоксифлаволи (FNH) та 3-гідрокси-4'-карбоксифлаволи (FLC), розроблені Голубом та колегами, проявляють набагато кращий інгібувальний ефект, ніж природні аналоги. Найкращі знайдені сполуки FNH79 та FLC26 (рис. 1.8, *a*, *б*) мають значення  $K_i$  1,8 та 2,5 нМ відповідно. Як показали дослідження залежності активності від структури, то важливим для активності є донор водневого зв'язку в положенні 4', а також гідрофобні замісники в положеннях 5 та 7.

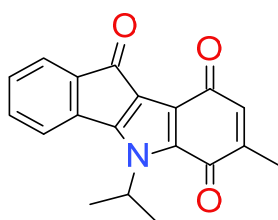


**Рис. 1.8.** Структури інгібіторів протеїнкінази СК2 FLC26 (*a*) та FNH79 (*б*), адаптовано до [66, 67]

Серед синтетичних антрохінонів варто виділити хінолізарин (1,2,5,8-тетрагідроксиантрахінон), який як і FNH79 та FLC26, був знайдений, використовуючи методи віртуального скринінгу. Хінолізарин є набагато більш

ефективнішим, ніж емодін ( $K_i = 60$  нМ) та селективнішим (проявив селективність щодо СК2 на панелі з 75 протеїназ) [66-68].

Одні з останніх досліджень інгібіторів протеїнази СК2 присвячені дослідженню похідних інденоіндолів. Сполуки цього класу мають високу активність ( $K_i = 0,128$  мкМ) (рис. 1.9) та зв'язуються із АТФ – зв'язувальним сайтом СК2, проте не формують водневого зв'язку з амінокислотними залишками шарнірного регіону [69-73].



**Рис. 1.9.** Структура інгібітору протеїнази СК2 5-ізопропіл-7-метил-5Н-індено[1,2-*b*]індол-6,9,10-тріону, адаптовано до [69]

Особливо хочеться відмітити той факт, що першими в світі запатентували інгібітор СК2 в Інституті молекулярної біології і генетики НАНУ в 2004 році. Ярмолюк та співробітники зареєстрували два патенти: «Застосування 4-заміщених 3-карбоксихінолінів як інгібіторів протеїнази СК2» та «Застосування 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів як інгібіторів протеїнази СК2». Серед карбоксихінолінів найактивніша сполука інгібувала СК2 з  $IC_{50}$  0,22 мкМ, а тетрагалогено-ізоіндоліндіонів – 0,39 та 0,15 мкМ (структури запатентованих сполук див на рис. 1.4, б) [57, 58].

Також серед запатентованих інгібіторів СК2 є:

- 2-диметиламіно-4,5,6,7-тетрабромобензімідазоли, найкращий з яких проявляв інгібувальну активність щодо СК2 з  $K_i$  0,04 мкМ. [74]
- піразолопіримідини та пірамідони [75, 76].
- 4,4'-біс(8-гідроксі-5-сульфо-7-хіноліназо) стілбен-2,2'-дисульфонічної кислоти (хінобен), 4,4'-[(1-гідроксі-4-сульфо-2-нафтил)азо]-2,2'-стілбендисульфонічної кислоти (нафтобен) та ССВ8 з  $IC_{50}$  0,13, 0,30 and 0,60 мкМ [77].
- похідні конденсованих піримідинів як інгібітори СК2.  $IC_{50}$  найкращої сполуки 0,67 мкМ [78, 79].

- родина інгібіторів протеїнкінази СК2, до якої належить сполука СХ-4945, яка інгібує СК2 з  $IC_{50}$  2 нМ та наразі проходить клінічні випробування [80].
- похідні індохінолаксин карбоксильної кислоти, один з яких показав інгібувальну активність щодо СК2 з  $IC_{50}$  2,6 нМ та селективність на панелі з 6 кіназ (PKA, PKC, ERK2, S6K1, Src, САМК1) [81].
- похідні бензофуранону як інгібітори СК2. Найбільш ефективна сполука – TF з  $IC_{50}$  30 нМ [82].
- Інгібітори на основі піролотрізинового скафолду. Найкращий інгібітор мав  $IC_{50}$  30 нМ щодо СК2 $\alpha$  та 2,2 нМ СК2 $\alpha'$  [83].

Вищезгадані патенти були описані в огляді Коза та ін. в 2012 році [84]. За даними Google Patent з 2012 до 2020 року було задекларовано ще кілька патентів інгібіторів протеїнкінази СК2 [85-87].

Таким чином, не дивлячись на понад тридцятирічну історію дослідження інгібіторів протеїнкінази СК2, наразі лише СХ-4945 пройшов перші стадії клінічних досліджень.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

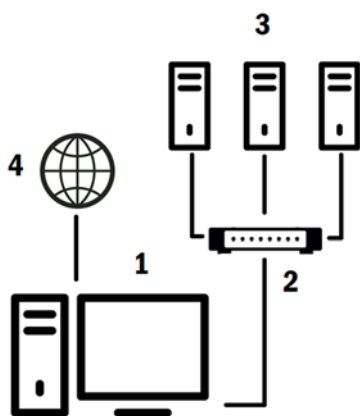
#### 2.1. Молекулярне моделювання

Як описувалось в попередньому розділі, раціональна розробка лікарських препаратів – багатостадійний процес. В свою чергу віртуальний скринінг можна розділити на ряд послідовних етапів: підготовка лігандів та молекули рецептора, проведення молекулярного докінгу, ранжування результатів, візуальна оцінка та остаточний відбір сполук для біохімічного тестування. Також в цій роботі окрім молекулярного докінгу застосовувався метод фармакофорного моделювання, що також містить в собі етапи підготовки лігандів, рецептору, створення фармакофорних моделей для скринінгу та їхньої оцінки, і, відповідно, сам фармакофорний скринінг. Більшість підготовчих етапів та віртуальний скринінг проводився в середовищі Linux, а саме в операційній системі Ubuntu дестрибутив 14.1.

Також зазначалось, що віртуальний скринінг – ресурсоємний процес, тому задля пришвидшення розрахунків було створено комп'ютерний.

Комп'ютерний кластер було створено на базі архітектури BEOWULF (загальна схема показана на рис. 2.1) [88]. Вона була обрана через просту побудову та можливість розширення потужностей кластера шляхом приєднання додаткових нод. Кластер складається з однієї головної ноди, робочих нод та вузла зв'язку. Головна нода виконує керуючу функцію та є місцем зберігання робочих файлів та файлів операційної системи. Робочі ноди містять лише операційну пам'ять та процесори, на яких проводяться розрахунки.

Операційною системою на обчислювальному кластері слугує Ubuntu 14.04. Розпаралелення аргументів на потоки проводилось програмним забезпеченням [89].



**Рис. 2.1.** Класична схема кластеру з архітектурою BEOWULF: 1 – головна нода; 2 – вузол зв'язку; 3 – робоча нода; 4 – вихід в інтернет

**2.1.1. Молекулярний докінг.** Для рецепторно-орієнтованого напівгнучкого докінгу використовували пакети програм та AutoDock 4.2.6 [28]. Для проведення процедури молекулярного докінгу необхідно підготувати молекулу рецептора (видалити зайві молекули з PDB файлу, що взятий з Protein Data Bank [90]), створити мапи (координатні файли, які визначають кишені для докінгу та необхідні параметри для кожного атому в ліганді), підготувати колекцію сполук, що буде докуватись (розставити необхідні заряди, перевести молекули з 2D в 3D формат, перевести файли з мульти-SDF файлу чи формату \*.DB в окремі файли формату \*.MOL2 для подальшої обробки скриптом згідно процедури докінгу).

**2.1.1.1. Підготовка молекул лігандів.** Підготовка молекул лігандів для AutoDock 4.2.6 [28] проводиться з використанням трьох програм: Open Babel [91], Vega [92] та MGL Tools [93]. В першу чергу необхідно оптимізувати геометрію молекул. Ця процедура виконується програмою Open Babel [91]. Наступним кроком є розставлення атомних типів AUTODOCK, атомних зарядів Гайстейгера та видалення всіх воднів крім Гідрогенів на гетероатомах. Програма AutoDock у своїй роботі використовує файли з розширенням PDBQT, тому необхідно після всіх маніпуляцій зберегти файл саме в цьому форматі. Ці процедури виконуються в програмі MGL Tools [93], якщо треба підготувати поодинокі молекули, або в програмі Vega [92.], якщо для серії сполук.

Для проведення молекулярного докінгу для кожного ліганду необхідно мати окремий файл параметрів в форматі DPF (Dock Parametr File), де будуть зазначені

всі необхідні параметри для проведення розрахунків. Створення цих файлів виконується скриптами, що є у програмному пакеті MGL Tools.

**2.1.1.2. Підготовка молекули рецептора.** Дані про просторову структуру протеїнкінази CK2 було взято з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Мішенями для докінгу були дві просторові структури: 3NSZ [94] та 4UBA [68].

Перший етап підготовки файлу рецептора полягав в тому, що були видалені молекули води та сульфат іони. Молекула ліганду та рецептора виділені в окремі файли. Файл з молекулою ліганду буде в подальшому використаний для створення мап докінгу. Ці процедури виконувались в програмному забезпеченні від компанії BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95].

На другому етапі підготовки, використовуючи програмний пакет MGL Tools, для всіх атомів рецептору додаються атомні типи AUTODOCK, розставляються Гідрогени на всіх атомах та розраховується атомні заряди Гайстейгера. Після цього Гідрогени з не гетероатомів прибираються та файл рецептору з формату PDB переводиться у формат PDBQT.

**2.1.1.3. Створення мап для молекулярного докінгу.** Мапи докінгу визначають область, для якої будуть проводитись розрахунки, та типи атомів, які можуть бути присутні в досліджуваних лігандах. В першу чергу для створення мап необхідно визначити так званий GridBox. Це куб або паралелепіпед, що визначає область для докінгу. В даній роботі GridBox визначався як центр молекули ліганду, що знаходилась в файлі з просторовою структурою, а розмір визначався так, щоб були захоплені всі амінокислотні залишки, що відіграють ключову роль для активності та селективності. На наступному етапі створення мап визначаються всі атоми, які будуть присутні в молекулах лігандів, що будуть скринінгуватись. В даній роботі ці атоми були такими: C, O, N, P, Br, Cl, F, H, I, S. Зазначення параметрів GridBox та типів атомів відбувається в програмному забезпеченні MGL Tools.

Безпосереднє створення файлів мап для докінгу проводиться програмою AUTOGRID.

**2.1.1.4. Гнучкий докінг.** AutoDock – мультиплатформенна програма, що працює як в середовищі Windows, так і Linux, але оскільки комп’ютерний кластер побудований на базі системи Linux, всі наступні розрахунки проводились з використанням скриптів, написаних на мові BASH. Програма AutoDock одночасно запускала на 48 ядрах, розраховуючи 48 лігандів.

Параметри за якими проводився віртуальний скринінг описані в таблиці 2.1.

*Таблиця 2.1*

**Значення змінних в файлі параметрів програми AutoDock**

<b>Параметр (оригінальна назва в файлі DPF)</b>	<b>Значення</b>
Крок поступального руху (Translation step)	2 Å
Кут кватерніону (Quaternion step)	50°
Торсійний кут (Torsion step)	50°
Коефіцієнт торсійної свободи (Torsional degrees of freedom and coefficient)	2 / 0.274
Толерантність кластера (Cluster tolerance)	2 Å
Зовнішня енергія решітки (External grid energy)	1000
Максимальна початкова енергія (Max initial energy)	0
Максимальне число спроб (Max number of retries)	10000
Число структур у популяції (Number of individuals in population)	300
Максимальне число етапів оцінки енергії (Maximum number of energy evaluations)	850000
Максимальне число генерацій (Maximum number of generations)	27000
Кількість структур, які переходять до наступної генерації (Number of top individuals to survive to next generation)	1
Рівень генної мутації (Rate of gene mutation)	0,02
Рівень кросоверу (Rate of crossover)	0,8



Продовж. табл. 2.1.

Спосіб кросоверу (Mode of crossover)	arithmetic
Альфа-параметр розподілу Гауса (Alpha parameter of Cauchy distribution)	0
Бета-параметр розподілу Гауса (Beta parameter Cauchy distribution)	1
Кількість запусків генетичного алгоритму Ламарка (Number of Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) runs)	50

**2.1.1.5. Ранжування результатів молекулярного докінгу.** Ранжування результатів відбувається з урахуванням кількісних та якісних параметрів. Кількісні розраховуються скоринговою функцією AutoDock. Якісні – оцінюються здатністю лігандів утворювати водневі зв'язки з ключовими амінокислотними залишками протеїнази СК2: Glu114, Val116, Ala 175.

**2.1.1.5.1. Рескоринг результатів молекулярного докінгу.** Запорукою успішного віртуального скринінгу є правильна оцінка геометрії розташування молекули ліганду в сайті зв'язування. Задля цього при проведенні рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу необхідно проводити рескоринг отриманих результатів, використовуючи різні рескорингові функції. Оскільки основним інструментом рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу є молекулярний докінг програмним пакетом Autodock, який має свою вбудовану скорингову функцію, важливо, щоб рескоринг проводився об'єктивно кращим інструментом.

DrugScore – це скорингова функція, яка в своїй оцінці базується на експериментальні дані. Наразі оцінка Drug Score ґрунтується на даних репозиторія Cambridge Structural Database. Дослідження [96-97] показують значну перевагу Drug Score над вбудованим інструментом програмного пакету Autodock.

**2.1.2. Фармакофорне моделювання.** Фармакофорне моделювання проводилось в програмних пакетах PharmDeveloper та BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95].

В програмі PharmDeveloper [98] проводився сам скринінг, рескоринг результатів, конверсії моделей та бібліотеки сполук в необхідні формати [99]. В програмі BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95] проводилась побудова фармакофорних моделей.

**2.1.2.1. Підготовка молекул рецептора для фармакофорного моделювання.** Для побудови фармакофорних моделей та обчислення значимості кожної фармакофорної точки було взято 14 просторових структур протеїнкінази СК2 (були обрані структури протеїнкінази людини з інгібіторами,  $IC_{50}$  яких менше 100 нМ) з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Структури СК2 разом із інгібіторами мали наступні ідентифікатори: 3AT3, 3AT4 [100], 3E3B [101], 3MB6, 3MB7 [102], 3PE1, 3PE2, 3R0T [103], 3U4U [104], 4GRB [105], 4KWP [106], 4UB7 [68], 2ZJW [107], 4ANM [108]. Молекули води та структур, що не мали відношення до рецептора та інгібітора видалено, використовуючи програму BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95]. Рецептори разом з їхніми інгібіторами 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.

**2.1.2.2. Підготовка молекул лігандів для фармакофорного моделювання.** Підготовка молекул лігандів для проведення фармакофорного моделювання проводилась програмними пакетами Open Babel [91] та PharmDeveloper [98].

Конформери для бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук було згенеровано програмою Open Babel [91]. Генерація конформерів проводилась з наступними параметрами: максимальна кількість конформерів 250, кроків оптимізації – 100.

Конформери були конвертовані в спеціальну скринінгову базу програмним пакетом PharmDeveloper [98].

**2.1.2.3. Побудова фармакофорних моделей.** Для побудови рецепторно-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази СК2 використовували програму Pharmer, яка включена в програмний пакет PharmDeveloper. Для початку будують первинну модель. Програма Pharmer визначає взаємодії рецептору з лігандом та на їхній основі формує відповідні фармакофорні точки. Програма розрізняє такі типи взаємодій як водневі зв'язки, гідрофобні та іонні взаємодії. На їхній основі дане програмне забезпечення будує фармакофорні точки, такі як донори та акцептори водневого зв'язку (мають направлений вектор взаємодії), ароматичні точки (можуть мати вектор направленості), гідрофобні, позитивно та негативно заряджені фармакофорні точки. Точки, що відповідають за гідрофобний тип взаємодій і розміщуються на відстані до 2 Å, об'єднуються (кластеризуються) в одну точку. Важливим функціоналом програми Pharmer та PharmDeveloper є створення виключених об'ємів, тобто ділянок, куди заборонено направляти ліганди в процесі фармакофорного скринінгу.

Доопрацювання моделей, створених таким чином відповідно до більш точних взаємодій ліганд-рецептор, відбувається в програмі BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95]. Конвертація форматів між програмою Pharmer та виконувалась програмним пакетом PharmDeveloper [98].

Для скринінгу було створено дві фармакофорні моделі, що складаються з наступних фармакофорних точок (та їхніх характеристик): донор водневого зв'язку ( $R = 1 \text{ \AA}$ , weight = 11), акцептори водневого зв'язку ( $R = 0.5 \text{ \AA}$ , weight = 13), гідрофобні ( $R = 1 \text{ \AA}$ , weight = 13) та направлені ароматичні ( $R = 1.6 \text{ \AA}$ , weight = 14) точки [99, 109].

**2.1.2.4. Ранжування результатів фармакофорного моделювання та відбір сполук.** Вибірка сполук (на жаргоні – cherry picking – ретельний відбір)

перед скринінгом *in vitro* або *in vivo* є не менш відповідальним процесом. Скорингові функції та статистичні алгоритми можуть показувати хорошу кореляцію з результатом, але все ж вони дають свою похибку, що може бути критичним для пошуку нових лідерних сполук. Таким чином, кінцевим етапом віртуального скринінгу як методу молекулярного докінгу так і фармакофорного моделювання є візуальна оцінка та відбір сполук для подальшого біохімічного тестування. Перегляд комплексів лігандів з АТФ-зв'язувальною кишенею проводився в програмі BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95].

## 2.2. Біохімічне тестування

Апробація ефективності інгібіторів проводили *in vitro* [110]. Для цього використовували очищений каталітичний домен протеїнкінази СК2 (СК2 $\alpha$ ), отриманий рекомбінантним методом. Даний протеїн був експресований в клітинах Sf9 (Upstate/Millipore).

Дослідження ефективності інгібіторів щодо протеїнкінази СК2 проводилось за наступним протоколом. Для однієї реакції брали 3 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>), 1,5 мкл субстрату – пептид RRREEETEEE (New England Biolabs) (3 мг/мл); 0,02 мкл субодиниці  $\alpha$  протеїнкінази СК2, 14,5 мкл дистильованої води; 1 мкл розчину інгібітора при різних концентраціях; 10 мкл АТФ (кінцева концентрація 50 мкМ) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору <sup>32</sup>P з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Після цього епендорфи з розчином інкубували протягом 25 хв при 30°C.

По завершенню часу інкубації епендорфи перенесли на лід, щоб уповільнити реакцію до остаточної зупинки, яка проводилась додаванням 10 мкл 5% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>. Далі диск фосфоцелюлозного паперу р31 (Whatman) із діаметром 20 мм змочують реакційною сумішшю та тричі промивають в 1% розчині Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>, після чого просушують в сушильній шафі за температури 40 – 45 °С.

Рівень радіоактивного сигналу визначали сцинтиляційним лічильником PerkinElmer Tri-Carb 2800-TR. Негативним контролем слугував розчин,

аналогічний до вище описаного, але замість інгібітору додавали розчин DMSO (кінцева концентрація була 3,8%) [110].

Ступінь інгібування протеїнкінази визначали по співвідношенню включення  $^{32}\text{P}$  при додаванні інгібітора та за його відсутності.

*Визначення  $IC_{50}$ .* Перед визначенням  $IC_{50}$  проводили попередній скринінг. Концентрація інгібітора в попередньому скринінгу становила 33 мкМ. Активність протеїнкінази СК2 визначали при додаванні DMSO та інгібіторів. За 100% приймали покази лічильника cpm (counts per minute) у пробах за присутності DMSO. Для подальшого визначення  $IC_{50}$  брали лише ті інгібітори, що зменшували активність СК2 понад 50%. Залежно від значень залишкової активності ензиму при додаванні конкретного інгібітора визначали діапазон концентрацій для визначення  $IC_{50}$ .

Титрувальну криву будували в логарифмічних координатах (десятьового логарифму) концентрації інгібітора ( $\lg[C]$ ) та cpm. Для середнього значення cpm знаходили  $\lg[C]$ . Обернений логарифм знайденої концентрації дорівнював  $IC_{50}$ .

Кожний експеримент проводили в трьох повторах. Відхилення від середнього значення були не більше 15% [110].

### 2.3. Розрахунок LogP органічних сполук

Серед фізико-хімічних показників особлива увага приділяється такому параметру, як логарифмічний коефіцієнт розподілу між октанолом і водою (LogP), що є показником ліпофільності речовини. Вона комплексі з іншими параметрами визначає здатність речовини проходити через мембрану і, відповідно, проникати всередину клітини, а отже, є визначальною для передбачення біодоступності препарату [111, 112, 113, 114].

Всі методи розрахунку LogP органічних сполук розділяють на дві великі групи. Перша – методи, що ґрунтуються на аналізі підструктур, які входять до складу молекули (substructure-based methods), друга група методів заснована на певних властивостях досліджуваних сполук (property-based methods).

Методи аналізу підструктур, в свою чергу діляться на фрагментні та атомні в залежності від того, підструктури якого рівня (хімічні групи або окремі атоми) розглядаються в досліджуваній молекулі. Остаточне значення LogP вираховується шляхом підсумовування внесків окремих підструктур [115]. Використовуються також комбіновані атомно-фрагментні підходи.

Методи, що ґрунтуються на властивостях молекул, також розділяються на три великі групи: засновані на емпіричних даних, методи, ті, що використовують особливості просторої структури молекули та методи, що ґрунтуються на використанні топологічних дескрипторів [116].

**XLOGP3 та XLOGP2.** Ці підходи до розрахунку коефіцієнта розподілу октанол/вода, розроблені Вангом та співавторами, належать до атомних методів [117]. Значення LogP отримується як сума двох компонентів. Перший – вклад в LogP різних груп та атомів, другий – сума корекційних факторів.

$$\text{Log}P = \sum_i a_i A_i + \sum_j b_j B_j \quad (2.1)$$

де  $A_i$  – вклад певного атому;  $a_i$  – кількість  $i$ -их атомів;  $B_j$  – вклад певного корегуючого коефіцієнту;  $b_j$  – кількість  $j$ -их атомів. Коефіцієнти отримуються шляхом побудови багатовимірної регресивної моделі для великої кількості органічних сполук.

XLOGP3 є наступним поколінням методу XLOGP2 і має принципову відмінність від попередника. В XLOGP3 як відправну точку для розрахунку використовують схожу молекулу з уже відомим значенням LogP. Відповідно значення відомої молекули  $\text{Log}P^0$  дорівнює:

$$\text{Log}P^0 = \sum_i a_i A_i^0 + \sum_j b_j B_j^0 \quad (2.2)$$

Для того, щоб розрахувати LogP невідомої молекули по методу XLOGP3, необхідно відняти формулу 2 від формули 1 [116, 117].

$$\text{Log}P = \text{Log}P^0 + \sum a_i (A_i - A_i^0) + \sum b_j (B_j - B_j^0) \quad (2.3)$$

**KOWWIN.** Мейлан та Говард розробили комбінований атомно-фрагментний (atom/fragment contribution, AFC) метод оцінки LogP, заснований на використанні

множинної лінійної регресії та відомих достовірних значень LogP. Тренувальний сет складався з 2473 переважно простих речовин, в той час як валідаційна вибірка становила 10589 сполук простої, складної та комплексної будови. Модель містить 150 типів атомів та 250 типів корегуючих факторів, які й визначають сумарне значення LogP.

Регресії будувалися в два послідовних етапи. В першій регресії розраховувалась кореляція між значеннями атомних/фрагментних внесків та відповідними значеннями LogP. В другій – між корегуючими факторами та LogP. Розрахунок LogP проводиться простим підсумовуванням атом/фрагментного вкладу та вкладу корегуючих факторів, що містяться у структурі молекули. Крім того, прості фрагменти комбінувалися між собою, щоб уникнути ситуації, коли немає значення елементарного фрагменту для розрахунку LogP молекули. Формула для розрахунку методом KOWWIN:

$$\text{LogP} = \sum(f_i n_i) + \sum(c_j n_j) + 0.229 \quad (2.4)$$

де  $f_i$  - вклад відповідного атома/фрагмента,  $c_j$  – вклад відповідного корегуючого фактору,  $n_i, n_j$  – кількість відповідних значень атом/фрагментного вкладу та корегуючих факторів, 0.229 – константа, що виводиться регресією.

Метод **KOWWIN** було розроблено для розрахунку LogP органічних, кремнійорганічних сполук та деяких солей органічних молекул з використанням відповідних інструментальних значень. Експериментальні значення для неорганічних сполук не використовувались [118-121].

**Jchem.** Метод розрахунку LogP, запропонований фахівцями компанії ChemAxon ([www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com)), є комбінованим атомно-фрагментним підходом. Кожному атому та фрагменту досліджуваної молекули присвоюється певний тип. Атомні вклади відповідають модифікованим типам атомів, запропонованим Вішвандханом і співавторами [122]. Модифікації в основному стосуються атомів з делокалізованою електронною густиною, а також певних іонних форм. Вклади окремих фрагментів і функціональних груп враховуються за Клопманом та співавторами [123]. Остаточне значення LogP розраховується як сума внесків окремих атомів та фрагментів, що представлені в молекулі.

В новіших версіях Jchem використовують «trainable logP», де користувач може сам обрати вибірку, за якою будуть розраховуватись значення LogP, що може значно покращити точність методу. Користувач може як вибирати з готових вибірок, так і створювати власні вибірки.

***ALOGPS та Ochem.*** Метод ALOGP розроблений Тетко і співавторами з використанням асоціативної нейронної мережі (associative neural network), належить до так званих електротопологічних та поєднує в собі підходи для розрахунку коефіцієнту розподілу октанол/вода LogP. Показано, що для коректного моделювання LogP важливо враховувати молекулярну масу. Додатково до молекулярної маси введено два простих параметра – кількість атомів водню та кількість важких атомів. Важливими вхідними даними для програми є електротопологічні індекси атомів та зв'язків [115]. Індекси розраховуються із вхідного формату SMILES. Для розрахунку LogP використовувалось сімдесят п'ять електротопологічних індексів і бралась 64 нейронна мережа [124, 125].

Наступна генерація методів ALOGP, що реалізована в веб-порталі Ochem [126].

### **Висновки:**

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

**Результати досліджень, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Протопопов МВ, Нипорко ОЮ, Бджола ВГ, Старосила СА, Ярмолюк СМ. Валідація *in silico* методів визначення ліпофільності/розчинності для раціонального дизайну лікарських засобів. Ukr. Bioorg. Acta. 2013; 11: 44–52.



## РОЗДІЛ 3

## АНАЛІЗ МЕТОДІВ РОЗРАХУНКУ ПАРАМЕТРУ LOGP

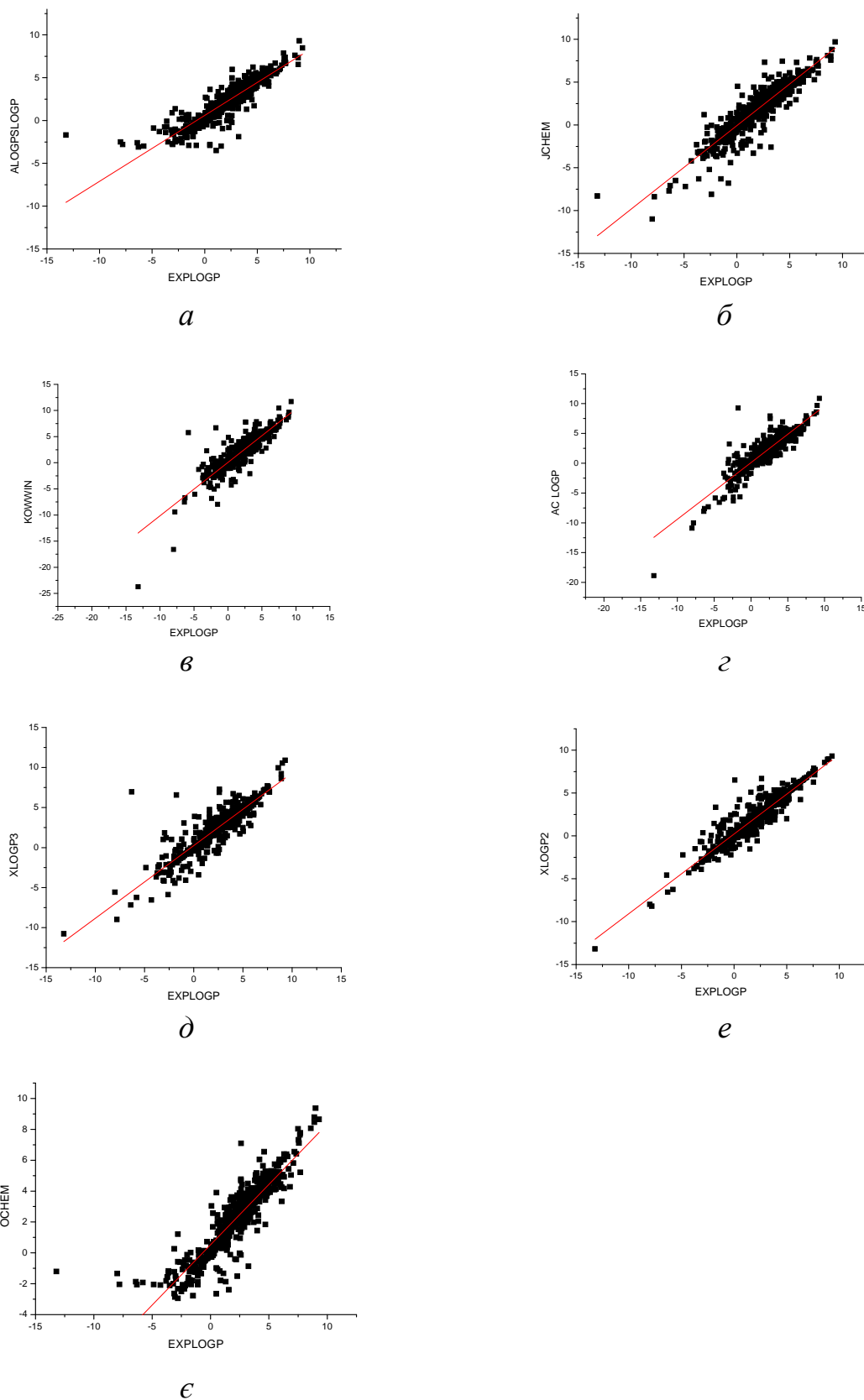
Попередній аналіз вмісту бази даних Approved Drugs [127] дозволив виявити, що серед вибірки лікарських засобів експериментальні значення LogP відомі для 693 речовин. Кореляція між експериментальними (EXPLogP) та розрахованими значеннями LogP (за методами ALOGPS, AC LogP, KOWWIN, XLOGP3, XLOGP2) наведена на рис. 3.1. Відповідні чисельні характеристики представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

**Статистичні показники різних методів розрахунку LogP органічних сполук**

Метод	R	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	RMSE (s)	MAE
XLOGP2	0,93952	0,88271	0,88254	0,8382	0,44695
JCHEM	0,91122	0,83033	0,83008	1,08872	0,70696
OCHEM	0,90215	0,81388	0,81361	0,92426	0,58738
ALOGPS	0,89906	0,8083	0,80802	0,92596	0,65732
ACLOGP	0,89886	0,80795	0,80767	1,1457	0,74549
XLOGP3	0,89722	0,805	0,80472	1,10548	0,55326
KOWWIN	0,88092	0,77603	0,7757	1,36001	0,76427

Примітки: 1 - R – коефіцієнт кореляції; 2 - R<sup>2</sup> – коефіцієнт детермінації; 3 - Adj R<sup>2</sup> – скорегований коефіцієнт детермінації; 4 - RMSE – середньоквадратичне відхилення; 5 - MAE – середня абсолютна похибка. Методи розташовані у порядку зменшення коефіцієнта кореляції.



**Рис. 3.1.** Кореляції методів оцінки значень LogP органічних сполук ALOGPS (а), JCHEM (б), KOWWIN (в), AC LogP (г), XLOGP3 (д), XLOGP2 (е) та OCHEM (є) із експериментально визначеними даними [114]

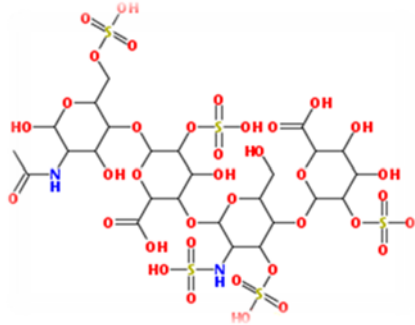
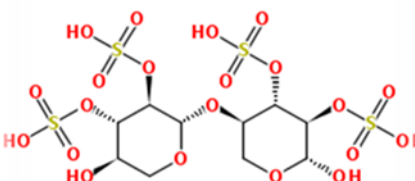
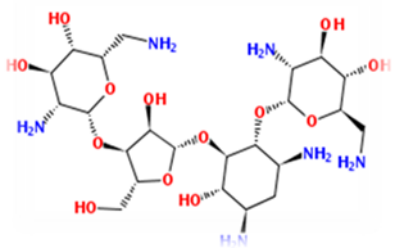
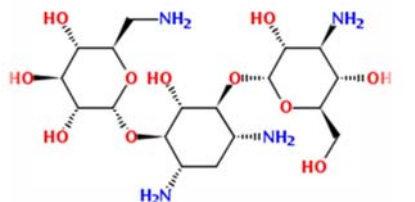
Згідно даних кореляційного аналізу, значення коефіцієнтів розподілу октанол/вода, що були оцінені всіма вищезазначеними методами, характеризуються високим ступенем кореляції з даними інструментальних експериментів. Найбільшими значеннями коефіцієнтів кореляції характеризуються набори даних, отримані методами XLOGP2 ( $R=0,93952$ ), JCHEM ( $R=0,91122$ ) та OCHEM ( $R=0,90215$ ). Величини коефіцієнтів детермінації для обчислених вибірок відповідають значенням коефіцієнтів кореляції. Водночас дані стосовно величин абсолютної похибки малюють дещо іншу картину. Найменшим значенням цієї величини також характеризуються дані, отримані методом XLOGP2 ( $MAE=0,44695$ ), проте на другому місці за цим показником опиняється метод XLOGP3 ( $MAE=0,55326$ ) (третю позицію, подібно до даних кореляційного аналізу, посідає OCHEM –  $0,58738$ ) [114]. Подібні відмінності можуть бути пов'язані з особливостями роботи алгоритму, реалізованому в XLOGP3 – використання попередньо верифікованих значень  $\text{LogP}^0$  [118] з одного боку, призводить в ряді випадків до абсолютно точного визначення  $\text{LogP}$ , з іншого – до певного розмиття обрахованих значень на великих вибірках сполук.

Важливо зауважити, що для абсолютно усіх методів характерні крайові випадки, тобто точки, які знаходяться на великій відстані від середньої – величини  $\text{LogP}$ , розраховані для деяких сполук, не узгоджуються з даними інструментального експерименту. Наявність цих точок свідчить про наявність певних обмежень для застосування досліджуваних методів обчислення.

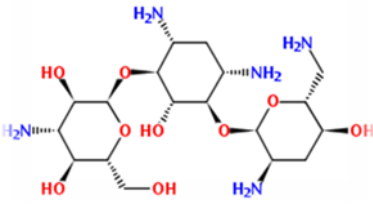
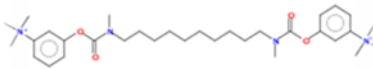
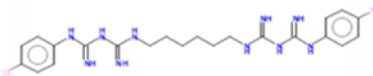
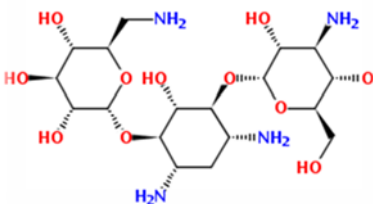
Структурні формули сполук-виключень та відповідні дані  $\text{LogP}$  наведено в таблиці 3.2. Як видно з представлених даних, ці речовини з певними структурними особливостями, зокрема, всі вони містять дуже велику кількість донорів водневих зв'язків. Експериментально визначені значення  $\text{LogP}$  для цих сполук менше значення  $-5$ , тобто крайнього значення із правила Ліпінського. В свою чергу, розраховані величини  $\text{LogP}$  для цих сполук також знаходяться у від'ємному діапазоні, проте є вищими за своїми абсолютними значеннями. Можна припустити, що правила, за якими сумуються внески донорів водневого зв'язку в ліпофільність молекули, систематично занижують їхній загальний вклад.

Таблиця 3.2.

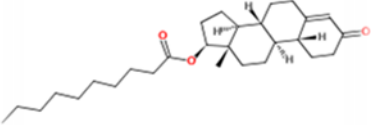
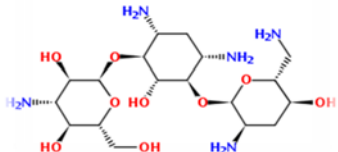
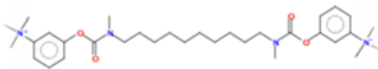
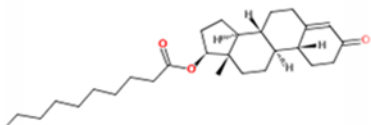
**Сполуки, чії розрахункові значення LogP, лежать за межами  
допустимих похибок**

DrugBank ID	Метод розрахунку LogP	CLogP	Структура
DB01225	JCHEMLOGP	-8,3	
	KOWWIN	-23,75	
	EXPLOGP	-13,2	
	ACLOGP	-18,88	
	XLOGP3	-10,77	
	XLOGOP2	-13,18	
DB00686	JCHEMLOGP	-11	
	KOWWIN	-16,6	
	EXPLOGP	-8	
	ACLOGP	-10,9	
	XLOGP3	-5,58	
	XLOGOP2	-7,99	
DB00452	JCHEMLOGP	-8,4	
	KOWWIN	-9,41	
	EXPLOGP	-7,8	
	ACLOGP	-10,03	
	XLOGP3	-8,99	
	XLOGOP2		
DB01172	JCHEMLOGP	-7,1	
	KOWWIN	-6,7	
	EXPLOGP	-6,3	
	ACLOGP	-7,61	
	XLOGP3	6,95	
	XLOGOP2	-6,56	

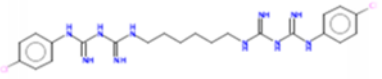
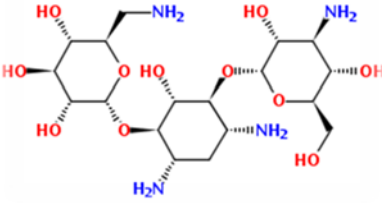
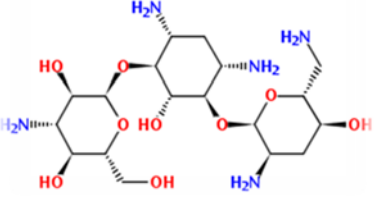
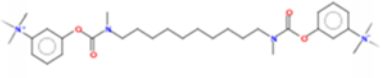
Продовж. табл. 3.2.

DB00684	JCHEMLOGP	-6,5	
	KOWWIN	5,76	
	EXPLOGP	-5,8	
	ACLOGP	-7,32	
	XLOGP3	-6,23	
	XLOGOP2	-6,24	
DB00944	JCHEMLOGP	-1,4	
	KOWWIN	6,69	
	EXPLOGP	-1,75	
	ACLOGP	9,27	
	XLOGP3	6,57	
	XLOGOP2	3,34	
DB00878	JCHEMLOGP	4,51	
	KOWWIN	4,85	
	EXPLOGP	0,08	
	ACLOGP	2,56	
	XLOGP3	3,89	
	XLOGOP2	6,51	
DB01172	JCHEMLOGP	-7,1	
	KOWWIN	-6,7	
	EXPLOGP	-6,3	
	ACLOGP	-7,61	
	XLOGP3	6,95	
	XLOGOP2	-6,56	

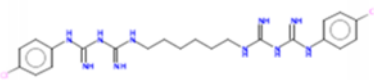
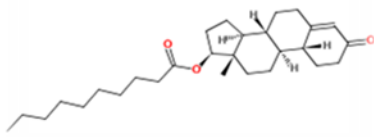
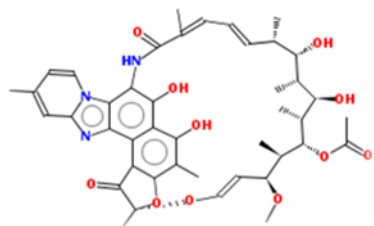
Продовж. табл. 3.2.

DB08804	JCHEMLOGP	7,32	
	KOWWIN	7,75	
	EXPLOGP	2,62	
	ACLOGP	7,5	
	XLOGP3	7,27	
	XLOGOP2	6,69	
DB00684	JCHEMLOGP	-6,5	
	KOWWIN	5,76	
	EXPLOGP	-5,8	
	ACLOGP	-7,32	
	XLOGP3	-6,23	
	XLOGOP2	-6,24	
DB00944	JCHEMLOGP	-1,4	
	KOWWIN	6,69	
	EXPLOGP	-1,75	
	ACLOGP	9,27	
	XLOGP3	6,57	
	XLOGOP2	3,34	
DB08804	JCHEMLOGP	7,32	
	KOWWIN	7,75	
	EXPLOGP	2,62	
	ACLOGP	7,5	
	XLOGP3	7,27	
	XLOGOP2	6,69	

Продовж. табл. 3.2.

DB00878	JCHEMLOGP	4,51	
	KOWWIN	4,85	
	EXPLOGP	0,08	
	ACLOGP	2,56	
	XLOGP3	3,89	
	XLOGOP2	6,51	
DB01172	JCHEMLOGP	-7,1	
	KOWWIN	-6,7	
	EXPLOGP	-6,3	
	ACLOGP	-7,61	
	XLOGP3	6,95	
	XLOGOP2	-6,56	
DB00684	JCHEMLOGP	-6,5	
	KOWWIN	5,76	
	EXPLOGP	-5,8	
	ACLOGP	-7,32	
	XLOGP3	-6,23	
	XLOGOP2	-6,24	
DB00944	JCHEMLOGP	-1,4	
	KOWWIN	6,69	
	EXPLOGP	-1,75	
	ACLOGP	9,27	
	XLOGP3	6,57	
	XLOGOP2	3,34	

Продовж. табл. 3.2.

DB00878	JCHEMLOGP	4,51	
	KOWWIN	4,85	
	EXPLOGP	0,08	
	ACLOGP	2,56	
	XLOGP3	3,89	
	XLOGOP2	6,51	
DB08804	JCHEMLOGP	7,32	
	KOWWIN	7,75	
	EXPLOGP	2,62	
	ACLOGP	7,5	
	XLOGP3	7,27	
	XLOGOP2	6,69	
DB01220	JCHEMLOGP	4,37	
	KOWWIN	7,81	
	EXPLOGP	2,6	
	ACLOGP	7,94	
	XLOGP3	6,89	
	XLOGOP2	4,32	

**Висновки:**

За результатами кореляційного аналізу, всі протестовані методи оцінки LogP є придатними для подальшого використання в дослідженнях з оптимізації структури відомих/розроблених рецептор-специфічних інгібіторів до лікоподібного стану, про що свідчать високі значення коефіцієнтів кореляції між розрахованими й експериментальними величинами LogP для всіх без винятку вибірок сполук (найнижче значення коефіцієнта кореляції становить 0,88 для метода KOWWIN). Найбільшими коефіцієнтами кореляції характеризуються



атомарний метод XLOGP2 і фрагментарний метод JCHEM (коефіцієнти кореляції дорівнюють 0,94 та 0,91 відповідно).

**Результати досліджень, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Протопопов МВ, Нипорко ОЮ, Бджола ВГ, Старосила СА, Ярмолук СМ. Валідація *in silico* методів визначення ліпофільності/розчинності для раціонального дизайну лікарських засобів. Ukr. Bioorg. Acta. 2013; 11: 44–52.

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

## РОЗДІЛ 4

### ПОШУК ІНГІБІТОРІВ СК2 СЕРЕД КОМБІНАТОРНИХ БІБЛІОТЕК ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Весь можливий хімічний простір (поняття в хемоінформатиці, яке означає всі молекули, існування яких не суперечить хімічним законам та іншим лімітуючим правилам, наприклад  $MW \leq 500$  [128]) налічує  $10^{60}$  молекул [129]. Число такого порядку важко уявити, не кажучи вже про біологічне тестування подібної кількості хімічних речовин. Тому останні три десятиліття були присвячені розробці та модифікації *in silico* методів, в першу чергу для здешевлення процесу розробки нових ліків, по-друге, для покращення ефективності (зменшення часових витрат на процес розробки ліків та зменшення відсотку невдач), і по-третє, розробка нових комп'ютерних методів для аналізу більшого відсотка «хімічного простору».

Типовим таким методом є віртуальний скринінг великих бібліотек органічних низькомолекулярних сполук [130]. З моменту створення методології віртуального скринінгу відомі успішні кейси застосування. Зокрема, розробка інгібітору ВІЛ-інтегрази, комерційна назва препарату – Raltegravir [131], розробка антикоагулянту Tirofiban [132] та протигрипового засобу Zanamivir [133] стали можливими саме завдяки методам віртуального скринінгу [132, 134].

#### **4.1. Ідентифікація та дослідження похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти як інгібіторів протеїнкінази СК2**

**4.1.1. Рецепторно орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних сполук.** З метою пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 людини було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних сполук відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної

біології і генетики НАНУ, що налічує понад 160 тисяч сполук, які належать до різних хімічних класів.

Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг проводився двома методами: методом молекулярного докінгу з використанням програмних пакетів Autodock та MGL Tools та методом фармакофорного скринінгу з використанням авторського програмного пакету «PharmDeveloper» [98], що був розроблений співробітником відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ С.А. Старосилою.

Мішенню для докінгу була протеїнкіназа СК2 людини, взята з репозиторія Protein Data Bank та яка має ідентифікатор (PDBID): 3NSZ [94]. Мапи для докінгу створювались з використанням програм MGL Tools 1.5.6 та модулем Autogrid. Центр бокса, в якому проводився пошук конформацій лігандів, має координати: 2,962, -1,593 та -9,909. Були створені \*.MAP файли для наступних типів атомів C, OA, N, P, HD, BR, CL, F, H, I, NA, S та SA.

Для проведення віртуального скринінгу молекулярним докінгом колекцію сполук необхідно було перевести з формату \*.DB у формат \*.SDF. Компонентами програмного пакету MGL Tools кожній сполуці з колекції був присвоєний частковий заряд Gaisreger. Конвертація бази органічних сполук з формату мульти- \*.SDF в одиночні \*.MOL2 та \*.PDBQT файли здійснювалась скриптами, розробленими у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Фармакофорні моделі розроблялись на основі даних просторових структур 14 комплексів протеїнкінази СК2 з інгібіторами,  $IC_{50}$  яких менша 100 нМ. Ідентифікатори цих комплексів: 3AT4, 3E3B, 3MB6, 3MB7, 3PE1, 3PE2, 3R0T, 3U4, 4GRB, 4KWP, 4UB7, 2ZJW, 3AT3, 4ANM) [68, 100-108]. Для скринінгу було створено дві фармакофорні моделі, що складаються з наступних фармакофорних точок (та їхніх характеристик): донор водневого зв'язку ( $R = 1 \text{ \AA}$ , weight = 11), акцепторам водневого зв'язку ( $R = 0.5 \text{ \AA}$ , weight = 13), гідрофобні ( $R = 1 \text{ \AA}$ , weight = 13) та направлені ароматичні ( $R = 1.6 \text{ \AA}$ , weight = 14) точки.

Для проведення віртуального скринінгу колекцію сполук (150 000) було підготовлено згідно протоколу: 1) для кожної сполуки було згенеровано до 250 конформерів програмою Open Babel [91]; 2) конформери були конвертовані в спеціальну скринінгову базу програмним пакетом PharmDeveloper [98].

Таким чином за результатом віртуального скринінгу з подальшим ранжуванням результатів скоринговими функціями та візуальним аналізом було відібрано 150 сполук для подальшого біохімічного тестування методом молекулярного докінгу та 108 сполук – методом фармакофорного скринінгу.

**4.1.2. Дослідження інгібувальної активності відібраних сполук.** Як показало біохімічне тестування, 19 сполук із 258 проявили інгібувальну здатність щодо протеїнкінази СК2.  $IC_{50}$  цих сполук знаходилось в межах від 0,8 мкМ до 20 мкМ. 9 сполук знайдені методом фармакофорного скринінгу та ще 10 сполук – методом молекулярного докінгу. Також для оцінки ефективності інгібувальної здатності сполук щодо протеїнкінази СК2 було використано параметр LE, що обраховується за формулою 4.1 [135]:

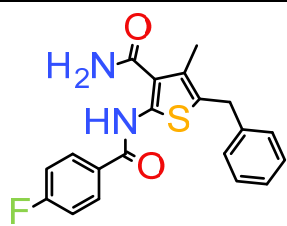
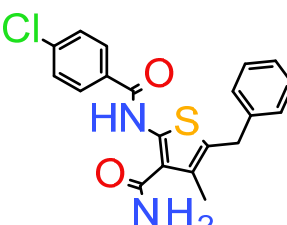
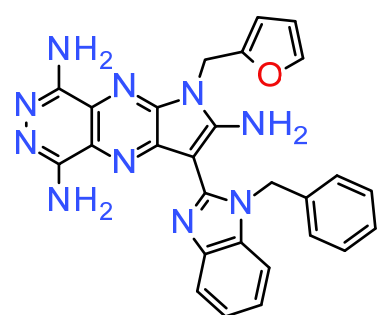
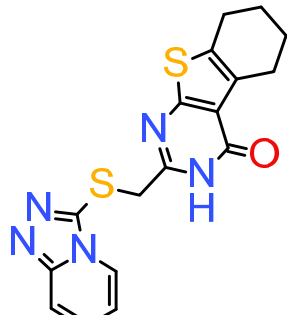
$$LE = 1.4(-\log IC_{50})/N \quad (4.1)$$

Де N – кількість важких атомів (не гідрогенів).

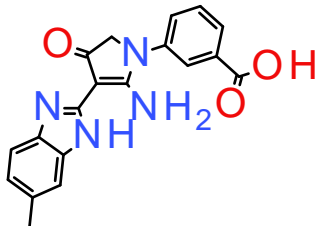
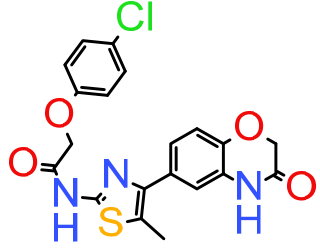
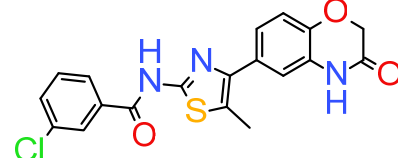
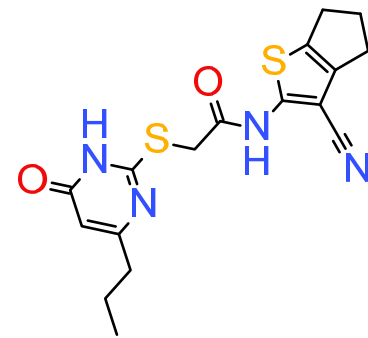
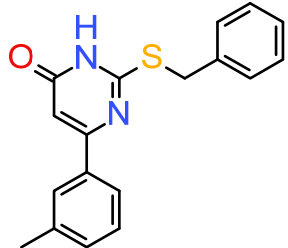
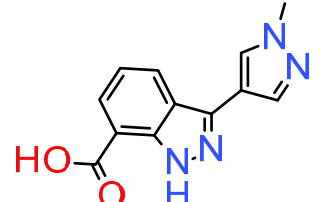
Знайдені 19 сполук належать до 16 хімічних класів, їхні структури, фізико-хімічні властивості та  $IC_{50}$  представлені в таблиці 4.1 [136, 137].

Таблиця 4.1.

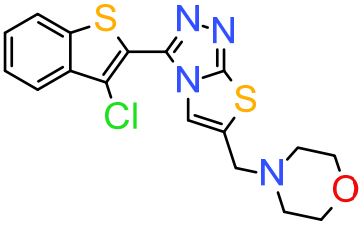
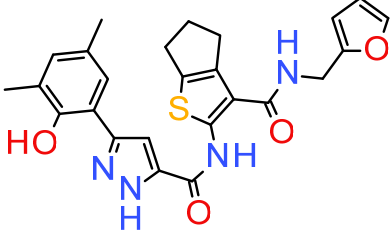
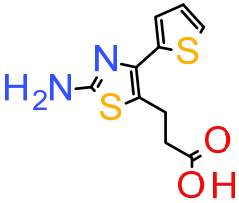
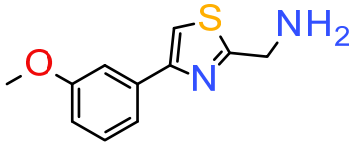
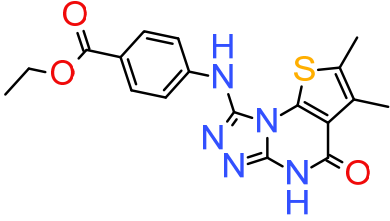
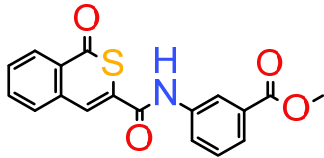
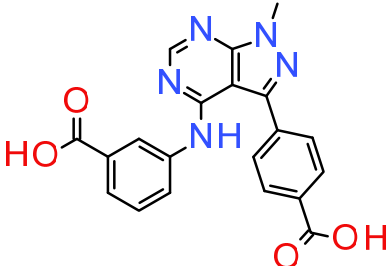
Структури, значення  $IC_{50}$ , LE, кількість важких атомів, молекулярна вага та cLogP знайдених інгібіторів протеїнкінази СК2

Сполука	Структура	$IC_{50}$ , мкМ	LE	Кількість		
				важких атомів	MW	cLogP
4.1		2.5	0.3	26	368	3.9
4.2		7.9	0.27	26	385	4.4
4.3		1.4	0.21	38	503	3.8
4.4		5	0.29	25	369	3.4

Продовж. табл. 4.1.

4.5		14.4	0.26	26	348	2.7
4.6		6.9	0.24	29	430	3
4.7		12.6	0.25	27	400	3.2
4.8		5.6	0.29	25	374	3.2
4.9		15.8	0.3	22	308	4.3
4.10		3	0.42	18	315	2.5

Продовж. табл. 4.1.

4.11		20	0.26	25	391	3.6
4.12		2	0.26	30	477	4.7
4.13		5.5	0.45	16	254	2
4.14		11	0.45	15	220	1.5
4.15		3	0.28	27	383	2.5
4.16		2.7	0.32	24	339	2.8
4.17		3.7	0.26	29	389	2.8

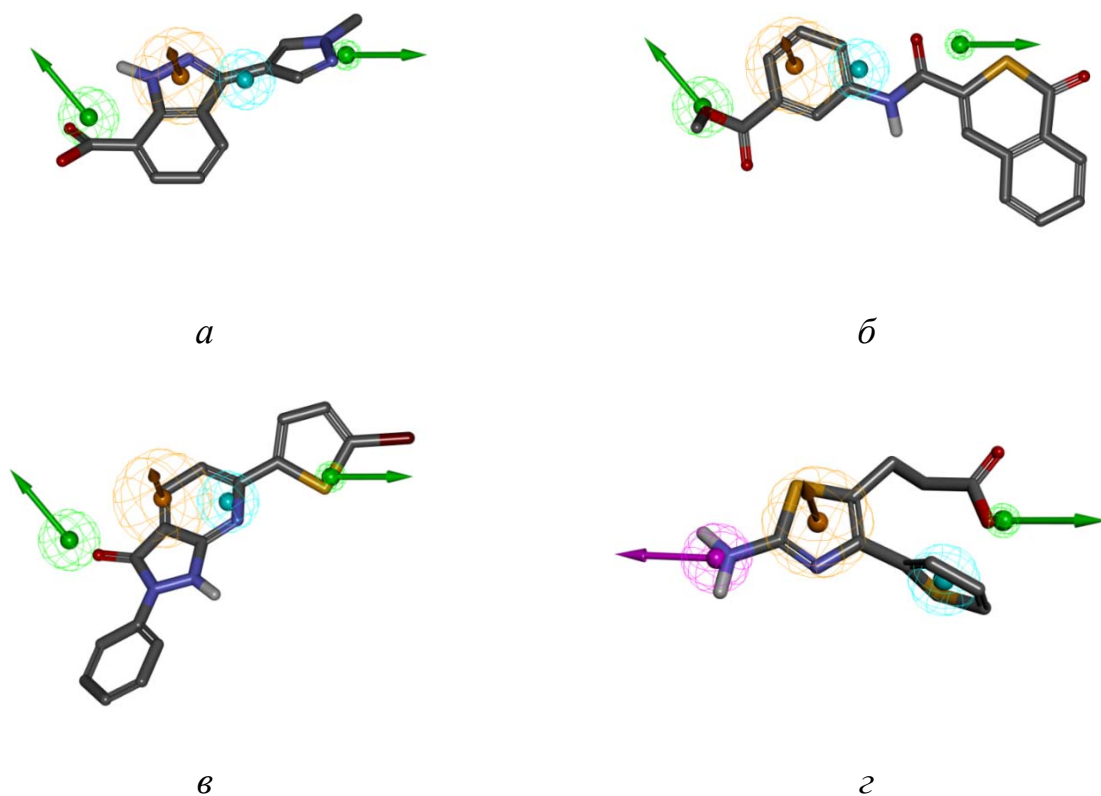
Продовж. табл. 4.1.

4.17		3.7	0.26	29	389	2.8
4.18		2.1	0.35	22	372	4.4
4.19		0,8	0,5	17	269	2,8

Як видно з таблиці 4.1, 10 сполук (**4.1**, **4.3**, **4.4**, **4.10**, **4.12**, **4.15**, **4.16**, **4.17**, **4.18** та **4.19**) мали  $IC_{50}$  меншими за 5 мкМ. Для більш ретельного дослідження активності знайдених сполук був проведений детальний аналіз результатів молекулярного моделювання та віртуального скринінгу.

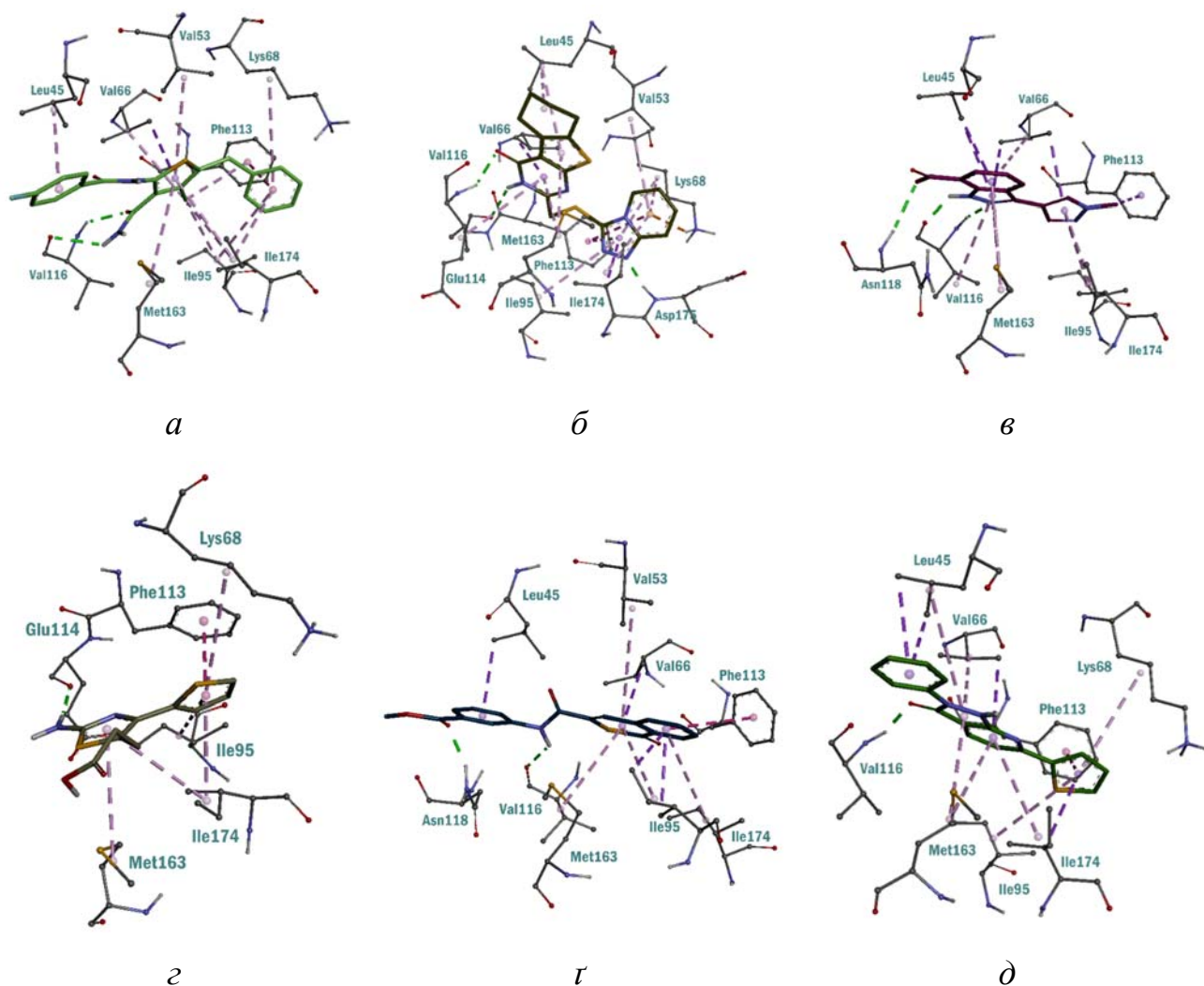
**4.1.3. Аналіз типу зв'язування знайдених інгібіторів з протеїнкіназою СК2.** Співставлення сполук-інгібіторів з фармакофорними моделями показало, що сполуки 4.10, 4.16, 4.18 були знайдені, використовуючи фармакофорну модель 1, а сполука 4.13 – фармакофорну модель 2. Мапування цих сполук відносно фармакофорних точок представлено на рисунку 4.1.





**Рис. 4.1.** Мапування сполук **4.10** (*a*), **4.16** (*б*), **4.18** (*в*) відносно фармакофорної моделі 1 та сполуки **4.13** (*г*) відносно фармакофорної моделі 2. Фармакофорні точки, що відповідають за акцептори водневого зв'язку, показані зеленим кольором, за донори водневого зв'язку – фіолетовим кольором, оранжевим – ароматичні кільця, синім – гідрофобні взаємодії

Дев'ять сполук, що були відібрані фармакофорним моделюванням, були додатково продоковані для встановлення способу зв'язування з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнкіназою СК2. Комплекси найактивніших сполук представлені на рисунку 4.2.



**Рис. 4.2.** Комплекси сполук **4.1** (*a*), **4.4** (*б*), **4.10** (*в*), **4.13** (*г*), **4.16** (*д*) та **4.18** (*е*) з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пунктирними лініями

Згідно даних молекулярного докінгу, 4-метил-тіофен-3-карбоксамідний гетероцикл сполуки **4.1** (див. рис. 4.2 *a*) розміщується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувальної кишені та формує водневий зв'язок з амінокислотним залишком шарнірної ділянки Val116. Додатково цей фрагмент бере участь у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val66, Val53, Met163 та Ile95. (4-флуоробензоіл)аміновий фрагмент в 2 положенні 4-метил-тіофен-3-карбоксаміду, направлений в бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені, формує гідрофобні взаємодії з амінокислотним залишком Leu45. Бензил в 5

положенні 4-метил-тіофен-3-карбоксаміду направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 та бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Lys68, Phe113, Ile95 та Ile174. Особливо варто відмітити  $\pi$ - $\pi$  взаємодію бензилового фрагменту з Phe113.

Сполука **4.4** (див. рис. 4.2. б) своїм 4-оксо-5,6,7,8-тетрагідро-3Н-бензотіофено[2,3-d]піримідин-2-іловим гетероциклом, розташованим в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2, формує водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Val116 та Glu114. Також цей гетероцикл бере участь у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Leu45, Met163, Val66 та Glu114. [1,2,4]тріазоло[4,3-a]піридин-3-ілсульфаніловий фрагмент сполуки **3** направлений вглиб АТФ-зв'язувального сайту та формує водневий зв'язок Asp175. Окрім водневого зв'язку цей фрагмент формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val53, Lys68, Phe113, Ile174 та Ile95.

Індазольний гетероцикл 3-(1-метилпіразоло-4-іл)-1Н-індазол-7-карбоксілової кислоти (сполуки **4.10**, див. рис. 4.2 в) розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці та формує водневий зв'язок з амінокислотними залишками шарнірної ділянки протеїнкінази СК2 Val116 та ASN118 через карбоксілну групу в 7 положенні. Окрім водневих зв'язків індазольний гетероцикл утворює гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Leu45, Met163, Val66 та Val116. Замісник в третьому положенні індазольного гетероциклу (1-метилпіразоло-4-іл) направлений вглиб АТФ-зв'язувального сайту та формує гідрофобні взаємодії в амінокислотними залишками Ile95, Val66, Phe113 та Ile174.

3-[2-аміно-4-(2-тієніл)тіазоло-5-іл]пропіонова кислота (сполука **4.13**, див. рис. 4.2 г) своїм тіазол-2-аміновим фрагментом утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком шарнірної ділянки протеїнкінази СК2 Glu114 та формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Met163 та Ile174. 2-карбоксіетилловий фрагмент направлений на вихід з АТФ-зв'язувальної кишені

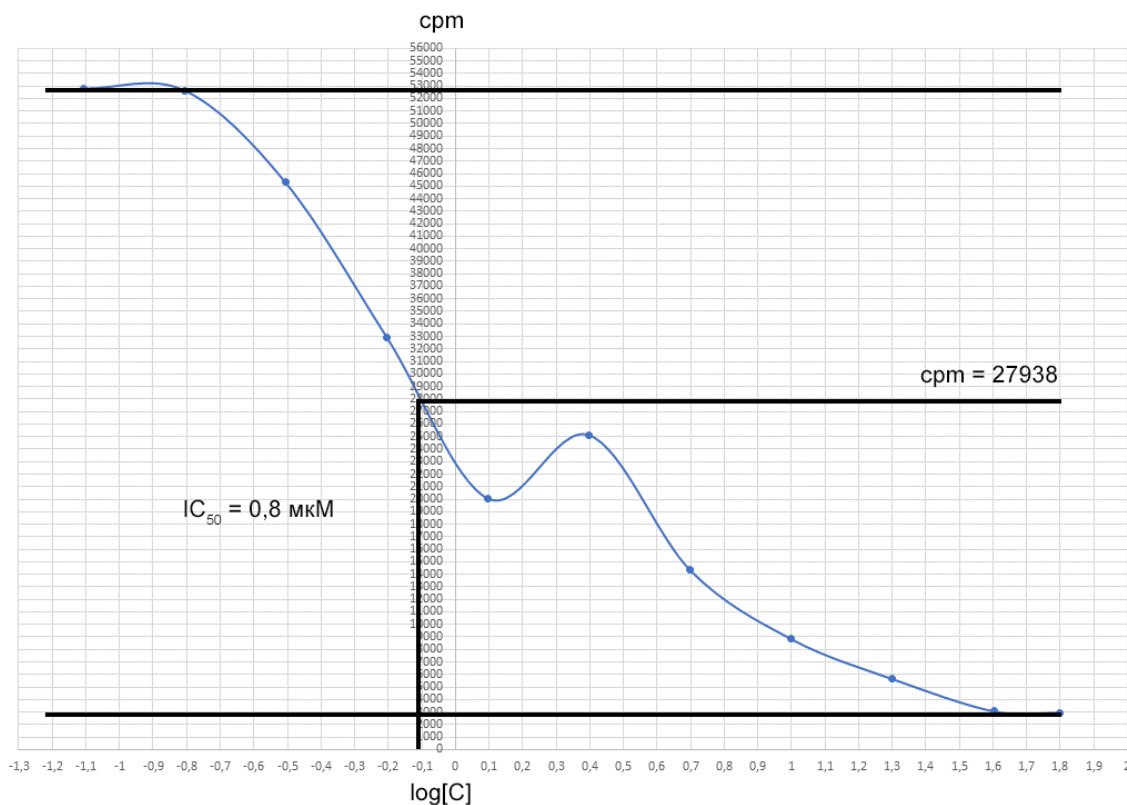
та не формує взаємодій з протеїном. 2-тієніловий фрагмент направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує гідрофобні взаємодії з Lys68, Phe113 та Ile95.

Метил-3-[(1-оксоісотіохромен-3-карбоніл)аміно]бензоат (сполуки **4.16**, див. рис. 4.2 г) утворює водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки протеїнкінази CK2 Val116 та ASN118 через метоксикарбонільну та пептидну групу. 1-оксоісотіохроменовий гетероцикл направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Met163, Ile95, Val66, Val53, Phe113 та Ile174.

6-(5-бромо-2-тієніл)-2-феніл-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-он (сполуки **4.18**, див. рис. 4.2 д) своїм 1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-оновим фрагментом розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці та утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком шарнірної ділянки Val116. Додатково цей фрагмент формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Met163 та Ile174. Фенільний фрагмент направлений у бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені та формує гідрофобні взаємодії з амінокислотним залишком Leu45. 5-бромо-2-тієнільний фрагмент направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази CK2 та формує гідрофобні взаємодії з Ile95, Lys68, Phe113 та Ile174.

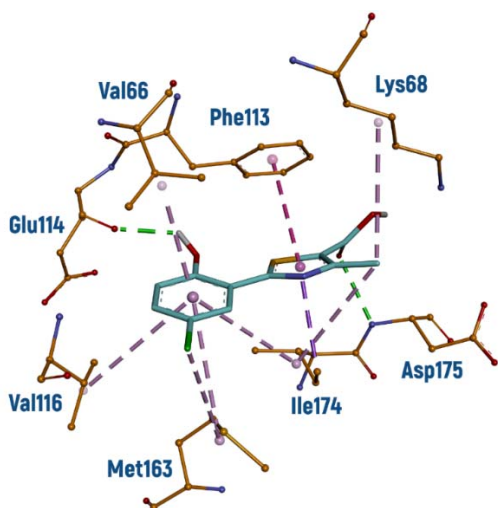
Загалом, сполуки **4.1**, **4.4**, **4.10**, **4.13**, **4.16** та **4.18** мають типовий механізм взаємодії для кіназних інгібіторів I типу (можливо, за винятком водневого зв'язку з амінокислотними залишками Lys68 та/або Asp175). Досить низькі значення IC<sub>50</sub> можна пояснити відсутністю водневих зв'язків з Lys68 та/або Asp175 та наявністю в будові сполук рухливих лінкерів, що впливатимуть на стабільність комплексу ліганд-протеїнкіназа.

Особливу увагу треба приділити найактивнішій сполуці вибірки **4.19** (2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксільна кислота). Вона має IC<sub>50</sub> 0,8 мкМ (графік розтитрування див. рис. 4.3), LE – 0,5 і є найбільш перспективною сполукою для подальшого дослідження.



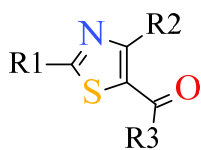
**Рис. 4.3.** Графік розтитровування і визначення  $IC_{50}$  сполуки **4.19**

На рис. 4.4 зображено комплекс 2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислоти з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнази СК2. 5-хлоро-2-гідрокси-фенільний фрагмент розташовується в аденін-зв'язувальній кишені та 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 вглиб АТФ-зв'язувального сайту та через карбокси групу утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Asp175. Також цей фрагмент формує низку гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113. Таким чином ця сполука досить міцно фіксується в сайті зв'язування та, відповідно, має найкращі значення  $IC_{50}$  та LE.



**Рис. 4.4.** Комплекс сполуки **4.19** отриманий за допомогою молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

**4.1.4. Хімічна оптимізація похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти.** Для більш детального аналізу похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти (див. рис. 4.5) з колекції сполук відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ було відібрано 38 сполук для перевірки їхньої інгібувальної активності щодо протеїнкінази СК2 *in vitro*.



**Рис. 4.5.** Загальна хімічна структура похідних -метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти

Результати біохімічного тестування 38 аналогів сполуки 16 представлені в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2.

**Структури замісників R<sub>1</sub> та R<sub>2</sub>, молекулярна маса, залишкова активність протеїнкінази СК2 та IC<sub>50</sub> похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти**

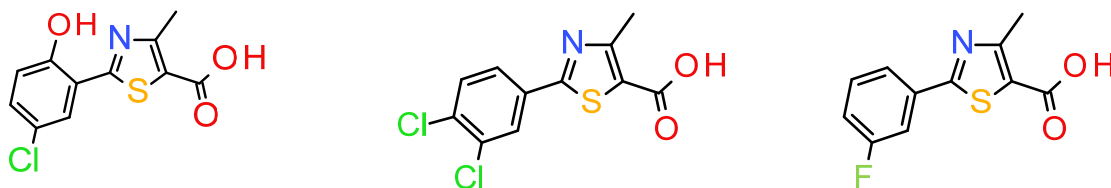
Сполука	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Молекулярна вага	Залишкова активність СК2, %
4.19	2-OH-5-Cl-Ph-	Me	OH	270	18,3 (IC <sub>50</sub> = 0,8 μM)
4.20	3,4-dCl-Ph-	Me	OH	288	34,3 (IC <sub>50</sub> = 3,5 μM)
4.21	3-F-Ph-	Me	OH	237	28,5 (IC <sub>50</sub> = 0,4 μM)
4.22	3-MeO-Ph-	Me	OH	249	40,2
4.23	2-F-Ph-	Me	OH	237	42
4.24	2-MeO-Ph-	Me	OH	249	43,7
4.25	4-MeO-Ph-	Me	OH	249	45,9
4.26	2-Me-Ph-	Me	OH	233	44,2
4.27	4-Me-PhO-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	263	48,7
4.28	4-Cl-PhO-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	346	37,6
4.29	3-Py-	Me	OH	220	44,5
4.30	4-Cl-Ph-C(-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -)-	Me	OH	294	35,3
4.31	4-Cl-Ph-	Me	OH	254	52,9
4.32	2,6-dF-Ph-	H	OH	241	53,1

Продовж. табл. 4.2.

4.33	2,6-dF-Ph-	Me	OH	255	54
4.34	4-Py-	Me	OH	220	55,8
4.35	Boc-NH-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	272	56
4.36	4-Cl-Ph-C(-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	Me	OH	296	57,5
4.37	2-Thienyl-	Me	OH	225	58,4
4.38	4-F-Ph-	Me	OH	237	59,2
4.39	Ph-	Me	NH <sub>2</sub>	218	61,5
4.40	4-Cl-Ph- CH(NMe <sub>2</sub> )-	Me	OH	331	61,6
4.41	4-Et-Ph-	Me	OH	247	63
4.42	4-Et-Ph-	Me	OEt	275	63,8
4.43	PhO-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	249	64,3
4.44	4-F-Ph-	Me	OEt	265	66,1
4.45	Ph-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	233	66,5
4.46	4-Me-Ph-	H	OEt	247	66,5
4.47	2-Py-	Me	OH	220	67
4.48	2-Cl-6-F-Ph-	Me	OH	272	67,3
4.49	2-Me-PhO-CH <sub>2</sub> -	Me	OH	300	68,4
4.50	Ph-CH(NMe <sub>2</sub> )-	Me	OH	313	70,4
4.51	Ph-	CF <sub>3</sub>	OH	273	71,3
4.52	4-MeO-Ph-	Me	OEt	277	71,4
4.53	2-Me-Ph- CH(NMe <sub>2</sub> )-	Me	OH	327	75,3
4.54	H	CF <sub>3</sub>	OH	197	85,5
4.55	Ph-	CF <sub>3</sub>	OEt	301	87,2
4.56	CF <sub>3</sub> -	Me	OH	211	89,2
4.57	Ph-	Me	OH	219	91,8



Біохімічне тестування показало, що серед 38 протестованих 12 інгібували протеїнкіназу СК2 більше, ніж на 50% при концентрації інгібітору 10 мкМ. Дві сполуки проявили активність щодо СК2: 2-(3,4-дихлорофеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота (сполука **4.20**) та 2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота (сполука **4.21**) з  $IC_{50}$  3,5 та 0,4 мкМ, відповідно (див. рис. 4.6).



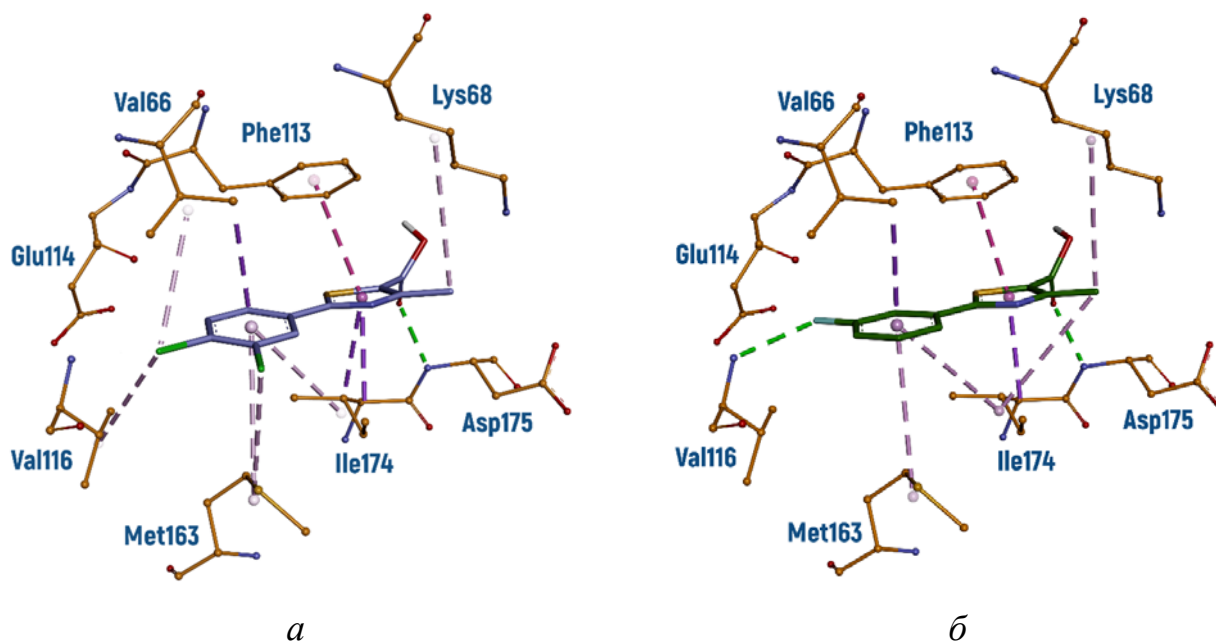
<b>4.19</b>	MW = 270	<b>4.20</b>	MW = 288	<b>4.21</b>	MW = 237
$IC_{50} = 0,8$ мкМ	LE = 0,5	$IC_{50} = 3,5$ мкМ	LE = 0,45	$IC_{50} = 0,4$ мкМ	LE = 0,56

**Рис. 4.6.** Структури, значення  $IC_{50}$ , LE та молекулярної ваги найактивніших сполук серед похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти

Для аналізу взаємодій знайдених сполук було побудовано їхні комплекси з протеїнкіназою СК2 (рис. 4.7).

На рисунку 4.7 А зображено комплекс сполуки **4.20** (2-(3,4-дихлорофеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота) з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. 3,4-дихлорофенільний фрагмент розташовується в аденін-зв'язувальній кишені. Оскільки в положенні на фенільному фрагменті сполуки **4.20** відсутні донори чи акцептори водневого зв'язку, він з амінокислотним залишком шарнірної ділянки Glu114 або Val116 не утворюється. Незважаючи на те, що наявність водневого зв'язку з шарнірною ділянкою СК2 є ключовою для проявлення інгібувальних властивостей інгібіторів I типу протеїнкіназ, сполука **4.20** має доволі високі значення  $IC_{50}$ . Додатково цей фрагмент бере участь у гідروفобних взаємодіях з амінокислотними залишками Val66, Met163, Ile174 та Val116. 5-карбокси-4-метил-тіазол-2-іл направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та через карбокси групу утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Asp175. Також цей фрагмент формує низку гідروفобних взаємодій з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113. Таким чином дана сполука досить міцно

фіксується в сайті зв'язування та, відповідно, має значення  $IC_{50}$  3,5 мкМ та LE – 0,45.



**Рис. 4.7.** Комплекси сполук **4.20** (а) та **4.21** (б) з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнкінази СК2, отримані за допомогою молекулярного докінгу. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

На рисунку 4.7 Б зображено комплекс сполуки **4.21** (2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота) з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнкінази СК2. 3-флуорфенільний фрагмент розташовується в аденін-зв'язувальній кишені та через галогеновий замісник (F) в положенні 3 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 вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та через карбокси групу утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Asp175. Також цей фрагмент формує низку гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Ile174, Lys68 та Phe113. Отже, ця сполука досить міцно фіксується в сайті зв'язування та має значення  $IC_{50}$  0,4 мкМ та LE – 0,56.

Дослідження залежності активності від структури сполук дозволило виділити декілька особливостей для похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти.

Таким чином хлор в пара-положенні сполуки **4.20**, на відміну від гідроксильної групи в сполуці **4.19**, призводить до зменшення інгібувальної активності щодо протеїнкінази СК2 сполук більш, ніж в 4 рази. Заміна атома фтору в мета-положенні фенільного кільця (сполука **4.21**) метоксигрупою (сполука **4.22**) призводить до повної втрати інгібіторної активності. Наявність атома фтору в орто-положенні (сполука **4.23**) замість мета-положення (сполука **4.22**) також призводить до повної втрати інгібувальної активності щодо протеїнкінази СК2. Вірогідно, це можна пояснити втратою водневого зв'язку з шарнірною ділянкою і зміщенням 4-метил-1,3-тіазольного гетероциклу.

Всі активні сполуки в положеннях R2 та R3 містять метил та гідроксильну групу. За результатами молекулярного докінгу сполуки, що містять інші замісники в цих положеннях (**4.32**, **4.39**, **4.42**, **4.44**, **4.46**, **4.51**, **4.52**, **4.54**, та **4.55**), не проявляють активності щодо СК2 та мають зовсім інший механізм взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею. Відповідно до цього механізму зв'язування, тіазольне кільце розташовувалось в аденін-зв'язувальній кишені, а замісник R1 був орієнтований вглиб сайту зв'язування. Таким чином не утворювався водневий зв'язок з амінокислотними залишками шарнірної ділянки та/або з Lys68.

Варто зазначити, що середнє значення молекулярної ваги інгібіторів, що інгібують протеїнкіназу СК2 з  $IC_{50}$  від 1 до 350 нМ, становить 385. Середнє значення молекулярної ваги досліджуваних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбонової кислоти – 260. Цей факт робить дані сполуки перспективними для розробки на їхній основі.

### **Висновки:**

1. Було ідентифіковано 19 інгібіторів протеїнкінази СК2, що належали до 16 хімічних класів. Показник  $IC_{50}$  знайдених сполук знаходився в межах від

0,4 мкМ до 20 мкМ. Найкращу інгібувальну активність проявила сполука 2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота ( $IC_{50} = 0,4$  мкМ).

2. Запропонована модель взаємодії знайдених сполук з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Всі сполуки утворювали водневий зв'язок із амінокислотними залишками шарнірної ділянки (Val116 та/або Glu114) та низку гідрофобних взаємодій з важливими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені (Phe113, Met163, Ile174). Враховуючи це та оцінку ефективності лігандів (LE), основою для подальшої хімічної оптимізації було обрано сполуку 2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота.

3. Проведена хімічна оптимізація сполуки 2-(5-хлоро-2-гідрокси-феніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильної кислоти та знайдено ще 2 нових інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 4-метил-тіазол-5-карбоксильної кислоти: 2-(3-флуорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота та 2-(3,4-дихлорофеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота. Показник  $IC_{50}$  цих сполук становив 0,4 та 3,5 мкМ.

4. Показано способи взаємодії цих сполук з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2. Встановлено, що активність цих сполук базується на формуванні водневих зв'язків цих сполук з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 (амінокислотний залишок Val116) та амінокислотним залишком Asp125. Стабілізацію сполук всередині кишені зв'язування забезпечують гідрофобні взаємодії з Val66, Phe113, Met163, Ile174.

**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Protopopov MV, Volynets GP, Starosyla SA, Vdovin VS, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Identification of 1,3-thiazole-5-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Protein Kinase CK2. *Curr Enzym Inhib.* 2017;14(2):152–9.

2. Protopopov MV, Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell*. 2017 Aug 31;33(4):291–301.

1. Протопопов М., Приходько А., Волинець Г., Бджола В., Ярмолук 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.

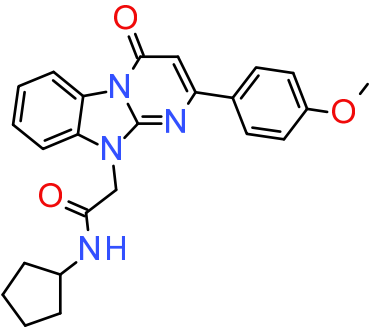
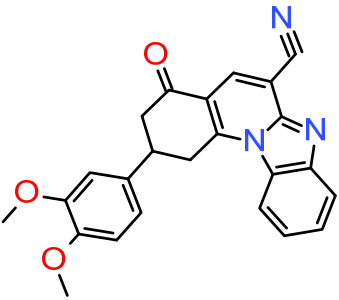
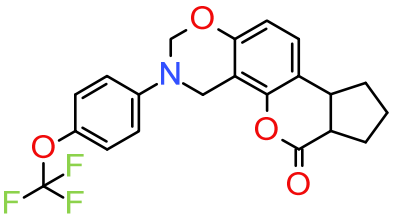
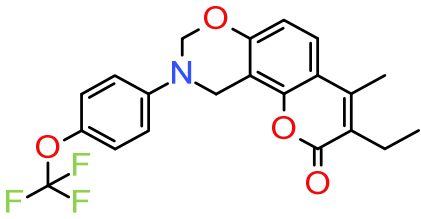
## 4.2. Ідентифікація та дослідження похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону як інгібіторів протеїнкінази СК2

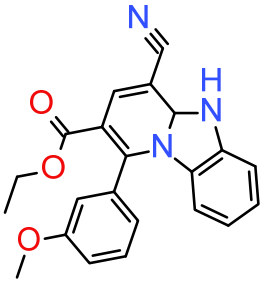
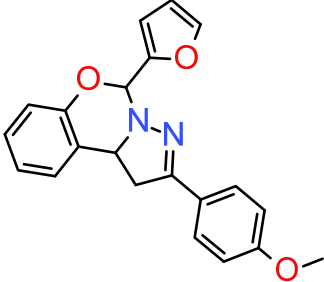
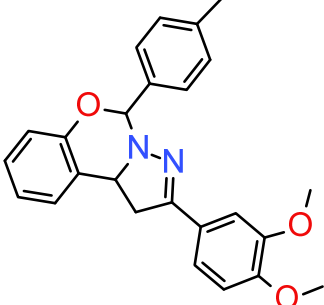
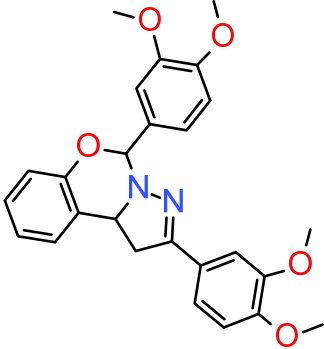
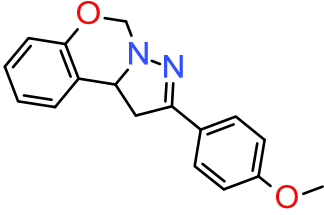
Для раціональної розробки інгібіторів протеїнкінази СК2 людини проводили рецепторно орієнтований віртуальний скринінг 1111 сполук, що належать до різного класу гетероциклічних сполук. Мішенню для молекулярного докінгу була АТФ-зв'язувальна кишеня протеїнкінази СК2 людини. Просторова структура даного протеїну була взята з Protein Data Bank, ідентифікатор структури (PDBID): 3NSZ [94].

Результати молекулярного докінгу були ранжовані за значенням скорингової функції Autodock (відібрані сполуки мали значення скорингової функції менші 8 ккал/моль). Також важливим критерієм відбору було формування ключових водневих зв'язків з АТФ-зв'язувальною кишенею СК2 (водневий зв'язок із шарнірною ділянкою (Val116 та/або Glu114) та консервативним Lys68 вглибині АТФ-акцепторного сайту). За таким принципом було обрано 100 сполук. З використанням програми BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95] побудовано комплекси цих сполук з протеїнкіназою СК2 та візуально проаналізовано. За результатами візуального аналізу зі 100 сполук було обрано 12 для проведення біохімічного тестування для визначення інгібувальних властивостей цих сполук щодо протеїнкінази СК2. Їхні структури та залишкова активність протеїнкінази СК2 за концентрації інгібітора 10 мкМ представлена в таблиці 4.3 [138].

Таблиця 4.3.

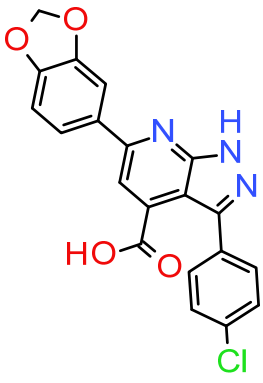
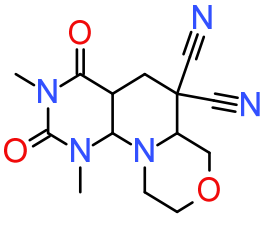
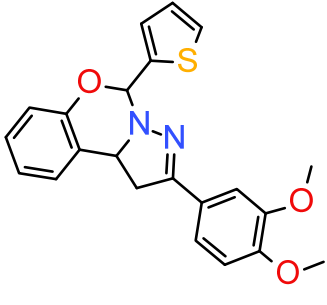
**Хімічні структури відібраних сполук 4.58-4.69 і залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації сполук 10  $\mu$ М**

Сполука	Хімічна структура	Залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 10 мкМ, %
4.58		34
4.59		62
4.60		63
4.61		69

4.62		71
4.63		79
4.64		79,5
4.65		86
4.66		87



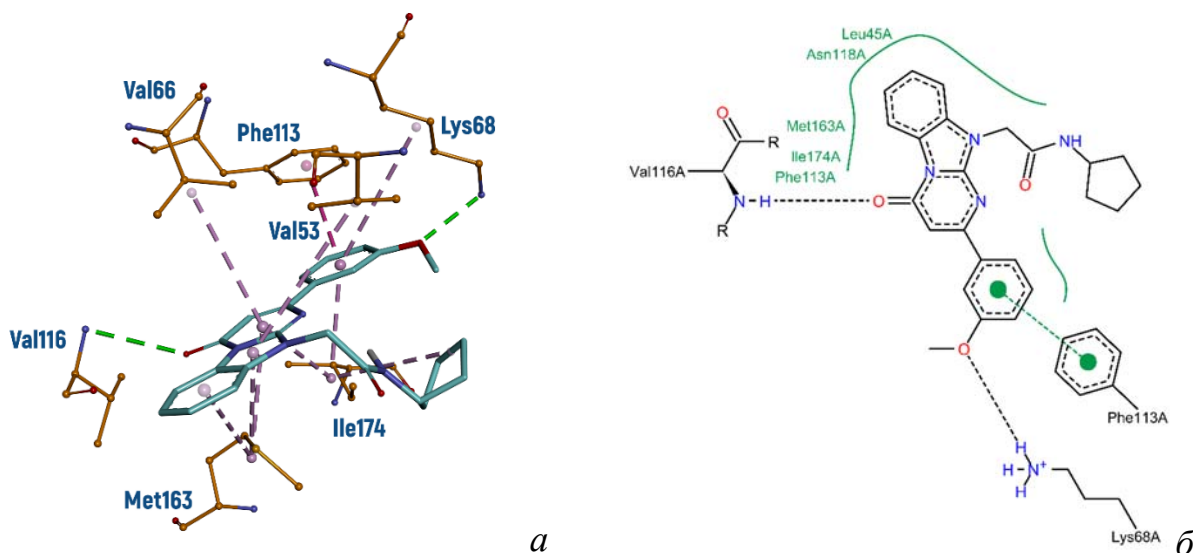
Продовж. табл. 4.3.

4.67		90
4.68		92
4.69		98

Як видно з таблиці 4.3, сполука 10-N-циклопентилацетамід-2-(3-метоксифеніл)дигідробензо [4,5]імідазо [1,2-а]піримідин-4-он (сполука **4.58**) найкраще інгібує протеїнкіназу СК2.  $IC_{50}$  сполуки **4.58** становить 6,8 мкМ. Для глибшого розуміння активності сполуки **4.58** щодо СК2, було досліджено комплекс сполуки **4.58** з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази.

Як видно з моделі взаємодії сполуки **4.58** з протеїнкіназою СК2 (рис. 4.8), дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-оновий гетероцикл розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2 та бере участь у гідрофобних взаємодіях з амінокислотними залишками Met163, Val53 та Ile174. Карбонільна група в 4 положенні гетероциклу утворює водневий зв'язок з аміном амінокислотного залишку шарнірної ділянки Val116. Замісник N-циклопентил-2-(метиламіно)ацетамід формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Leu45 та Ile174. 3-метоксифеніл направлений вглиб з

АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2, в бік гідрофобної ділянки I, де бере участь в гідрофобній взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Ile95, Lys68 та Phe113. Також 3-метоксиеніл утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68. Така взаємодія повністю відповідає моделі I типу інгібіторів протеїнкінази СК2 за Тракслером.



**Рис. 4.8.** Комплекс сполуки **4.58**, отриманої за допомогою молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими. *a* – тривимірна модель, *б* – двовимірна модель взаємодії сполуки **4.58** з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2

Проаналізувавши базу даних біологічних активностей сполук, що мають лікоподібні властивості ChEMBL [139, 140] було знайдено, що похідні дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону (див. рис. 4.9) не досліджувались як інгібітори протеїнкінази СК2. Тому було вирішено досліджувати цей клас далі.

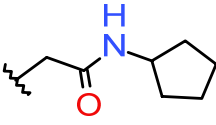
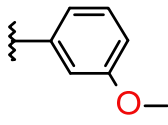
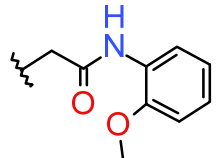
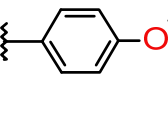
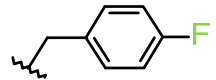
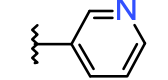
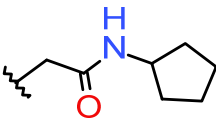
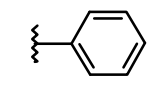
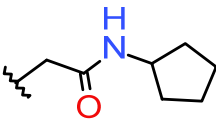
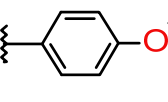
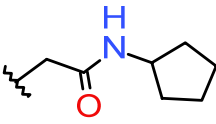
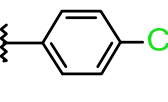
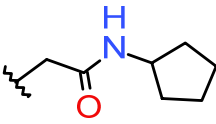
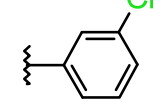
**Рис. 4.9.** Загальна хімічна структура похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону

Для більш глибокого аналізу дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-онів як інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг 231 похідних цього класу. Після ранжування за значенням

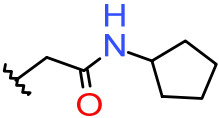
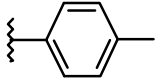
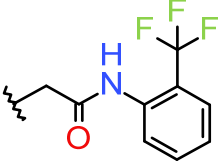
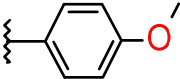
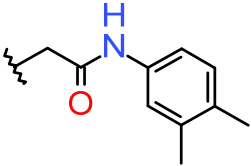
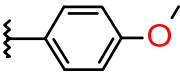
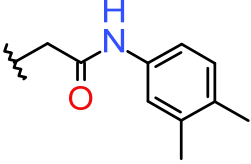
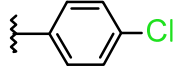
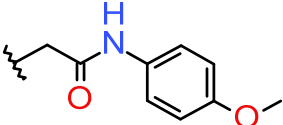
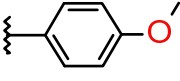
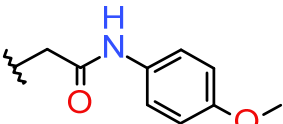
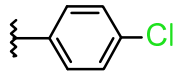
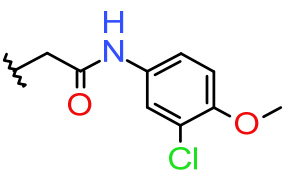
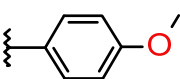
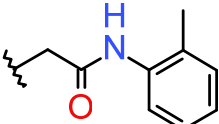
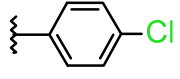
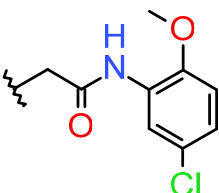
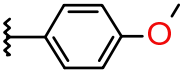
скорингової функції та візуального аналізу комплексів цих сполук з протеїнкіназою СК2 було обрано 37 сполук для біохімічного тестування *in vitro*. Експериментальні дослідження показали, що 32 сполуки інгібували протеїнкіназу СК2 в діапазоні значень  $IC_{50}$  від 2,5 до 7,5 мкМ. Хімічні структури та значення  $IC_{50}$  представлені в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4.

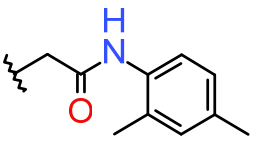
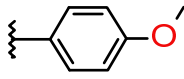
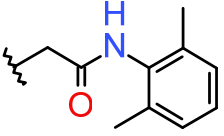
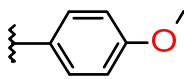
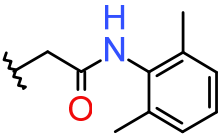
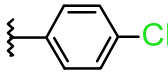
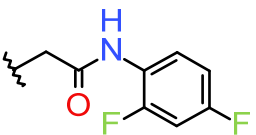
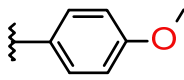
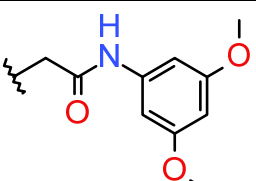
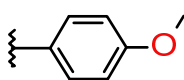
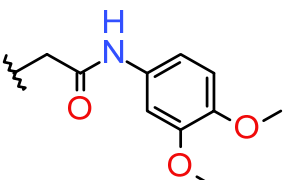
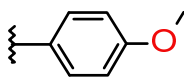
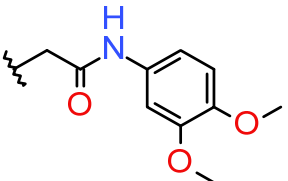
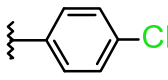
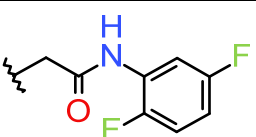
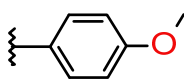
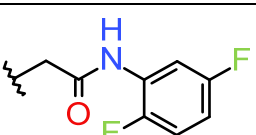
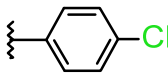
**Хімічні структури та значення  $IC_{50}$  похідних  
дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону**

Сполука	R1	R2	$IC_{50}$ , мкМ	CLogP
4.58			6,8	3,2
4.70			6,0	3,3
4.71			6,3	3,4
4.72			3,5	3,2
4.73			3,2	3,2
4.74			4,0	3,9
4.75			4,2	3,9

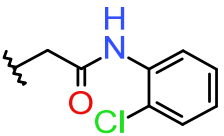
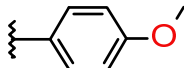
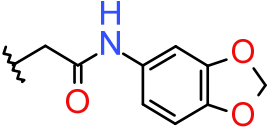
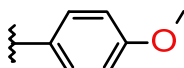
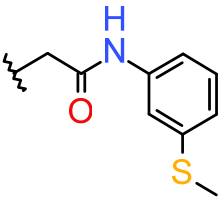
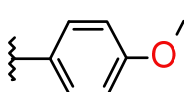
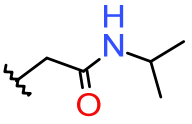
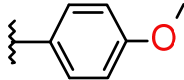
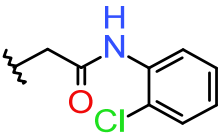
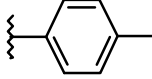
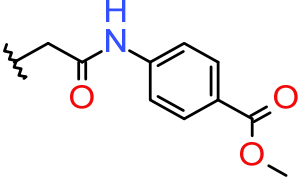
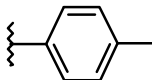
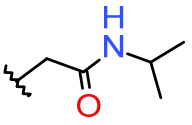
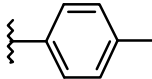
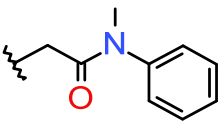
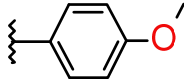
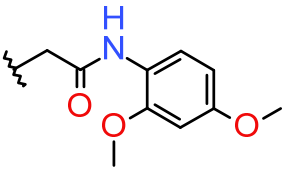
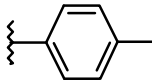
Продовж. табл. 4.4.

4.76			2,7	3,7
4.77			н/д	4,3
4.78			7,5	4,3
4.79			5,2	5,0
4.80			5,6	3,3
4.81			4,9	4,0
4.82			5,0	4,0
4.83			3,2	4,5
4.84			3,6	4,0

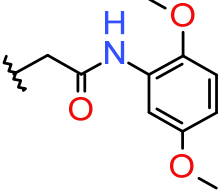
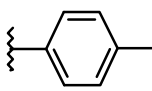
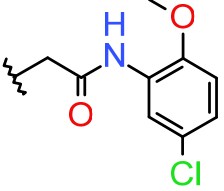
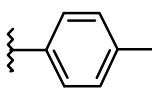
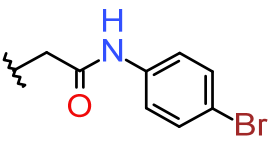
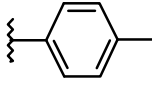
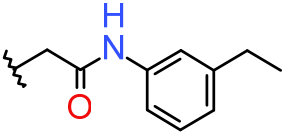
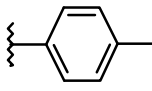
Продовж. табл. 4.4.

4.85			5,6	4,3
4.86			5,4	4,3
4.87			4,2	5,0
4.88			6,2	3,8
4.89			н/а	3,3
4.90			н/а	3,3
4.91			6,7	4,0
4.92			4,0	3,8
4.93			2,7	4,4

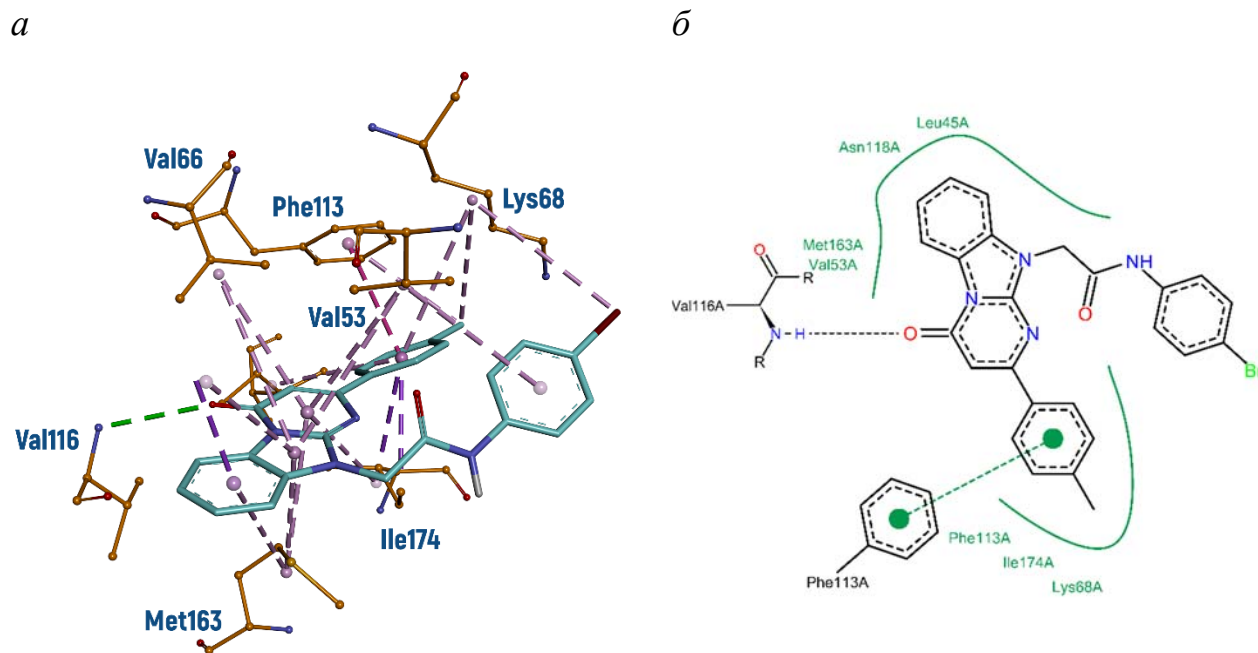
Продовж. табл. 4.4.

4.94			4,5	4,0
4.95			4,4	3,1
4.96			3,5	3,9
4.97			н/а	2,5
4.98			2,5	4,5
4.99			3,4	3,7
4.100			3,1	3,0
4.101			н/а	3,6
4.102			н/а	3,8

Продовж. табл. 4.4.

4.103			2,5	3,8
4.104			3,5	4,5
4.105			2,5	4,6
4.106			5,6	4,8

Для вивчення залежності активності нових сполук від їхньої хімічної структури були досліджені комплекси 38 нових похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнкінази СК2. Детальний аналіз показав, що сполуки **4.98**, **4.103** та **4.105** мали схожий спосіб зв'язування як і сполука **4.58** (див. рис. 4.10).



**Рис. 4.10.** Комплекс сполуки **4.105** отриманий за допомогою молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими. *a* – тривимірна модель, *б* – двовимірна модель взаємодії сполуки **4.105** з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2

У досліджуваних сполуках замісник R2 представлений піридилом, фенілом, 3-метоксифенілом, 3-хлорофенілом, 4-метоксифенілом та 4-метилфенілом. Згідно з даними біохімічного тестування та молекулярного моделювання, саме ці замісники відіграють найбільшу роль в зв'язуванні з рецептором та відповідають за покращення їхньої активності відносно вихідної. При порівнянні інгібіторів, що відрізняються тільки замісником R2, сполука **4.76**, де R2 – 4-метилфеніл, інгібує протеїнкіназу СК2 краще, ніж **4.74**, в якій R2 – 4-хлорофеніл ( $IC_{50}$  2,7 та 4 мкМ відповідно). Водночас ті, в яких R2 – 4-хлорофеніл, проявляють кращу інгібіторну активність, ніж ті, в яких R2 – 4-метоксифеніл (пари для порівняння **4.78** та **4.79**, **4.80** та **4.81**, **4.86** та **4.87**, **4.92** та **4.93**, **4.90** та **4.91**). Отже, інгібітори, в яких 4-метилфеніл, проявляють найкращу інгібувальну здатність відносно протеїнкінази СК2 (сполуки **4.76**, **4.98**, **4.99**, **4.100**, **4.103**, **4.104** та **4.105** мають значення  $IC_{50}$  2,7, 2,5, 3,4, 3,1, 2,5, 3,5 та 2,5 мкМ, відповідно). Таким чином залежність інгібіторної активності від хімічної структури замісника R2 можна представити наступною



нерівністю: 4-метилфеніл > 4-хлорофеніл > 4-метоксифеніл. Враховуючи вищеописану залежність, заміщення в позиції R2 можна використовувати для подальших модифікацій похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону з метою покращення їхньої активності.

Точні зв'язки між структурою заступника R1 та активністю похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-он відсутні. Варіації цього замісника не спричиняли видимого ефекту на інгібування СК2.

### **Висновки:**

1. Вперше ідентифіковано інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону.
2. Знайдено 32 інгібітори СК2 серед похідних цього класу. Показник IC<sub>50</sub> найактивнішої сполуки N-(4-бромофеніл)-2-[4-оксо-2-(p-толіл)піримідо[1,2-а]бензамідазол-10-іл]ацетамід становить 2,5 мкМ.
3. Побудовано комплекси похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону з протеїнкіназою СК2. Встановлено, що сполуки формують водневий зв'язок з шарнірною ділянкою (з амінокислотним залишком Val116) та чисельні гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені (Val53, Met163, Asn118, Leu45, Phe113, Ile174, Lys68).
4. Досліджено залежність активності від структури замісників R1 та R2. Запропоновані рекомендації щодо подальшого дизайну інгібіторів даного класу.

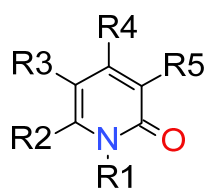
**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Protopopov MV, Ostrynska O V., Starosyla SA, Vodolazhenko MA, Sirko SM, Gorobets NY, Bdzhola VG, Dosenko SM, Yarmoluk SM. 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.
2. Протопопов М, Остринська О., Сірко С., Горобець М., Десенко С., Ярмолук С. Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних

дигідробензо[4,5]імідазо[1,2- $\alpha$ ]піримідин-4-ону. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017, Львів, Україна.

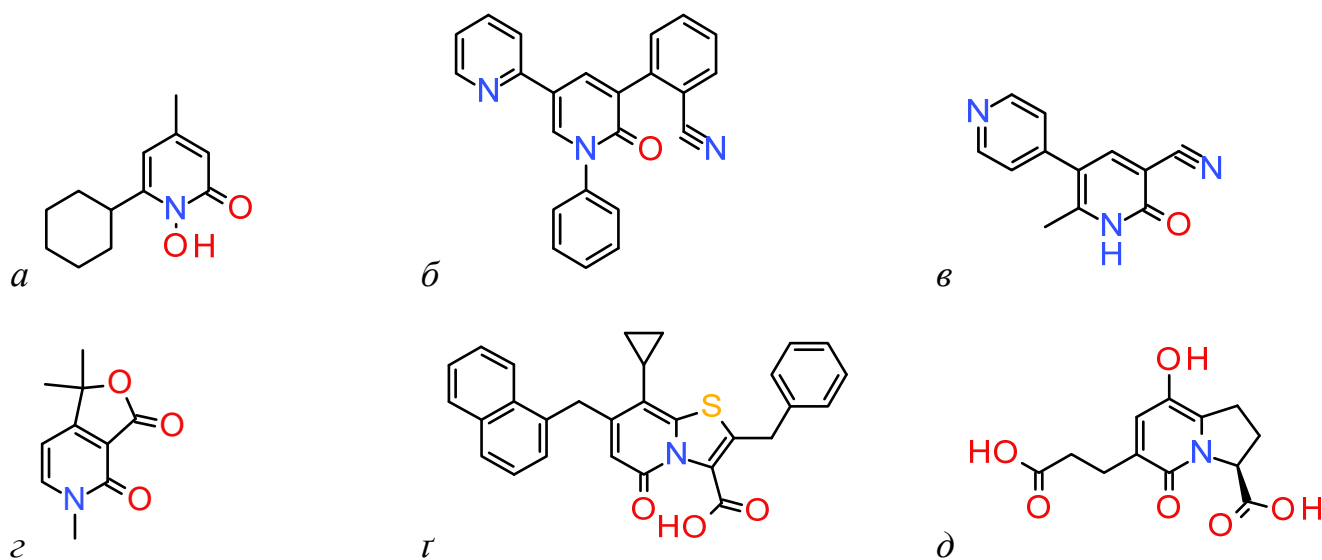
### 4.3. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних 2-піридону (2-гідроксипіридину)

Ароматичні гетероцикли відіграють ключову роль в біоорганічній та медичній хімії. Одним із базових представників є піридин (хімічна формула  $C_5H_5N$ ). 2-гідроксипіридин або 2-піридон (загальна структура показана на рис. 4.11) є похідним від пурину і є широко розповсюдженим скафолдом в природних сполуках, органічних полімерах та фармацевтичних препаратах [137].



**Рис. 4.11.** Загальна структура 2-гідроксипіридину або 2-піридону (а), адаптовано до [137, 144]

2-піридони в складі більших N-вмісних гетероциклів проявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема: протиракову, протизапальну, противірусну, протимікробну та антибактеріальну активність [141-143]. На рис. 4.12 представлено структури відомих природних та синтетичних похідних 2-піридону.



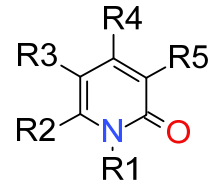
**Рис. 4.12.** Структури відомих природних речовин та фармацевтичних препаратів в структурі яких є 2-піридоновий фрагмент. а – циклопірокс, б – перампанел, в – мілрінон, з – церпегін, r – піліцид, д – А58365А [141-143]

Враховуючи такий великий фармакологічний потенціал похідних 2-піридону, була поставлена задача розробити нові біологічно-активні речовини, а саме інгібітори протеїнкінази СК2, серед похідних цього класу сполук.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було здійснено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки похідних 2-піридону (колекція налічувала 2088 сполук). Молекулярний докінг проводили програмним пакетом Autodock. Мішенню для докінгу був АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази СК2 людини. Отримані результати ранжувались за значеннями скорингової функції пакету MGL Tools. Комплекси сполук, що отримали найкращі значення, візуально оцінювались на наявність необхідних водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Glu114 та/або Val116 та з Lys68 та/або Asp175.

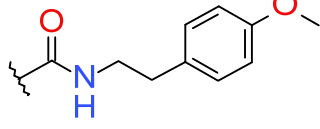
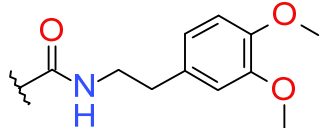
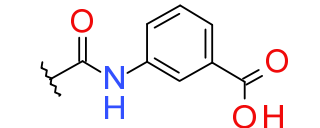
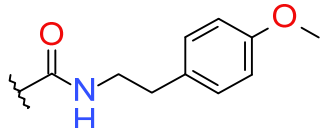
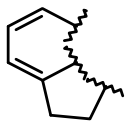
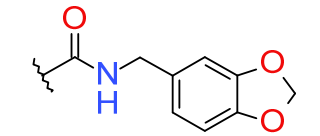
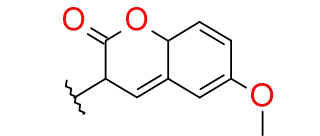
За результатами молекулярного моделювання для біохімічних тестів *in vitro* було відібрано 15 похідних 2-піридону. Всі відібрані сполуки утворювали водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки та іншими ключовими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази СК2. Результати біохімічного тестування представлено в таблиці 4.5 [144].

За результатами біохімічного тестування встановлено, що сполука **4.107** — N-(1,3-бензодіоксол-5-іл-метил)-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід пригнічує активність протеїнкінази СК2 із значенням  $IC_{50}$  8,3 мкМ. Заміна замісника в положенні R5 (N-(1,3-бензодіоксол-5-іл-метилкарбоксамід) у **4.107** на 6-метоксихромен-2-он або (2-карбоніламініотіазол-4-іл)оцтової кислоти етиловий естер призвела до зникнення активності у сполук, що їх містили (**4.115** та **4.116**, відповідно). Введення додаткового циклічного замісника, як у сполуки **4.114**, мало такий же негативний ефект.

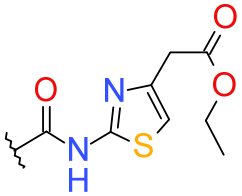
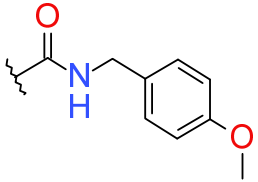
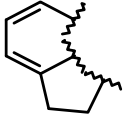
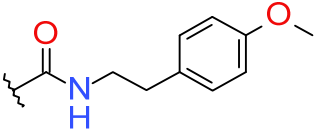
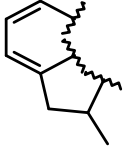
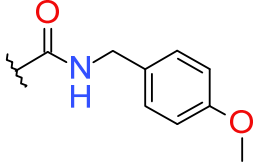
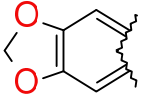
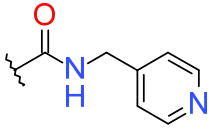
Хімічні структури та значення LogP та IC<sub>50</sub> похідних 2-піридону

Сполука	Хімічна структура замісників					Залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 10 мкМ, %	LogP
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>		
4.107	H	-(CH) <sub>4</sub> -		OH		27,96 (IC <sub>50</sub> = 8,3 мкМ)	1,2
4.108	H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		OH		73,84	1,4
4.109	H	-(CH) <sub>4</sub> -		CH <sub>3</sub>		69,21	1,3

Продовж. табл. 4.5.

4.110	H	-(CH) <sub>4</sub> -	CH <sub>3</sub>		73,25	2,8
4.111	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> COOH	-(CH) <sub>4</sub> -	CH <sub>3</sub>		75,76	1,7
4.112	H	-(CH) <sub>4</sub> -	CH <sub>3</sub>		77,49	2,1
4.113	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-(CH) <sub>4</sub> -	OH		78,03	2,8
4.114			OH		79,2	1,5
4.115	H	-(CH) <sub>4</sub>	OH		79,26	2,2

Продовж. табл. 4.5.

4.116	H	-(CH) <sub>4</sub> -	OH		81,1	1,1
4.117	H	-(CH) <sub>4</sub> -	CH <sub>3</sub>		82,65	2,4
4.118			OH		82,89	2,1
4.119			OH		94,53	2,1
4.120	H		CH <sub>3</sub>	COOH	100,58	1,1
4.121	H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	OH		108,62	0,3

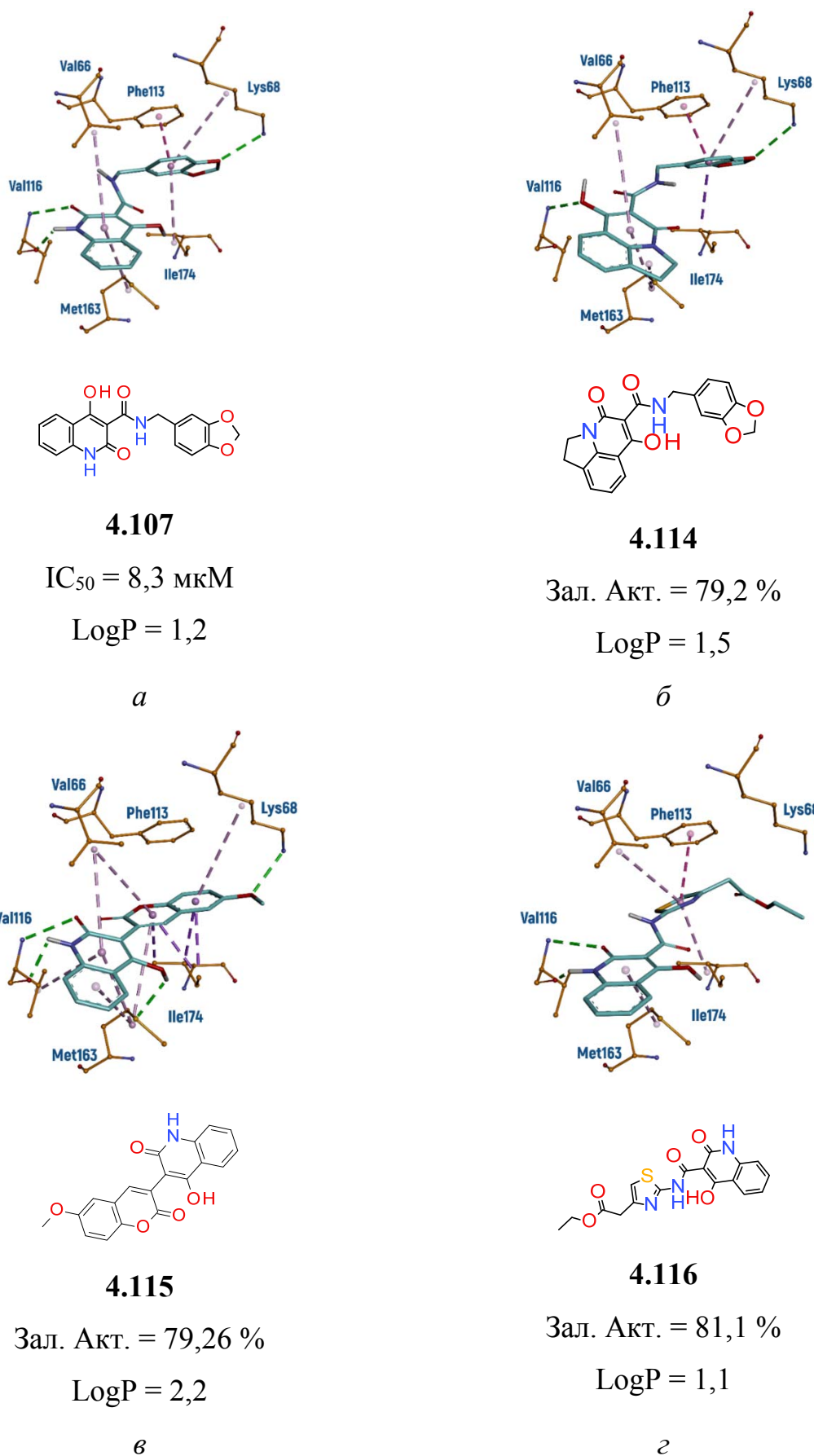
Щоб з'ясувати, чому сполука **4.107** проявила інгібувальну активність, на відміну від її структурних аналогів, було досліджено комплекси похідних 2-піридону з протеїнкіназою СК2 (рис. 4.13). Встановлено, що інгібітор **4.107** фіксується в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази за рахунок низки гідрофобних взаємодій та водневих зв'язків, які виникають у двох протилежних її частинах. Цикл 2-піридону разом із замісником R1 розташовується поруч із шарнірною ділянкою АТФ-акцепторного сайту і задіяний у формуванні 2-х водневих зв'язків. Вони формуються за рахунок атомів Оксигену карбонільної групи і Нітрогену 2-піридону та основним ланцюгом амінокислотного залишку Val116. Замісники R2-R4 орієнтовані на вихід із АТФ-зв'язувальної кишені та беруть участь в утворенні гідрофобних контактів. Замісник R5 спрямовується вглиб сайту зв'язування і утворює водневий зв'язок з Lys68 за участі атома Оксигену бензодіоксолового гетероциклу ліганду. Загалом інгібітор **1** формує гідрофобні контакти з амінокислотними залишками Leu45, Val66, Ile95, Met163, Ile174 та Phe113 ( $\pi$ - $\pi$  стекінг).

Структурні аналоги інгібітору **4.107** – сполуки **4.114-4.116** – займають подібне положення в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 із певними відмінностями, які, ймовірно, і є причиною зникнення активності останніх. Сполука **4.114** за рахунок додаткового циклу орієнтується карбонільною групою та атомом Нітрогену 2-піридону на вихід із сайту зв'язування (позиція протилежна до інгібітору **4.107**), тоді як замісник R<sup>4</sup> (ОН-група) спрямовується в напрямку шарнірної ділянки і утворює водневий зв'язок із атомом Оксигену амінокислотного залишку Val116. При цьому усі гідрофобні контакти та водневий зв'язок з Lys68 зберігаються, як і в сполуки **4.107**.

Сполуки **4.115** і **4.116** відрізняються від інгібітору **4.107** замісником R<sup>5</sup>. У інгібітору **4.107** цей замісник задіяний у  $\pi$ - $\pi$  стекінгу з амінокислотним залишком Phe113, в його неактивних аналогів ця взаємодія відсутня. Незважаючи на різний замісник R<sup>5</sup>, сполуки **4.115** і **4.116** також формують водневий зв'язок вглибині сайту зв'язування молекули АТФ. У сполуки **4.115** він виникає між атомом Оксигену метоксигрупи та Lys68, в сполуки **4.116** – між атомом Оксигену карбонільної групи



ліганду та Asp175. При цьому усі гідрофобні контакти спостерігаються із тими самими амінокислотними залишками, що і в інгібітора **4.107**.

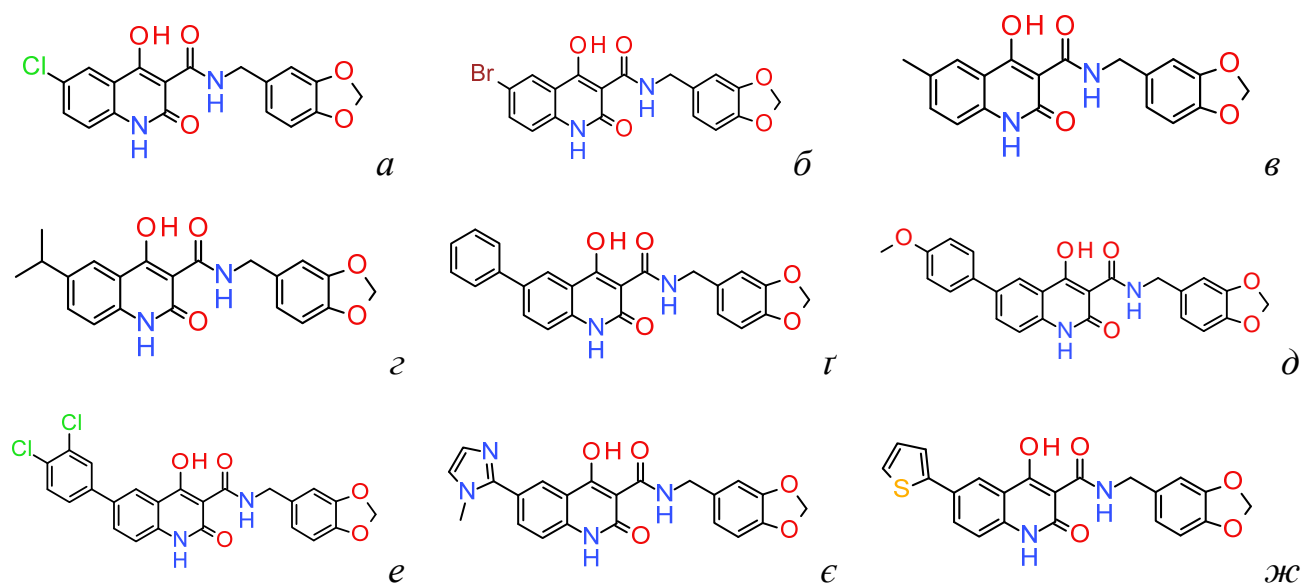


**Рис. 4.13.** Комплекси сполук **4.107** (*a*), **4.114** (*б*), **4.115** (*в*) та **4.116** (*г*), отримані за допомогою молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальну кишеню

протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Враховуючи описаний вище спосіб зв'язування сполуки **4.107** та схожість його з відомими інгібіторами протеїнкінази СК2 серед похідних флавону (FLC26 та FNH79), які інгібують СК2 в наномолярних концентраціях, а також враховуючи низькі значення параметру LogP сполуки **4.107**, похідні 2-піридону мають високий потенціал для подальших досліджень. Модифікації проводились по замісниках в положенні R2 та R3. В сполуці 1 це було кільце, що направлене в гідрофобну ділянку II. Таким чином введення додаткового гідрофобного замісника може суттєво покращити афінність похідних 2-піридону до АТФ-акцепторної кишені протеїнкінази СК2.

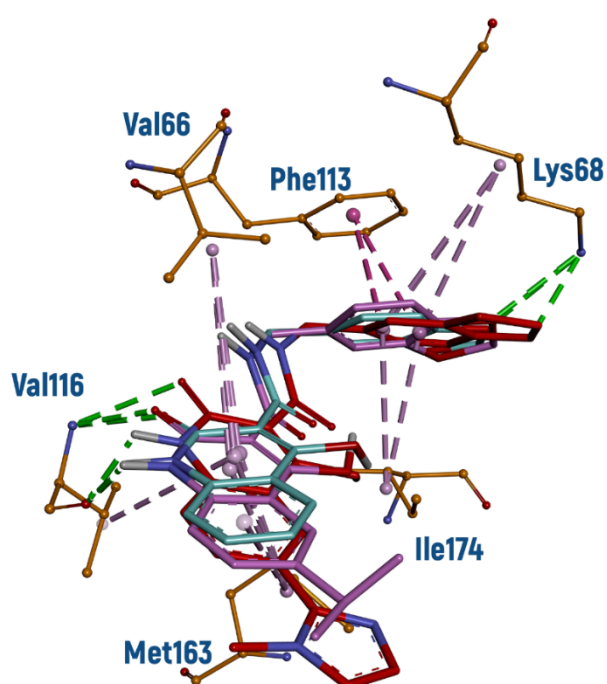
На основі структури сполуки **4.107** та даних молекулярного моделювання було розроблено 9 сполук, потенційних інгібіторів протеїнкінази СК2 (структури цих сполук представлені на рис. 4.14).



**Рис. 4.14.** Структури сполук потенційних інгібіторів СК2 **4.122** (а), **4.123** (б), **4.124** (в), **4.125** (г), **4.126** (д), **4.127** (е), **4.128** (ж), **4.129** (з), **4.130** (и)

Молекулярний докінг сполук **4.122-4.130** показав, що сполуки **4.122-4.123** та **4.129** мали схожий до сполуки **4.107** спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенню СК2 (див. рис. 4.15). Тобто гетероцикл, що містить в своїй структурі 2-піридон, розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувальної кишені

протеїнкінази СК2, введені замісники направлені в сторону гідрофобної ділянки II. Водневі зв'язки формуються за участі Оксигену карбонільної групи і Нітрогену 2-піридону та основним ланцюгом амінокислотного залишку шарнірної ділянки Val116. Замісник в положенні R5 направлений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені та формує водневий зв'язок з амінокислотою Lys68 за участі атома Оксигену бензодіоксолового гетероциклу ліганду. Також бензодіоксоловий гетероцикл замісника в положенні R5 бере участь у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2, зокрема з Phe113.



**Рис. 4.15.** Комплекс сполук 4.107, 4.125 та 4.129, отриманий за допомогою молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Також молекулярний докінг показав, що сполуки 4.126-4.128 та 4.130 мають кардинально інший спосіб взаємодії з протеїнкіназою СК2. Це пов'язано із значним збільшенням замісника в положенні R2-R3.

Таблиця 4.6.

**Значення скорингової функції, молекулярної ваги та кількість важких  
(не гідрогенових атомів) досліджуваних сполук**

<b>Сполука</b>	<b>Кількість важких атомів</b>	<b>Молекулярна вага</b>	<b>Значення DrugScore</b>	<b>Відношення DrugScore до молекулярної ваги</b>	<b>Відношення DrugScore до кількості важких атомів</b>
<b>4.107</b>	25	338	-100.1	-0.3	-4
<b>4.122</b>	26	373	-46.1	-0.12	-1.77
<b>4.123</b>	26	417	-53.6	-0.13	-2.06
<b>4.124</b>	26	352	-103.6	-0.29	-3.98
<b>4.125</b>	28	380	-118.1	-0.31	-4.22
<b>4.126</b>	31	414	-115.4	-0.28	-3.72
<b>4.127</b>	33	444	-130.4	-0.29	-3.95
<b>4.128</b>	33	483	-102.1	-0.21	-3.09
<b>4.129</b>	31	418	-128.8	-0.31	-4.15
<b>4.130</b>	30	420	-113.8	-0.27	-3.79

Значення скорингової функції DrugScore для сполуки **4.107** та сполук **4.122-4.130** представлені в таблиці 4.6. Оскільки деякі замісники привносять великий вклад в молекулярну масу сполуки, значення скорингової функції були апроксимовані до молекулярної ваги та кількості важких атомів. Таким чином, топ-три сполуки за цим показником є **4.125**, **4.129** та **4.107**. Враховуючи схожість розташування цих сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2 (див. рис. 4.15) і характер взаємодій з амінокислотними залишками, можна стверджувати, що сполуки **4.125** та **4.129**, мають значний потенціал стати інгібіторами СК2 із значеннями  $IC_{50}$  як мінімум того ж рангу, що й сполука **4.107**.

**Висновки:**

1. Ідентифіковано інгібітор протеїнкінази СК2 людини серед похідних 2-піридону – N-(1,3-бензодіоксол-5-ілметил)-4-гідрокси-2-оксо-1H-хінолін-3-карбоксамід. Параметр IC<sub>50</sub> цієї сполуки становить 8,3 мкМ.

2. Побудовано комплекси досліджуваних 2-піридонів з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 та досліджено залежність активності сполук від їхньої структури. Активність сполуки N-(1,3-бензодіоксол-5-ілметил)-4-гідрокси-2-оксо-1H-хінолін-3-карбоксамід, на відміну від більшості аналогів, обумовлює наявність  $\pi$ - $\pi$  стекингу з Phe113.

3. Розроблено гіпотезу, згідно якої введення додаткових гідрофобних елементів в структуру замісника R2-R4 може покращити активність похідних 2-піридону.

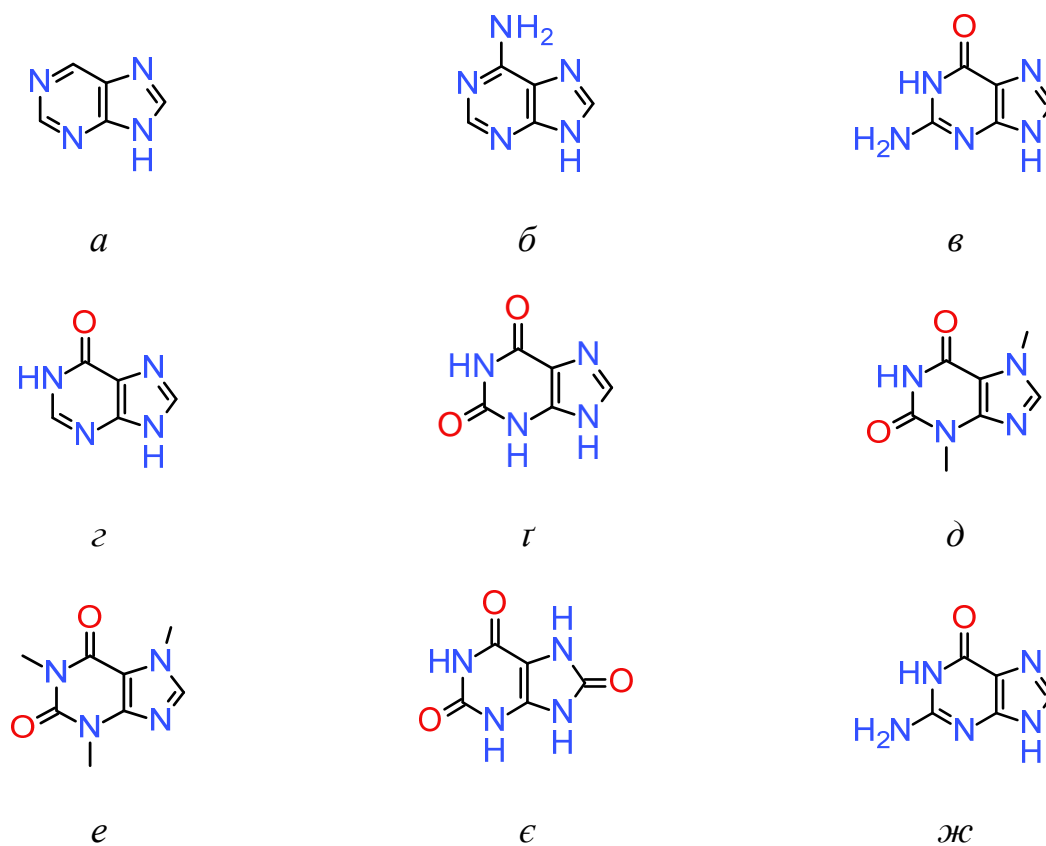
4. Згідно запропонованої гіпотези сконструйовано 9 нових сполук та *in silico* досліджено їхні інгібувальні властивості щодо протеїнкінази СК2.

**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

Остринська ОВ, Українець ІВ, Сидоренко ЛВ, Старосила ЮА, Протопопов МВ, Кухаренко ОП, Бджола ВГ, Ярмолюк СМ. Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 2-піридону.

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

Пурин – один із найбільш розповсюджених нітрогеновмісних гетероциклів у природі. Назву пурин (purin - purum uigicum) придумав Еміль Фішер, який вперше його синтезував у 1899 році. Найвідомішими похідними є аденін, гуанін, гіпоксантин, ксантин, теобромін, кофеїн, сечова кислота та ізогуанін (див. рис. 4.16) [145].

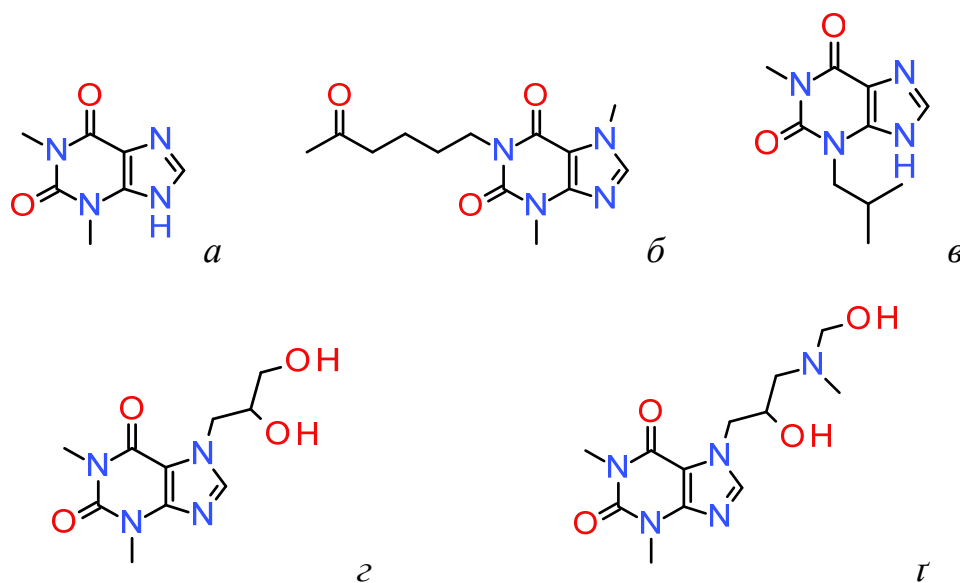


**Рис. 4.16.** Відомі похідні пурину. *a* – пурин, *б* – аденін, *в* – гуанін, *г* – гіпоксантин, *д* – ксантин, *е* – теобромін, *ж* – кофеїн, *з* – сечова кислота, *и* – ізогуанін [145]

Незаміщений пурин в природі не зустрічається. Найпростіше похідне пурину –  $\beta$ -D-рибонуклеозид або небуларін, антибіотик, що був виділений з гриба *Agaricus nebularis*. Велика кількість похідних пурину (особливу аденіну) задіяні в чисельні метаболічні процеси. Аденозин 3'-трифосфат використовується як джерело енергії для клітин, аденозин 3',5'-циклофосфат використовується як

вторинний месенджер при трансдукції сигналу по сигнальних шляхах, нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD; NAD<sup>+</sup>) та флавінаденіндинуклеозид (FAD) – використовуються як коензими в окисно-відновних процесах клітини. Проте, мабуть, одними з найважливіших похідних пурину є аденозин та гуанін, що являються складовою ДНК та РНК, двох найважливіших макромолекул життя [145].

У даному дослідженні мова йтиме про похідні пурин-2,6-діону або ксантину (пуринового алкалоїду). Сполуки цього класу вже знайшли своє застосування в медицині (див. рис. 4.17). До прикладу: 1,3-диметилксантин або теофілін (лікарський засіб, що застосовується при лікуванні респіраторних захворювань), 3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-3,7-дигідро-1Н-пурин-2,6-діон або пентоксифілін (інгібітор фосфодіестерази, що застосовується при лікуванні широкого спектру хвороб), 1-метил-3-(2-метилпропіл)-7Н-пурин-2,6-діон або ІВМХ (неселективний інгібітор фосфодіестерази), 7-(2,3-дигідрооксипропіл)-1,3-диметил-3,7-дигідро-1Н-пурин-2,6-діон або діпрофіллін та ксантин нікотинат (для покращення периферичного та мозкового кровообігу) [146, 147].



**Рис. 4.17.** Структури відомих лікарських засобів на основі похідних пурин-2,6-діону. Теофілін (а), пентоксифілін (б), ІВМХ (в), діпрофіллін (г) [141, 142]



Також серед похідних пурин-2,6-діону відомі інгібітори протеїнкінази BRAF, Caf1 рибонуклеази, аденозинового рецептора, аденозин A2B рецептора, 5-HT1A рецептора та NM74A рецептора [148-150]

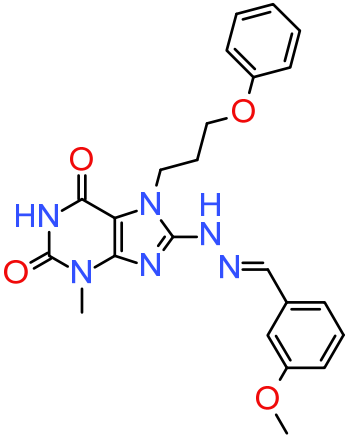
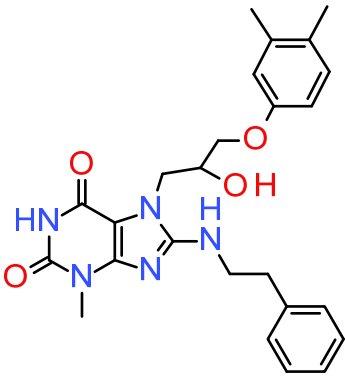
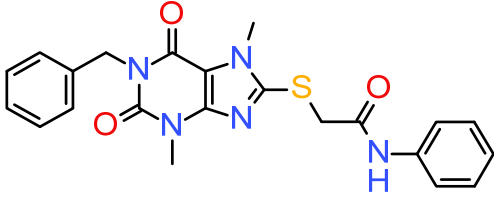
Враховуючи вище згадані особливості похідних пурину, і, зокрема, похідних пурин-2,6-діону, було вирішено зробити пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед цього класу сполук.

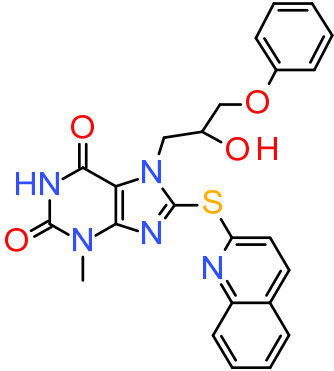
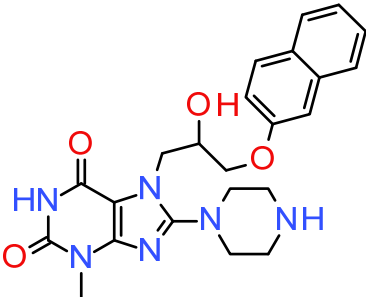
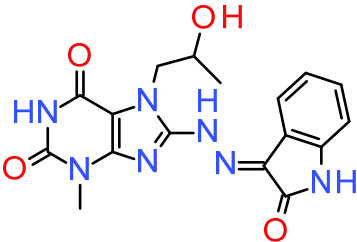
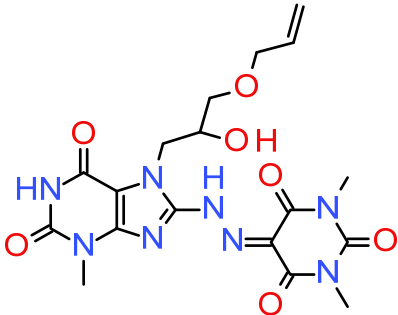
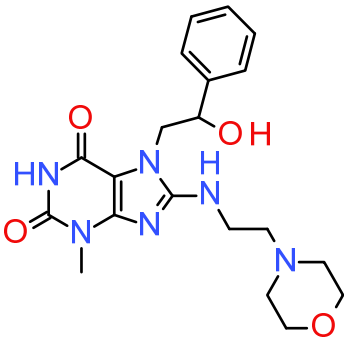
Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проаналізовано віртуальну колекцію похідних пурин-2,6-діону, що налічує 1943 сполуки. Аналіз проводився шляхом молекулярного докінгу в АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкінази СК2 людини. Після молекулярного докінгу сполуки ранжувались згідно значень скорингової функції Autodock та комплекси цих сполук було візуалізовано в програмі BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95], а також проаналізовано наявність необхідних водневих зв'язків з ключовими амінокислотними залишками (Val116, Glu114, Lys68, Asp125).

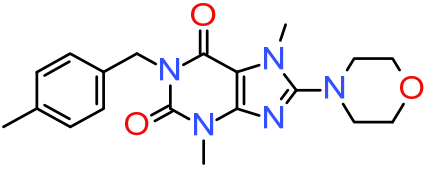
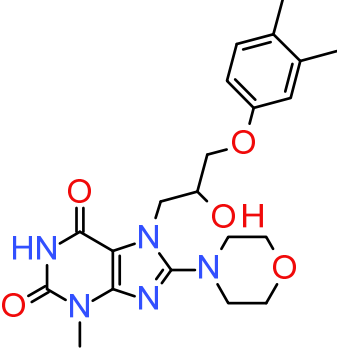
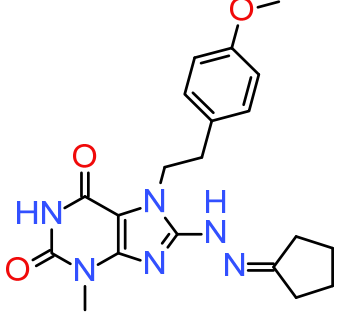
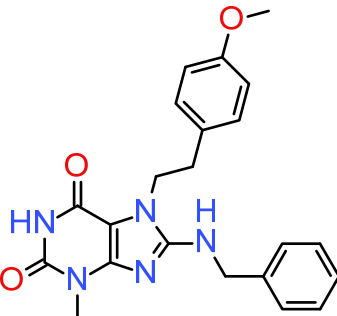
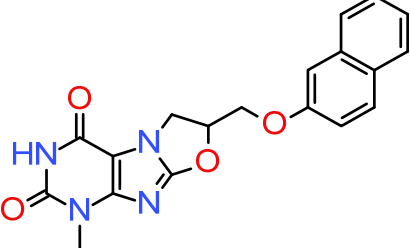
19 сполук, з найкращими показниками скорингової функції та з необхідними водневими зв'язками, були відібрані для дослідження інгібувальної активності протеїнкінази СК2 *in vitro*. Структури, залишкові активності протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 10 мкМ та значення ліпофільності, представлені в таблиці 4.7 [151].

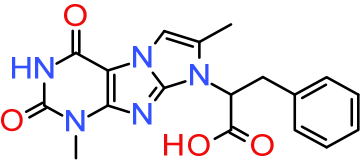
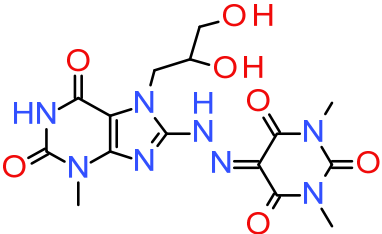
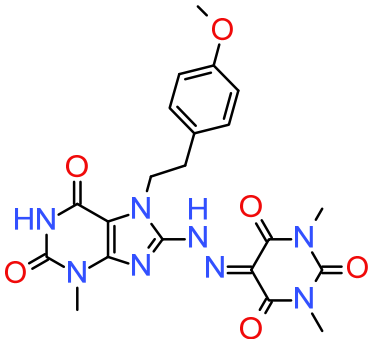
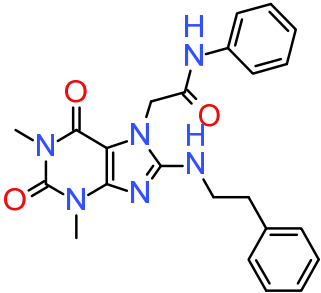
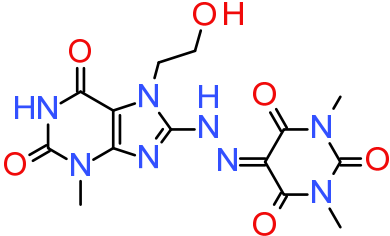
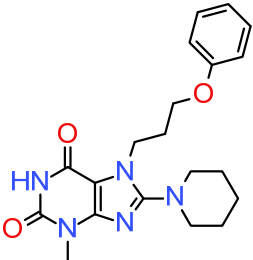
Таблиця 4.7.

Структура, залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 10 мкМ та значення параметру LogP похідних пурин-2,6-діону

Сполука	Хімічна структура	Залишкова активність протеїнкінази СК2 при концентрації інгібітора 10 мкМ, %	CLogP
4.131		22,34 (IC <sub>50</sub> = 8,5 мкМ)	2,9
4.132		59,48	4
4.133		60,49	3,2

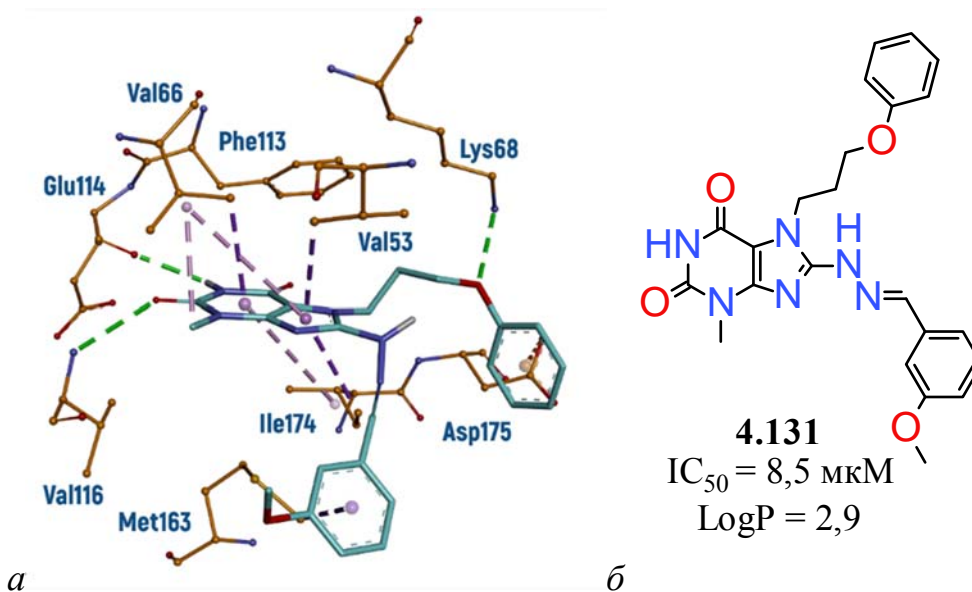
4.134		69,75	4,2
4.135		71,05	1,8
4.136		78,67	0,8
4.137		78,75	-0,6
4.138		80,49	0,9

4.139		81	2,4
4.140		81,9	2,2
4.141		82,35	3
4.142		84,85	3,5
4.143		85,3	2,6

4.144		86,31	1,5
4.145		91,36	-1,5
4.146		93	1,4
4.147		94,61	2,8
4.148		96,26	-1,1
4.149		97,13	3

Як видно з таблиці 1, найактивнішою сполукою була сполука 1-8-[2-[(3-метилоксибеніл)метиліден]гідразин-1-іл]-3-метил-7-(3-феноксипропіл)-2,3,6,7-тетрагідро-1Н-пурин-2,6-діон (сполука **4.131**), значення  $IC_{50}$  якої становить 8,5 мкМ.

Комплекс сполуки **4.131** (рис. 4.18) з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2 був отриманий з використанням методу молекулярного докінгу програмним пакетом Autodock. Пурин-2,6-діоновий (ксантиновий) фрагмент сполуки **4.131** розташовується в аденін-зв'язувальному сайті АТФ-акцепторного сайту СК2 та формує водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Glu114 та Val116. Ксантиновий гетероцикл залучений в гідрофобні  $\pi$ -алкіл-взаємодії з амінокислотними залишками Phe174 та Val66. Метил в третій позиції направлений в гідрофобну ділянку II. 3-феноксипропіл орієнтований вглиб АТФ-зв'язувального сайту та формує водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68.



**Рис. 4.18.** Спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальною кишенею протеїнкінази СК2 (а) сполуки 4.131 та структура (б) сполуки 4.131. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими пункт

Введення замісників бензилу або 4-метилбензилу (сполуки **4.133** та **4.139**) в першій позиції призводить до втрати інгібувальної здатності щодо СК2. Це може пояснюватись тим, що такі великі гідрофобні замісники призведуть до суттєвої зміни орієнтації пурин-2,6-діонового фрагменту в аденін-зв'язувальному сайті та

втраті водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Glu114 та Val116.

Сполуки з замісниками в сьомій позиції, що містять в 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 їхній основі. Враховуючи цей аспект, особливу увагу, окрім біологічної активності сполуки, необхідно приділити їхнім фізико-хімічним властивостям. Одним із таких параметрів є LogP. За правилом Ліпінського, значення параметру LogP не повинно перевищувати 5. Для досліджуваних сполук діапазон значень LogP від -1,5 до 4,2. У найактивнішої сполуки **4.131** з IC<sub>50</sub> 8,5 мкМ, параметр LogP становить 2,9. Ці значення є оптимальними, адже часто для покращення активності сполук (особливо стосовно протеїнкінази СК2) потрібні додаткові гідрофобні замісники. Інгібіторну активність сполуки **4.131** можна значно покращити використовуючи такий підхід.

### **Висновки:**

5. Ідентифіковано інгібітор протеїнкінази СК2 людини серед похідних пурин-2,6-діону, сполука 1-8-[2-[(3-метилоксибеніл)метиліден]гідразин-1-іл]-3-метил-7-(3-феноксипропіл)-2,3,6,7-тетрагідро-1Н-пурин-2,6-діон інгібує протеїнкіназу СК2 зі значенням параметру IC<sub>50</sub> – 8,5 мкМ.

6. Досліджено комплекси похідних пурин-2,6-діону та залежність інгібувальної активності від структури сполук. Встановлено, що введення замісників, які блокують утворення водневого зв'язку з амінокислотними залишками Val116 та/або Glu114 шарнірної ділянки протеїнкінази СК2 та замісників з довгими гнучкими лінкерами, є критичним для інгібування СК2.

7. Аналіз фізико-хімічних властивостей розроблених сполук показав, що при значенні показника IC<sub>50</sub> 8,5 мкМ LogP сполуки 1-8-[2-[(3-метилоксибеніл)метиліден]гідразин-1-іл]-3-метил-7-(3-феноксипропіл)-2,3,6,7-

тетрагідро-1Н-пурин-2,6-діон становить 2,9, що розширює межі подальшої хімічної оптимізації даної сполуки з метою покращення її інгібувальних властивостей щодо протеїнкінази СК2.

**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

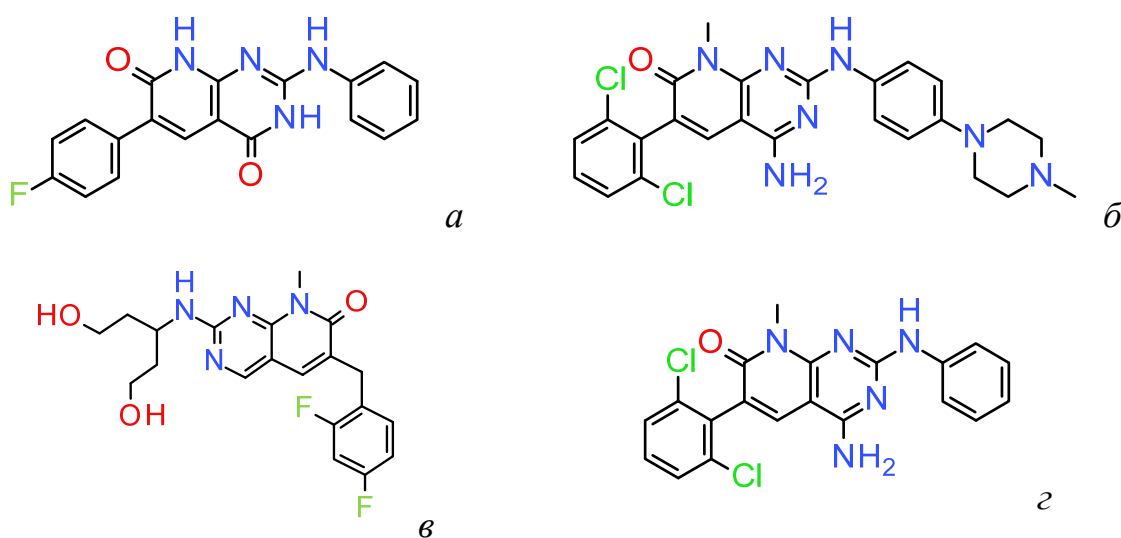
Protopopov MV, Ostrynska O V., Ivanchenko DH, Starosyla SA, Bdzhola VG, Romanenko MI, Yarmoluk SM. Developing of protein kinase CK2 inhibitors based on purine-2,6-diones derivatives. Ukr Biochem J. 2017 Oct 25;89(5):32–9..



#### 4.5. Розробка інгібіторів протеїнкінази СК2 на основі похідних піридо[2,3-d]піримідину

Піримідинова система має широке розповсюдження в природі [152]. Саме цей гетероцикл є основою нуклеотидів таких як цитозин, тимін та урацил, а також входить до складу таких сполук як тіамін (вітамін В1) та алоксан. Зважаючи на присутність в ключових біологічно активних молекулах, піримідини є важливими білдинг-блоками для медичних хіміків. На основі піримідинів конструюють багато злитих гетероциклічних систем. Піридопіримідини – є одними з найбільш розповсюджених та біологічно значимих конденсованих гетероциклічних систем на основі піримідину.

Похідні піридопіримідинів проявляють надзвичайно широкий спектр біологічної активності: анальгетичну, протизапальну, цитопротекторну, бронхолітичну, антитромботичну, протиалергічну, антиатеросклеротичну, противірусну [153], протимікробну, протигрибкову та протиракову активності [154]. Також піридопіримідини проявляють інгібіторну активність стосовно ряду ферментів EGFR [155], циклінзалежних кіназ (CDK4/6) [156], Src-тирозинова кіназа [157] JNK кіназа [158], Abl кнази (PD173955) [159] p38 MAP кінази (Pamapimod) [160], BCR кінази, DDR2, фосфодіестерази, MEK1/MEK2, фосфодіезітол 3 кінази та ін [161] (див. Рис. 4.19).



**Рис. 4.19.** Структури похідних піридо[2,3-d]піримідину з відомою

біологічною активністю. *a* – противірусна активність, *b* – інгібітор BCR, *v* – інгібітор p38 MAP кінази, *z* – інгібітор DDR2 [153-161]

Надзвичайно широкий спектр біологічної активності, і, особливо, активність щодо протеїнкіназ, робить похідні піридопіримідину привабливими для дослідження їхньої можливої дії на протеїнкіназу СК2.

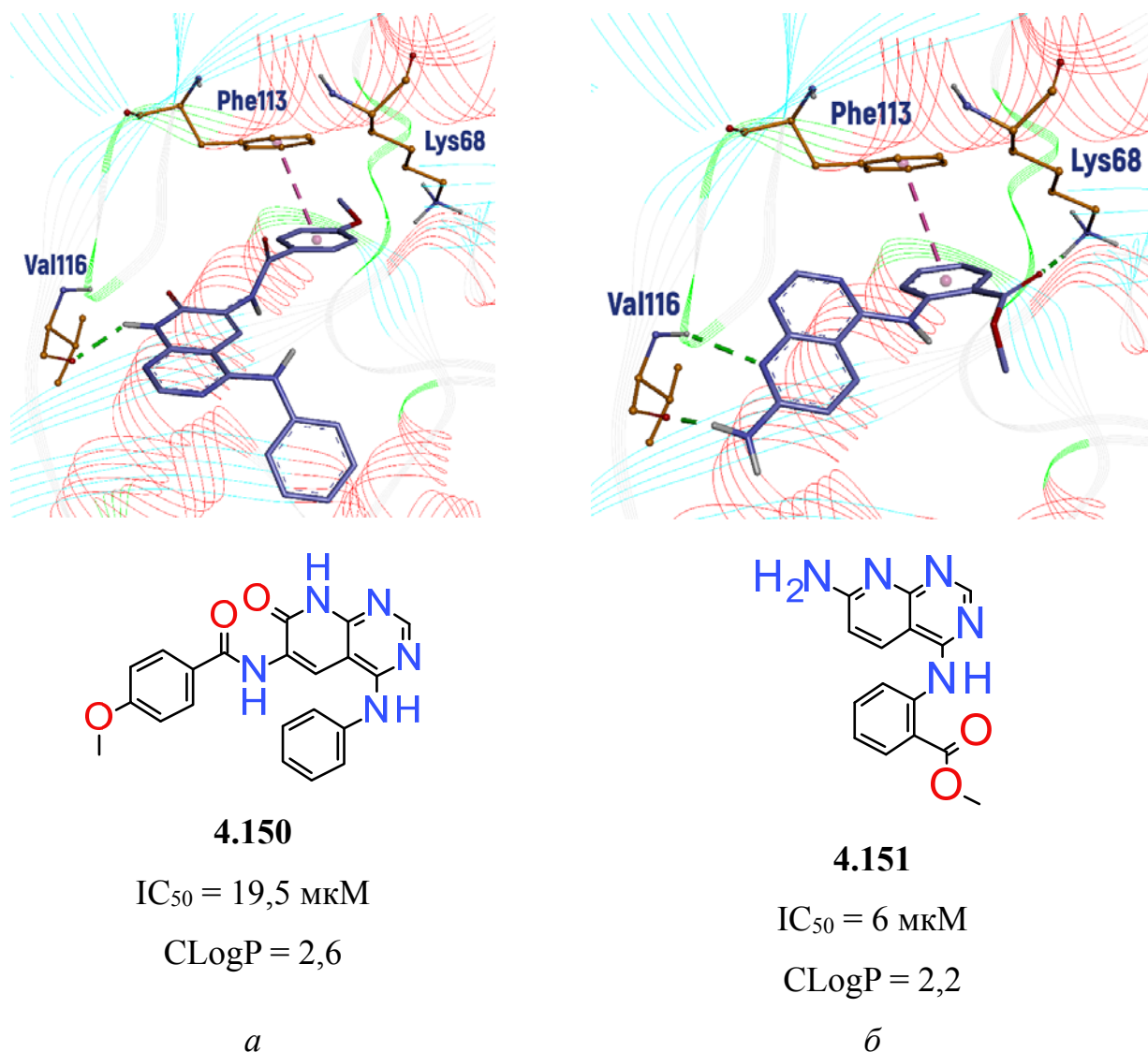
Для пошуку активних сполук було проведено молекулярний докінг віртуальної бібліотеки низькомолекулярних сполук, що налічувала 3408 похідних піридопіримідину.

Молекулярний докінг проводили в АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкінази СК2. Докінг проводився програмним пакетом Autodock. Отримані результати були оцінені скоринговою функцією програми Autodock та комплекси сполук були переглянуті для виявлення необхідних водневих зв'язків (з амінокислотними залишками Val12 та/або Glu114 – шарнірною ділянкою та з консервативним залишком Lys68).

За результатами комп'ютерного моделювання було відібрано 14 сполук для проведення біохімічного тестування *in vitro* [162].

Біологічні експерименти показали, що з 14 сполук інгібіторну активність щодо СК2 проявили лише дві сполуки: N-(4-аніліно-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід (**4.150**) та метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.151**).

Комплекси цих сполук з АТФ-зв'язувальною ділянкою протеїнкінази СК2 було отримано методом молекулярного докінгу та представлено на рис. 4.20.



**Рис. 4.20.** Структура, значення  $IC_{50}$ ,  $ClogP$  та комплекс із протеїнкіназою CK2 сполук N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід (**4.150**) (*a*) та метил-2-[(7-амінопіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.151**) (*б*). Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Піrido[2,3-d]піримідиновий гетероцикл сполуки **4.150** розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою формується NH-групою піrido[2,3-d]піримідинового гетероциклу та карбонільною групою амінокислотного залишку Val116. Замісник в 6 положенні направлений вглибину АТФ-зв'язувального сайту та формує гідрофобні взаємодії з Phe113.

Сполука **4.151** має дещо інший тип зв'язування. Піrido[2,3-d]піримідиновий гетероцикл розташований в аденін-зв'язувальній ділянці, але має

дзеркальне та глибше розташування відносно сполуки **4.150**. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 формується між карбоксильною та NH групою амінокислотного залишку Val116, а також атомом нітрогену в 6 позиції і аміногрупи в 7 позиції піридо[2,3-d]піримідиновий гетероциклу. Замісник в 4 позиції гетероциклу сполуки **4.151** направлений вглиб АТФ-зв'язувального сайту. Замісник в 4 положенні формує гідрофобні взаємодії з амінокислотним залишком Phe113 та водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68.

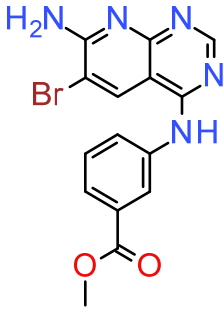
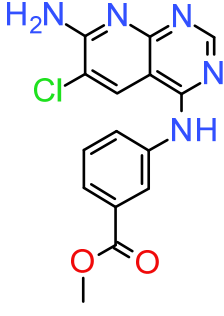
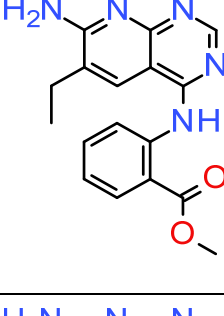
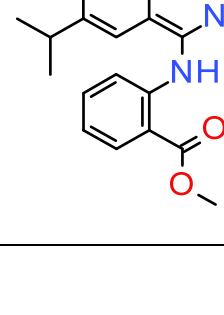
На основі цих даних можна висунути гіпотезу, що саме наявність водневого зв'язку з Lys68 пояснює, що сполука **4.151** має кращу активність щодо протеїнкінази СК2, ніж сполука **4.150**.  $IC_{50}$  цих сполук становлять 8 та 19,5 мкМ відповідно.

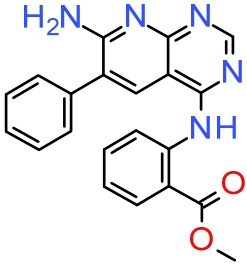
Детально проаналізувавши способи взаємодії цих сполук, було помічено, що сполука метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат має схожий спосіб зв'язування як похідні флавону та аурону, які, в свою чергу, інгібують протеїнкіназу СК2 в наномолярних концентраціях [66-67]. Зважаючи на це, можна припустити, що введення гідрофобних груп таких як метил, етил, феніл або галогенів (CL, BR) в позицію 5 піридо[2,3-d]піримідиновий гетероциклу та зміна положення COOMe групи на заміснику в 6 позиції може покращити активність похідних досліджуваного класу сполук.

Таким чином, було розроблено 16 сполук та проаналізовано спосіб взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом СК2. Структури та значення скорингової функції сполук, які показали найкращі результати, представлені в таблиці 4.8.

Таблиця 4.8.

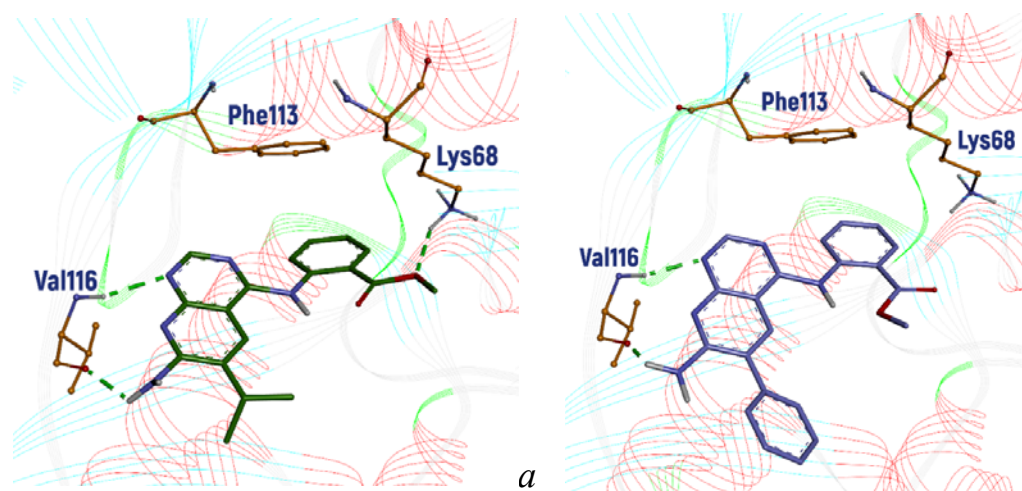
**Структури та значення скорингової функції сполук, що були спроектовані на основі первинного скринінгу похідних піридо[2,3-d]піримідину**

Сполука	Структура	Значення скорингової функції	CLogP
4.152		-9,86	2,9
4.153		-8,98	2,8
4.154		-9,35	3,1
4.155		-9,59	3,4

4.156		-10	3,4
-------	---	-----	-----

Згідно даних, представлених в таблиці 3, розроблені сполуки мали високі значення скорингової функції, що дає підстави стверджувати їхню високу афінність щодо протеїнкінази СК2. CLogP у них знаходиться в межах від 2,8 до 3,4. Таким чином загальна ліпофільність цих сполук не критично збільшилась, а введені гідروفобні замісники можуть позитивно вплинути на їхню інгібувальну здатність щодо СК2.

На рис. 4.21 показано способи взаємодії розроблених сполук.



**Рис. 4.21.** Комплекси розроблених сполук метил 2-[(7-аміно-6-ізопропіл-піридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.155**) (*a*) та метил 2-[(7-аміно-6-феніл-піридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.156**) (*б*), отримані молекулярним докінгом з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідروفобні взаємодії – фіолетовими

Як показано на рис., сполуки метил 2-[(7-аміно-6-ізопропіл-піридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.155**) та метил 2-[(7-аміно-6-феніл-піридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**4.156**) мають схожий механізм зв'язування з

вихідною сполукою метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат, що проявила інгібувальну активність щодо СК2 із  $IC_{50}$  8 мкМ.

Високі значення скорингової функції та схожий спосіб взаємодії з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 робить сполуки **4.152-4.156** перспективними інгібіторами даної кінази.

Таким чином піридо[2,3-d]піримідини є перспективним класом інгібіторів СК2 з хорошими фізико-хімічними властивостями.

### **Висновки:**

1. Ідентифіковано два інгібітори протеїнкінази СК2 людини серед похідних піридо[2,3-d]піримідину: N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід та метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат. Значення параметру  $IC_{50}$  цих сполук 19,5 мкМ та 6 мкМ відповідно.

2. Побудовано комплекси сполук N-(4-аніліло-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-d]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід та метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат з АТФ-зв'язувальною кишеною протеїнкінази СК2. Сполука метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоат проявляє кращу інгібувальну активність за рахунок утворення водневого зв'язку з Lys68.

3. На основі даних молекулярного докінгу було розроблено 5 потенційних інгібіторів за рахунок введення гідрофобних замісників, що є похідними сполуки метил-2-[(7-амінопіридо[2,3-d]піримідин-4-іл)аміно]бензоату.

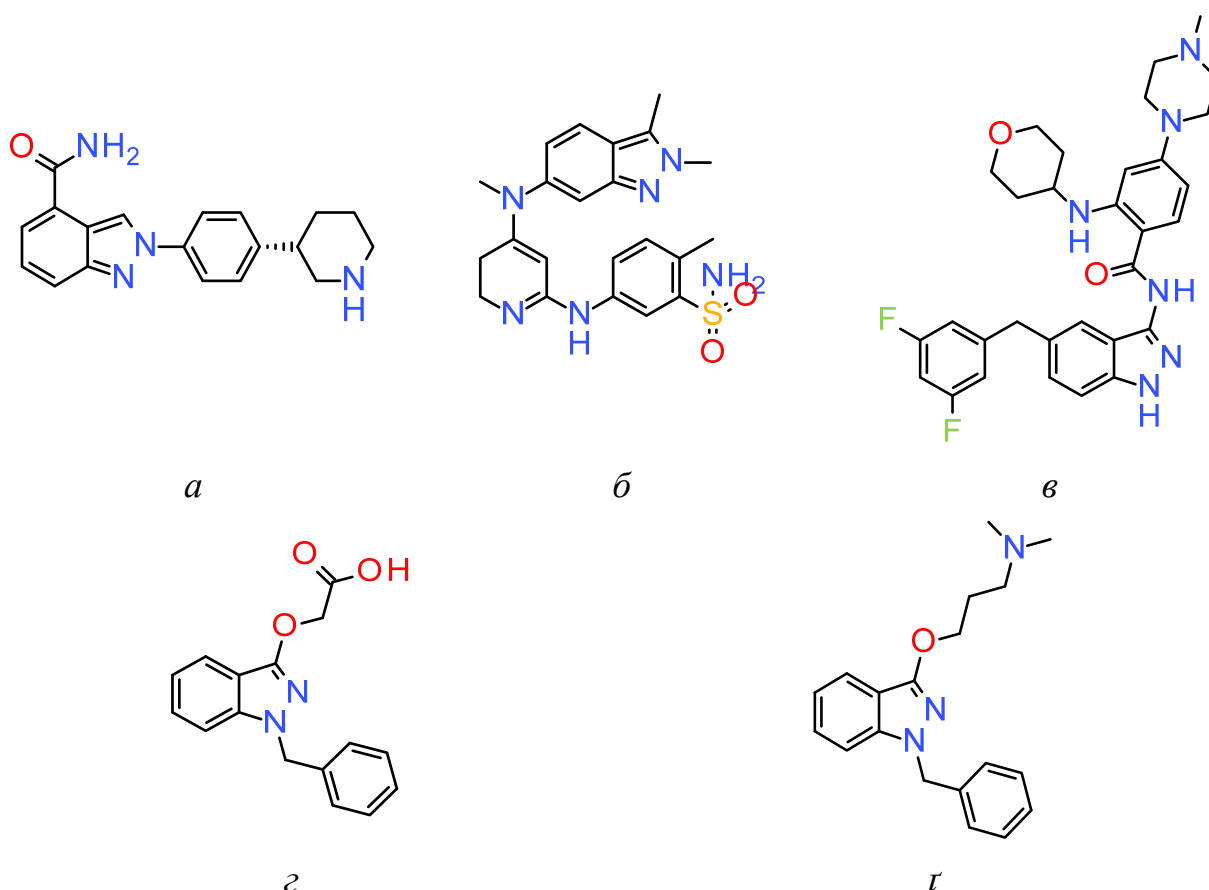
**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

Zinchenko AN, Muzychka L V., Smolii OB, Bdzhola VG, Protopopov MV, Yarmoluk SM. Synthesis and biological evaluation of novel amino-substituted derivatives of

pyrido[2,3-d]pyrimidine as inhibitors of protein kinase CK2. *Biopolym Cell*. 2017 Oct 31;33(5):367–78.



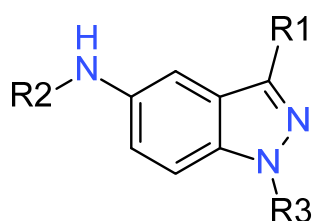




**Рис. 5.2.** Затверджені лікарські засоби серед похідних індазолу. *a* – нірапаріб, *б* – пазопаніб, *в* – ентректиніб, *г* – бендазак та *г* – бензидамін [166]

Таким чином, оскільки серед похідних індазолу є вже затверджені лікарські засоби серед інгібіторів протеїнкінази, було вирішено використати індазол як каркасну структуру для розробки інгібіторів протеїнкінази СК2.

При ретельнішому дослідженні цього класу сполук як інгібіторів протеїнкіназ Лукашовим було виділено 5-аміно-3-арил-1Н-індазол як найкращу каркасну структуру для розробки інгібіторів протеїнкінази СК2 (див. рис 5.3) [170].



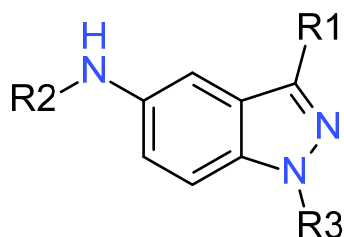
**Рис. 5.3.** Загальна структура 5-гетериламіно-1Н-індазолію

Співробітниками відділу було ідентифіковано інгібітори СК2 серед похідних 5-аміно-3-арил-1Н-індазолу (Сполуки **5.2-5.7**) [170]. Тому з метою пошуку більш ефективних інгібіторів протеїнкінази СК2 було додатково синтезовано та протестовано 31 похідне 5-гетериламіно-1Н-індазолію.

Результати біохімічного тестування представлені в таблиці 5.1. [189, 190]

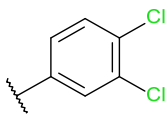
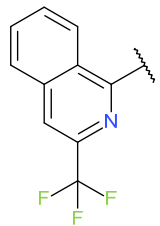
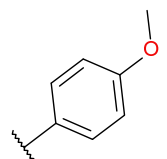
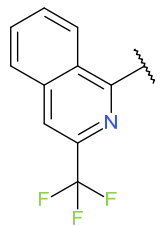
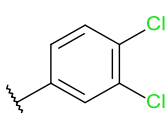
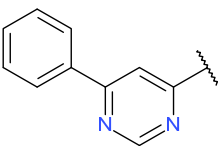
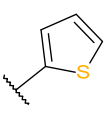
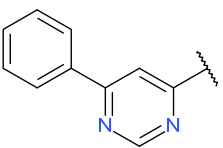
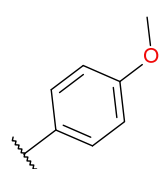
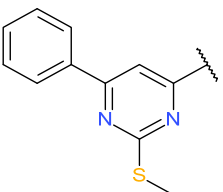
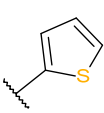
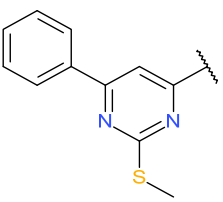
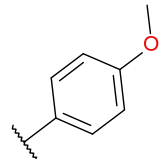
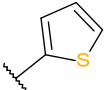
Таблиця 5.1.

Структура, *in vitro* інгібувальна активність відносно СК2 та значення параметрів CLogP та CLipE похідних 5-гетериламіно-1H-індазолію

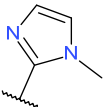
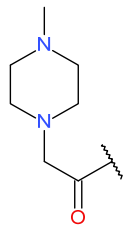
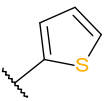
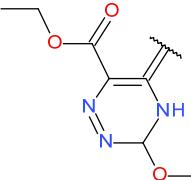
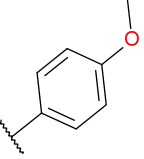

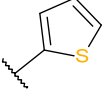

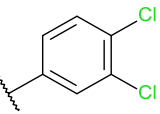
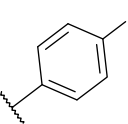
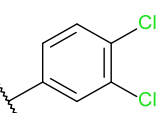
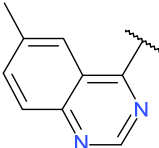
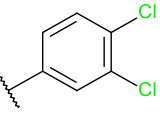
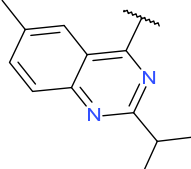


Сполука	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> , мкМ	CLogP	CLipE
5.1			CH <sub>3</sub>	>30	0,94	N/A
5.2			H	7	3,6	1,5
5.3			H	1,75	4,2	1,6
5.4			H	3	0	5,5
5.5			H	0,1	6	1

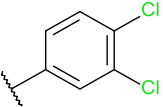
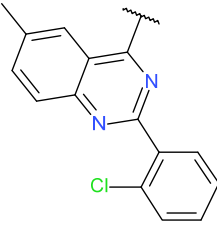
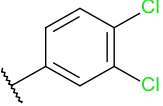
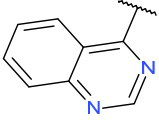
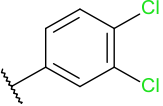
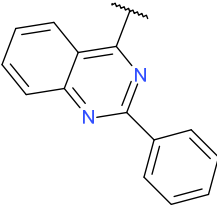
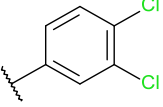
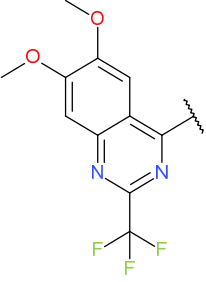
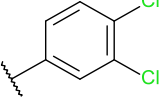
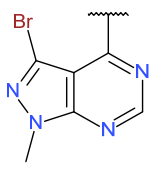
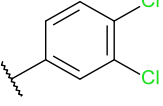
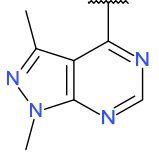
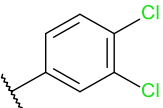
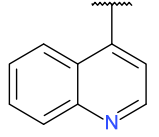
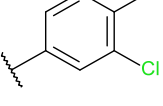
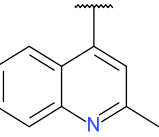
Продовж. табл. 5.1.

5.6			H	0,01	7,5	0,5
5.7			H	0,003	6,2	2,3
5.8			H	8	6,7	-1,6
5.9			H	2,5	5,6	0
5.10			H	2,2	6,7	-1,1
5.11			H	3,5	6,7	-1,3
5.12		H	H	>30	2,7	<1,8
5.13		H	H	1,25	2,6	3,3

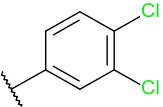
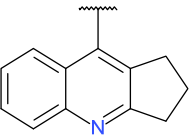
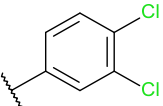
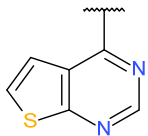
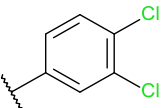
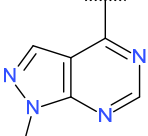
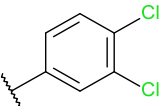
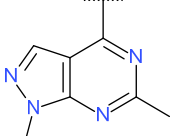
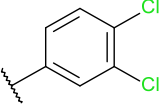
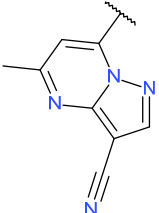
Продовж. табл. 5.1.

5.14			CH <sub>3</sub>	>30	1,2	<3,3
5.15			H	1	5	1
5.16			H	5	4,2	1,1
5.17			H	3	4,2	1,4
5.18		H	H	>30	4	<0,5
5.19		H	H	3	2,9	2,6
5.20			H	0,5	6,5	-0,2
5.21			H	0,015	7,6	0,2

Продовж. табл. 5.1.

5.22			H	0,18	8,9	-2,1
5.23			H	0,002	6	2,7
5.24			H	0,8	8,3	-2,1
5.25			H	0,5	7,1	-0,8
5.26			H	0,004	5,4	3
5.27			H	0,8	4,6	1,5
5.28			H	>30	6,1	<-1,6
5.29			H	>30	7,2	<-2,7

Продовж. табл. 5.1.

5.30			H	>30	7	<-2,5
5.31			H	3,5	5,9	-0,4
5.32			H	0,33	5,4	1,1
5.33			H	2,5	4,9	0,7
5.34			H	1	5,7	0,3

Як показало *in vitro* тестування знайдених та синтезованих похідних 5-гетериламіно-1H-індазоліу: сполуки **5.6**, **5.7**, **5.21**, **5.23** та **5.26** мали наномолярні значення  $IC_{50}$  0.01, 0.003, 0.015, 0.002 та 0.004 мкМ відповідно. Сім інших мали дещо вищі значення  $IC_{50}$ , але теж в субмікромолярному діапазоні. Зокрема, це сполуки **5.5**, **5.10**, **5.22**, **5.24**, **5.25**, **5.27**, **5.32**, значення  $IC_{50}$  0.1, 0.5, 0.18, 0.5, 0.8, 0.8, 0.33 мкМ відповідно.

Для більш глибокого вивчення механізму інгібування СК2 похідними 5-аміно-3-арил-1H-індазолу було вивчено залежність активності досліджуваних інгібіторів від будови замісників R1 та R2.

R1 сполук, що проявили активність, були представлені 4-флуорфенілом, 4-метоксифенілом, 3,4-дихлорофенілом, 1-метиімідазол-2ілом та 2-тієнілом. Сполуки з наномолярною активністю щодо СК2 в положенні R1 мали 3,4-дихлорофеніл та 4-метоксифеніл. Сполуки, що мали значення  $IC_{50}$  в

субмікромолярному діапазоні в положенні R1 мали замісники 3,4-дихлорофеніл та 2-тієніл.

Ефективність замісників в положенні R1 можна представити в нерівності: 3,4-дихлорофеніл > 4-метоксифеніл > 2-тієніл.

R2 сполук, що проявили активність, були більш різноманітними, але найбільш активні з них мали в положенні R2 наступні замісники: 3-(трифлуорометил)-1-ізохінолін], (2-ізопропіл-6-метил-хіназолін-4-іл), хіназолін-4-іл, (3-бромо-1-метил-піразоло[3,4-d]піримідин-4-іл, (6-метилхіназолін-4-іл), [2-(2-хлорофеніл)-6-метил-хіназолін-4-іл], (2-фенілхіназолін-4-іл), [6,7-діметокси-2-(тріфлуорометил)хіназолін-4-іл], (1,3-диметилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл) та (1-метилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл). Сполуки, що проявили інгібувальну здатність щодо СК2 в наномолярному діапазоні значень, мали наступні замісники в позиції R2: 3-(трифлуорометил)-1-ізохінолін], (2-ізопропіл-6-метил-хіназолін-4-іл), хіназолін-4-іл та (3-бромо-1-метил-піразоло[3,4-d]піримідин-4-іл. У тих, що мали значення  $IC_{50}$  в субмікромолярному діапазоні замісники в положенні R2 були наступні: 3-(трифлуорометил)-1-ізохінолін], (6-метилхіназолін-4-іл), [2-(2-хлорофеніл)-6-метил-хіназолін-4-іл], (2-фенілхіназолін-4-іл), [6,7-діметокси-2-(тріфлуорометил)хіназолін-4-іл], (1,3-диметилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл) та (1-метилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-іл).

На відміну від замісників в положенні R1, замісники R2 не проявляють чіткої залежності активності від структури.

$IC_{50}$  сполук **5.7**, **5.23** та **5.26** дорівнюють 0,003, 0,002 та 0,004 мкМ відповідно і є цілком конкурентними з відомими інгібіторами протеїнкінази СК2 FLC26, FNN79 та CX-4945, значення  $IC_{50}$  яких становить 0,009, 0,004, 0,001 мкМ відповідно. Проте фізико-хімічні властивості знайдених похідних 5-гетериламіно-1H-індазолу не відповідають умовам лікоподібності і правилам Ліпінського, особливо, що стосується ліпофільності (LogP) [187].

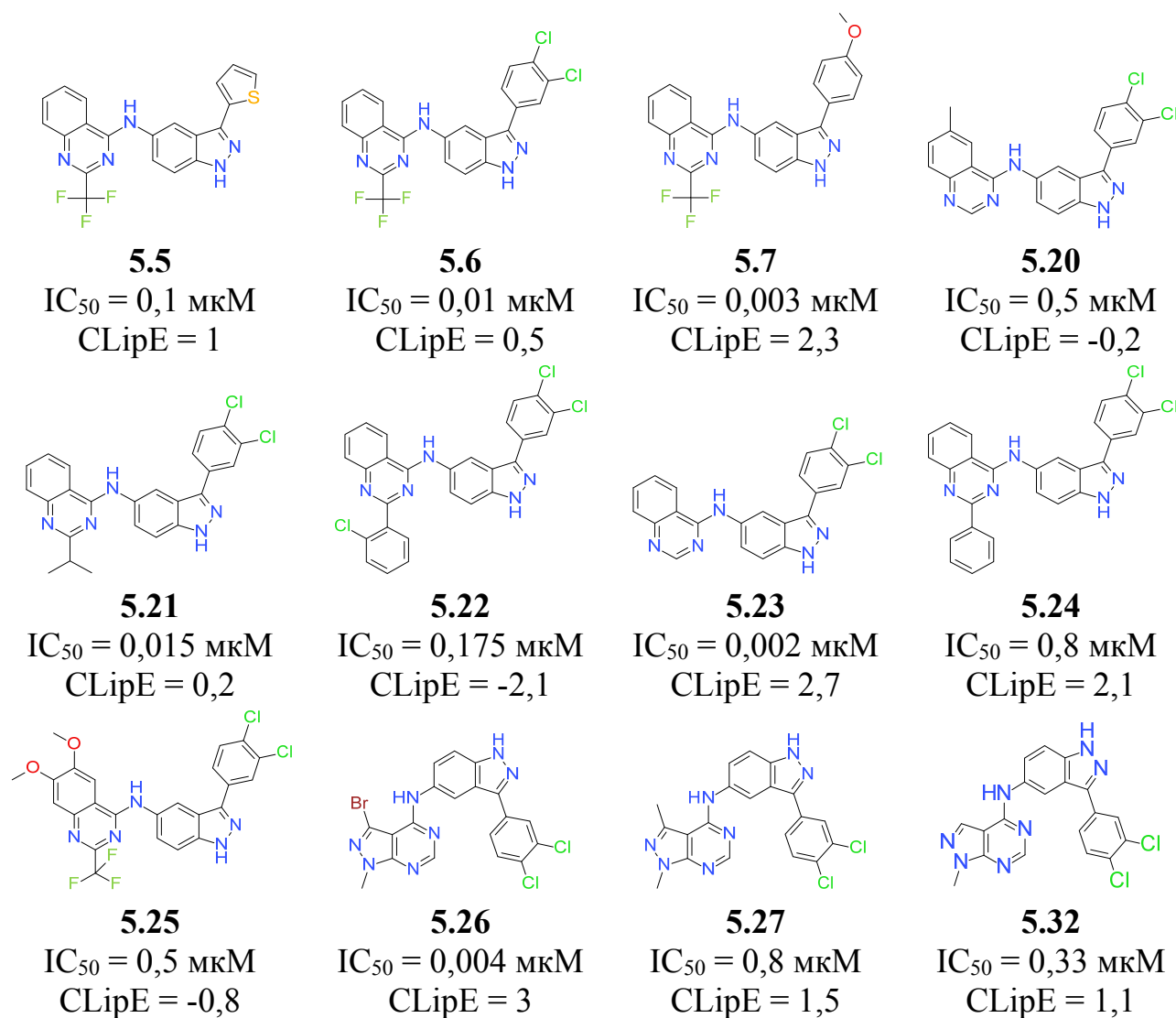
Для більш ретельного аналізу сполук було використано параметр, що об'єднує афінність сполук до молекулярної мішені ( $IC_{50}$ ) та показник ліпофільності сполуки LogP – LipE. Розраховується LipE за формулою 5.1 [171].



$$\text{LipE} = \text{pIC}_{50} - \text{LogP} \quad (5.1)$$

Як показує дослідження Шульца, показник LipE найбільш коректно показує ефективність сполук в порівнянні з іншими при проведенні скринінгових експериментів [172]. Також інші літературні дані свідчать, що значення LipE для інгібіторів протеїнкінази, що вже затвердженні як лікарські засоби, в середньому дорівнює 4,99 та знаходиться в межах від 2 (Вандетаніб) до 8,5 (Тофацитиніб) [173].

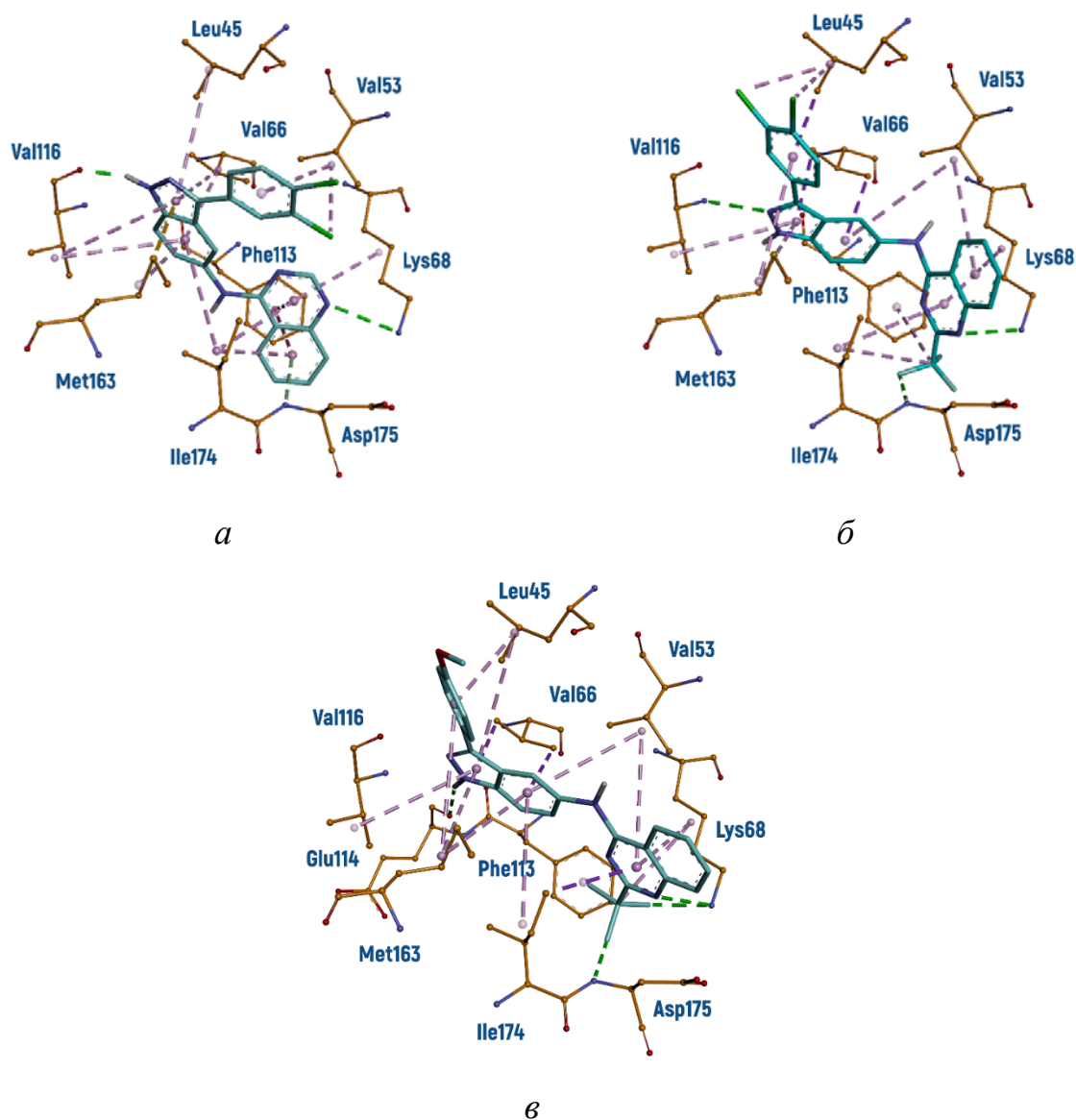
Структури найбільш активних похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу, значення їхнього  $\text{IC}_{50}$  та CLipE (розрахункове значення показника LipE) представлені в рис. 5.4.



**Рис. 5.4.** Структури,  $\text{IC}_{50}$  та значення CLipE найбільш активних похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу

Проаналізувавши дані з рисунку 4, можна виділити сполуки **5.23** та **5.26** як такі, що мають найвищі значення  $CLipE$  – 2,7 та 3 відповідно. В порівнянні з вищезгаданими інгібіторами СК2 FLC26, FNH79 та CX-4945, значення  $CLipE$  яких становить 3,85, 4,48 та 4,84 відповідно, похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу виглядають вже не такими перспективними. Тому вони потребують подальшої оптимізації.

Раціональна розробка нових лікарських засобів практично неможлива без розуміння взаємодії активної сполуки з білком-мішенню. Саме для цього був проведений молекулярний докінг в АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкінази СК2.



**Рис. 5.5.** Комплекси сполук **5.23** (а), **5.6** (б) **5.7** (в), отримані молекулярним докінгом з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Досліджено спосіб зв'язування похідних 5-аміно-3-арил-1Н-індазолу з АТФ-акцепторним сайтом СК2. Типовий механізм зв'язування зображений на рисунку 5. Гетероцикл індазолу сполуки **5.23** розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці. Водневий зв'язок з шарнірною ділянкою формується за участі карбоксильної групи амінокислотного залишку Val116 та водня в першому положенні. Окрім того, даний гетероцикл бере участь у гідрофобній взаємодії ліганду з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 таких як 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 низки гідрофобних взаємодій, що додатково стабілізують ліганд в АТФ-зв'язувальній кишені. Замісник в положенні R1 сполуки **23** (3,4-дихлорофеніл) орієнтований в бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені СК2. Він бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val53 (рис. 5, *a*). Замісник в положенні R2 сполуки **5.23** (хіназолін-4-іл) на рис. 5, *a* розташовується в гідрофобній ділянці 1. Замісники в положенні R2 беруть участь у формуванні водневого зв'язку з амінокислотним залишком Lys68. Додатково R2 формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Phe113 (варто зауважити, що R2 замісник хіназолін-4-іл формує  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з фенолом амінокислоти Phe113), Lys68, Asp175 та Ile174.

Гетероцикл індазолу сполуки **5.6** також розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2. Індазольний гетероцикл сполуки **6** бере участь у формуванні водневого зв'язку з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2 (з амінокислотним залишком Val116) та у формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val66, Ile95, Val116, Met163 та Ile174 АТФ-зв'язувальної кишені. Водневий зв'язок з шарнірною ділянкою є характерною рисою інгібіторів I типу протеїнкіназ і є надважливим для активності, а низка гідрофобних взаємодій сприяє закорінню сполуки-інгібітора в кишені. Замісник в положенні R1 сполуки **6** (3,4-дихлорофеніл) орієнтований в бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені СК2. Він бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Leu45 та Met163 (рис. 5, *b*). Замісник в положенні R2 сполуки **6** [3-(тріфлуорметил)-1-ізохіноліл] (*b*) на рис. 5) розташовується в гідрофобній ділянці 1. Замісники в положенні R2 формують водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68. Додатково R2 бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Phe113, Lys68, Asp175 та Ile174.

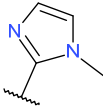
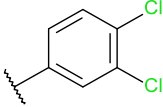
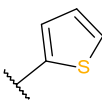
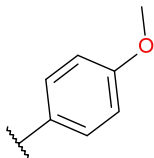
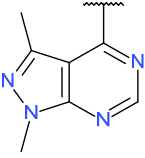
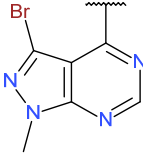
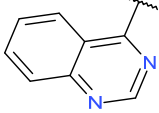
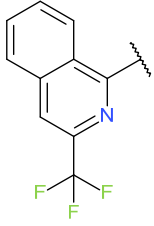
Незважаючи на незначні відмінності в будові замісника в положенні R1, сполука **7** має подібне розташування як і сполука **5.6**. Гетероцикл індазолу сполуки **5.7** також розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-зв'язувальної

кишені протейнінази СК2, але, на відміну від сполук 23 та 6, утворює водневий зв'язок з амінокислотним залишком Glu114, що також належить до групи амінокислотних залишків шарнірної ділянки. Окрім водневого зв'язку, індазольний гетероцикл утворює ряд гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val66, Ile95, Val116, Met163 та Ile174. Замісник в положенні R1 сполуки 7 (4-метоксифеніл) орієнтований в бік виходу з АТФ-зв'язувальної кишені СК2. Він бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Leu45 та Met163 (рис. 5, в). Замісник в положенні R2 сполуки 7 [3-(тріфлуорметил)-1-ізохіноліл] (в) на рис. 5) розташовується в гідрофобній ділянці 1. Замісники в положенні R2 формують водневий зв'язок з амінокислотним залишком Lys68. Додатково R2 бере участь в формуванні гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Phe113, Lys68, Asp175 та Ile174.

Таким чином досліджувані похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу мають характерний до першого типу інгібіторів спосіб зв'язування. Чисельні гідрофобні взаємодії цілком логічно відповідають високій гідрофобності сполук, що безумовно впливає на інгібувальні властивості лігандів.

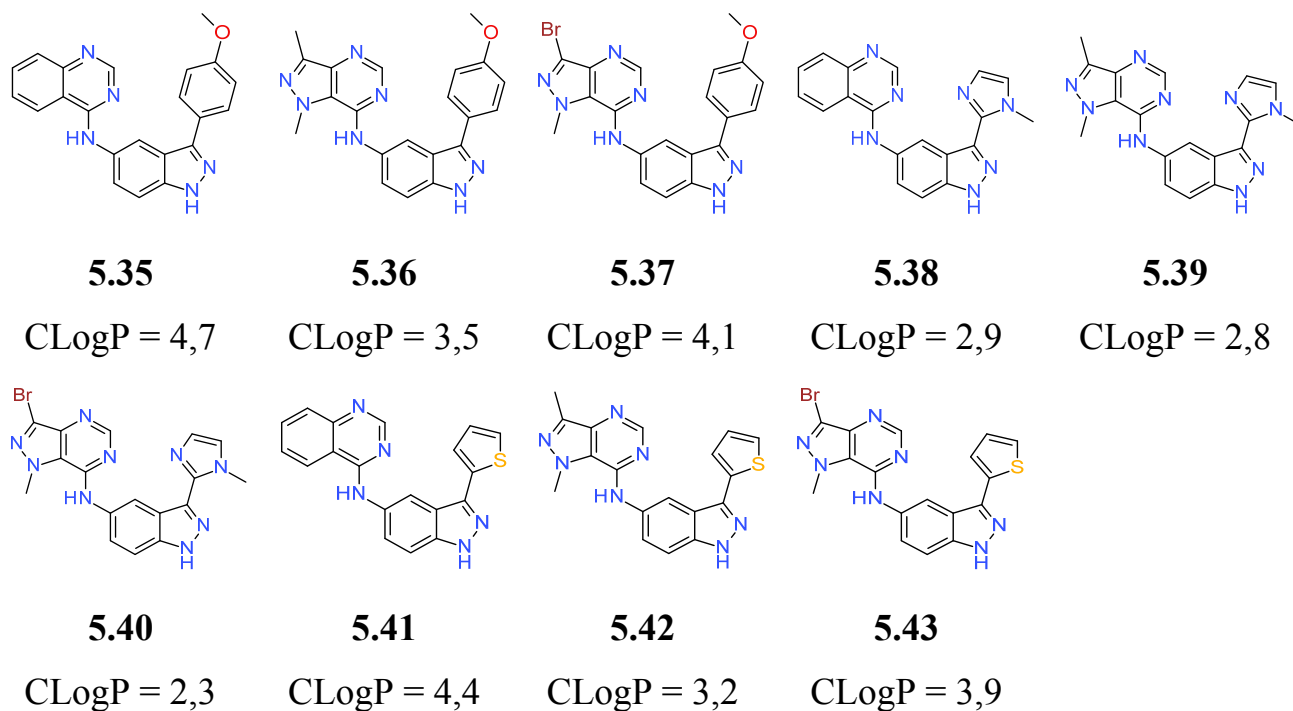
Для визначення вектору оптимізації даного класу сполук та розуміння впливу замісників на загальну гідрофобність сполук LogP замісників R1 та R2 були прораховані та представлені в таблиці 5.2.

## Структури та значення CLogP замісників R1 та R2

R1	 CLogP = 0.2	 CLogP = 3	 CLogP = 1.3	 CLogP = 1.7
R2	 CLogP = 0.8	 CLogP = 1.5	 CLogP = 1.8	 CLogP = 3.3

Серед R1 найвище значення CLogP було у 3,4-дихлорофенілу. Серед R2 – 3-(тріфлуорметил)-1-ізохіноліл. Ці замісники не братимуть участі в подальшому моделюванні інгібіторів СК2 серед 5-аміно-3-арил-1H-індазолів.

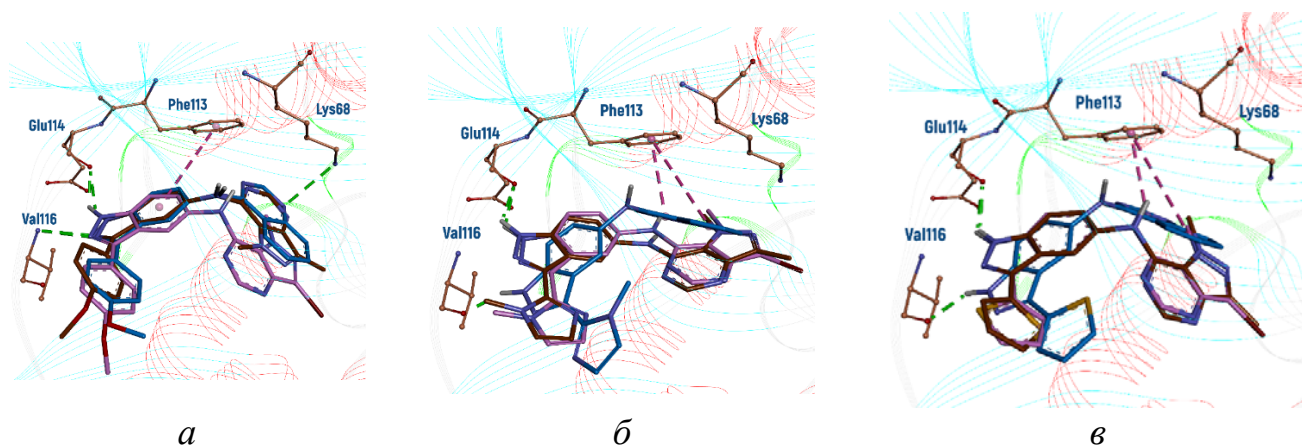
Базуючись на аналізі залежності активності від структури досліджуваних похідних, даних молекулярного докінгу та аналізу гідрофобності сполук, було запропоновано 9 нових структур похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу, що мають потенціал до інгібування протеїнкінази СК2 (див. рис. 5.6).



**Рис. 5.6.** Структури та значення CLogP нових похідних 5-аміно-3-арил-1H-індазолу

Для оцінки інгібувального потенціалу розроблених сполук (**9.35-9.43**) було проведено їхній молекулярний докінг в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2. Оскільки в ході дослідження було порівняно похідні -аміно-3-арил-1H-індазолу з відомими інгібіторами СК2 FLC26, докінг проведено в просторову структуру протеїнкінази саме з цим інгібітором: PDBID: 4UBA [68].

Згідно з даними докінгу, механізм зв'язування запропонованих сполук з протеїнкіназою СК2 такий самий як і в **5.1-5.34**. Індазольний гетероцикл розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці, замісник R1 орієнтований в бік виходу з АТФ-акцепторного сайту СК2, замісник R2 – розташований в гідрофобній ділянці 1, див. рис. 5.7.



**Рис. 5.7.** Комплекси сполук **5.35-5.37** (*a*), **5.38-5.40** (*б*) та **5.41-5.43** (*в*) з протеїнкіназою CK2, (PDBID: 4UBA)

Рескоринг сполук проведено програмним забезпеченням «Drug Score» [96, 97] – скорингової функції, що базується на даних (knowledge-based scoring function). Результати молекулярного докінгу представлені в таблиці 5.3.

Сполуки **5.35-5.43** мають значення скорингової функції в тому ж діапазоні, що й відомий інгібітор протеїнкінази CK2 FLC26 та похідні 5-аміно-3-арил-1H-індазолу з вже визначеними значеннями  $IC_{50}$  (**5.6**, **5.23**, **5.26**). Щоб зрівелювати вплив молекулярної ваги на значення скорингової функції було розраховано відношення значення «Drug Score» до молекулярної ваги. Таким чином найкращий показник «Drug Score» до молекулярної ваги був у FLC26 – 0,22. Відповідно до цього, можемо вважати, що сполуки, відношення «Drug Score» до молекулярної ваги яких більше або дорівнює 0,22, мають високий інгібувальний потенціал. Такому параметру відповідає шість з дев'яти запропонованих сполук **5.35**, **5.36**, **5.37**, **5.39**, **5.40**, **5.42** [189, 190].



Таблиця 5.3

**Значення скорингової функції та молекулярної ваги досліджуваних сполук**

<b>Сполука</b>	<b>CLogP</b>	<b>MW</b>	<b>Значення DrugScore</b>	<b>Кількість важких атомів</b>	<b>DrugScore / Кількість важких атомів</b>	<b>DrugScore / MWt</b>
FLC26	3.9 (CLipE = 3.85)	440	-96 (IC <sub>50</sub> = 0.009 мкМ) (CLipE = 3.85)	23	-4.2	-0.22
BFO13	3.5 CLipE = 4.94	362	-86.2 (IC <sub>50</sub> = 0.0036 мкМ)	22	-3.9	-0.24
<b>5.6</b>	7,44 CLipE = 0,6	571	-115.1 (IC <sub>50</sub> = 0.01 мкМ)	32	-3.6	-0.2
<b>5.7</b>	6,1 CLipE = 2,4	435	-93.7 (IC <sub>50</sub> = 0.003 мкМ)	32	-2.9	-0.22
<b>5.23</b>	6,4 CLipE = 2,3	495	-98.5 (IC <sub>50</sub> = 0.002 мкМ)	28	-3.5	-0.2
<b>5.26</b>	6,1 CLipE = 2,3	578	-92.2 (IC <sub>50</sub> = 0.004 мкМ)	29	-3.17	-0.16
<b>5.35</b>	4,7	456	-105.6	28	-3.8	-0.23
<b>5.36</b>	3,5	385	-105.3	29	-3.6	-0.27

Продовж. табл. 5.3.

<b>5.37</b>	4,1	539	-116.6	29	-4	-0.22
<b>5.38</b>	2,9	424	-86.8	26	-3.3	-0.2
<b>5.39</b>	2,8	359	-106.9	27	-4	-0.3
<b>5.40</b>	2,3	424	-99.4	27	-3.7	-0.23
<b>5.41</b>	4,4	424	-79.4	25	-3.2	-0.19
<b>5.42</b>	3,2	442	-103.1	26	-4	-0.23
<b>5.43</b>	3,9	507	-96.3	26	-3.7	-0.19

**Висновки:**

1. Знайдено нові інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних 5-аміно-3-арил-1Н-індазолу. Найкращі сполуки **5.23**, **5.7** та **5.26** мають  $IC_{50}$  0,002, 0,003 та 0,004 мкМ відповідно.

2. Встановлено залежність інгібувальної активності від структури замісників похідних 5-аміно-3-арил-1Н-індазолу. Показано, що гетероцикл індазолу розташовується в аденін-зв'язувальній ділянці АТФ-акцепторного сайту СК2 та формує водневий зв'язок з шарнірною ділянкою. R1 – орієнтований в бік виходу з АТФ-акцепторного сайту і формує гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками СК2. R2 – занурений вглиб АТФ-зв'язувальної кишені СК2, утворює водневий зв'язок з Lys68 та/або Asp175 та формує гідрофобні взаємодії, найважливішою з яких є взаємодія з Phe113.

3. Здійснено оптимізацію похідних 5-аміно-3-арил-1Н-індазолу з урахуванням залежності активності від структури та фізико-хімічних параметрів сполук. Таким чином запропоновано структури 9 сполук, що є потенційними інгібіторами протеїнкінази СК2.

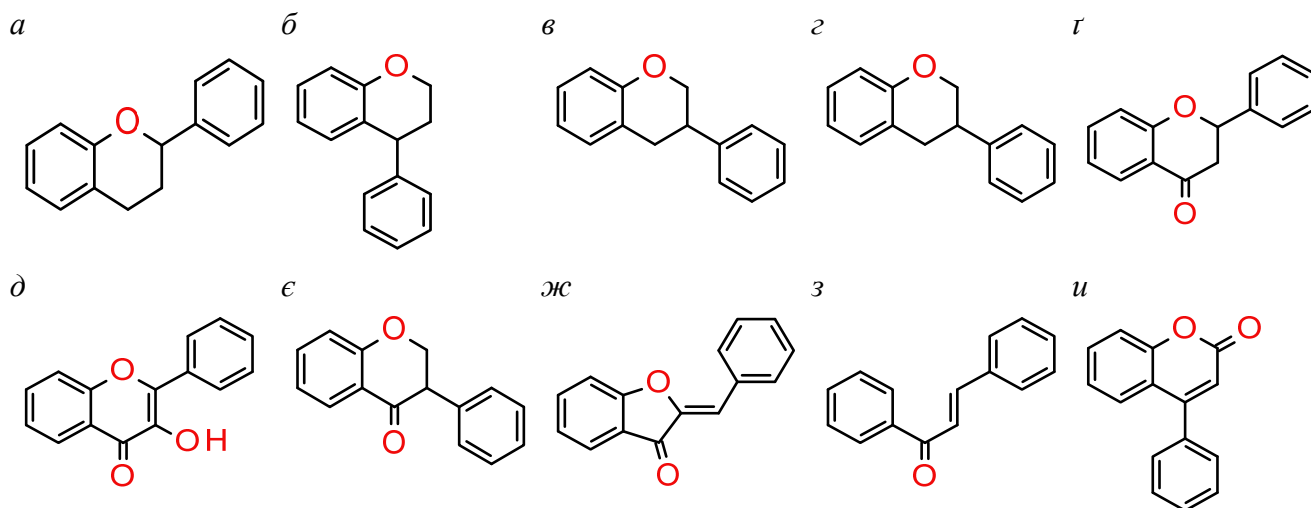
**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Protopopov MV, Lukashov S.S., Ostrynska O.V., Starosyla S.A., Vdovin V.S., Kukharenko O.P., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. The synthesis and evaluation of 5-amino-3-phenylindazole as inhibitors of protein kinase CK2. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль.
2. 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.

## РОЗДІЛ 6

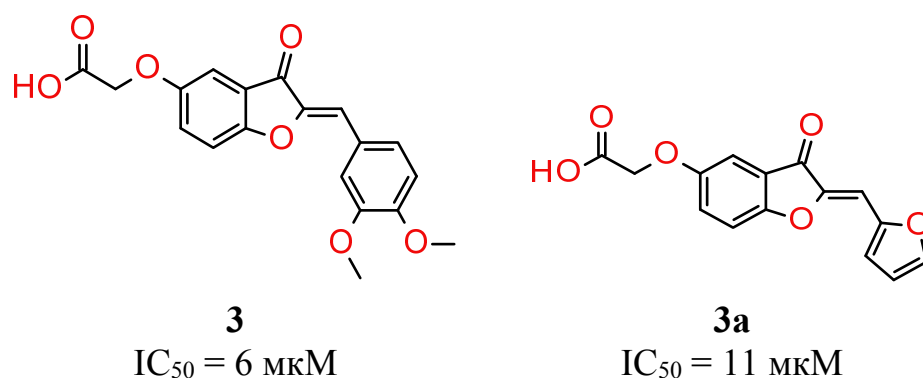
### РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ АУРОНУ

З давніх часів людство відкрило лікувальні властивості деяких рослин. Багато патологій лікували препаратами рослинного походження. Таке лікування проводилось за допомогою відварів та концентратів рослинних екстрактів без виділення діючої речовини. [174] Такий історичний досвід дав поштовх до вивчення біологічних ефектів так званих натуральних продуктів – хімічних сполук, що синтезуються в живих організмах [175, 176]. Одними з найбільш досліджуваних серед натуральних продуктів є група флавоноїдів. Дослідження їхньої біологічної активності сягають початку 19-го століття та тривають до сьогоднішнього дня [177]. Флавоноїди широко розповсюджені в рослинах та складаються з низки підкласів сполук: флавани, неофлавани, ізофлавани, флавони, флаванони, флавоноли, ізофлавонони, аурони, халкони та 4-арил-кумарини (див. рис. 6.1.) [178]. Структурне різноманіття цих природних сполук спричинює широкий спектр біологічної активності, зокрема як антиоксидантна, протиракова, протимікробна активність та ін.



**Рис. 6.1.** Загальні структури підкласів флавоноїдів. *a* – флавани, *б* – неофлавани, *в* – ізофлавани, *г* – флавони, *r* – флаванони, *д* – флавоноли, *е* – ізофлавонони, *ж* – аурони, *з* – халкони та *и* – 4-арил-кумарини [178]

Було вирішено дослідити підклас флавоноїдів бензиліденбензофуран-3-они або аурони, як інгібітори протеїнкінази СК2. Наканіші та колеги, досліджуючи нові методики віртуального скринінгу, знайшли похідні аурони з помірною (6 та 11 мкМ) активністю щодо СК2 (див. рис. 6.2) [179]. Також варто зауважити, що аурони є структурним ізомером флавонів [180], і, враховуючи результати дослідження їхньої активності щодо протеїнкінази СК2, було здійснено спрямований пошук інгібіторів даної кінази серед класу бензиліденбензофуран-3-они.



**Рис. 6.2.**

Структури та  $IC_{50}$  похідних ауруну з відомою активністю щодо СК2 [179]

### 6.1 Порівняльний аналіз геометрії флавонів та ауронів

Голуб та колеги проаналізували залежність активності від структури синтетичних похідних 4'-гідроксифлавонів [66] та 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонів

[67]. На основі цих даних було запропоновано модель взаємодії досліджуваних інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2. В 2015 році дана модель була підтверджена методом кристалографічного аналізу [68]. Таким чином, можна виділити структурні особливості флавонів, які обумовлюють їхню високу активність щодо СК2. По-перше, це формування водневого зв'язку з шарнірною ділянкою протеїнкінази. Він формується між карбонільною групою в 4 положенні флавону та амінокислотою Val116. По-друге, між замісником в положенні 4' (ОН or COOH) та амінокислотою Lys68. І, по-третє, стекінг-взаємодія кільця В з амінокислотним залишком Phe113 [181].

Важливо відмітити, що похідні аурону можуть мати дві ізомерні форми Е та Z. Оскільки саме Z-форма є найбільш стабільною, а методики синтезу досліджуваних сполук і літературні дані щодо відомих ауронів підтверджують тотальну перевагу утворення саме цієї форми, в цій роботі розглядатиметься лише структура Z-форми аурону.

Для порівняння похідних аурону та флавону необхідно розглянути їхню загальну структуру. На рис. 6.3 зображено 4'-гідрокси флавон (А) та 4'-гідрокси аурон (Б). Аурон та флавон складаються з ароматичної системи А-С (в першому положенні якої міститься атом кисню) та ароматичного кільця В. Відмінністю ароматичної системи А-С флавону від аналогічної в А-С аурону є те, що у флавона вона налічує 8 атомів, а у аурону – 7. Флавон містить карбонільну групу в положенні 4, у аурона така ж карбонільна група розташовується в положенні 3. Беручи до уваги описані вище три ключові взаємодії, було виділено три параметри, що охарактеризують структурні особливості флавону та аурону:

А) відстані між центрами кілець А та С та між центрами кілець А та В. Порівняння цих відстаней дасть змогу передбачити формування схожих гідروفобних взаємодій з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної ділянки СК2.

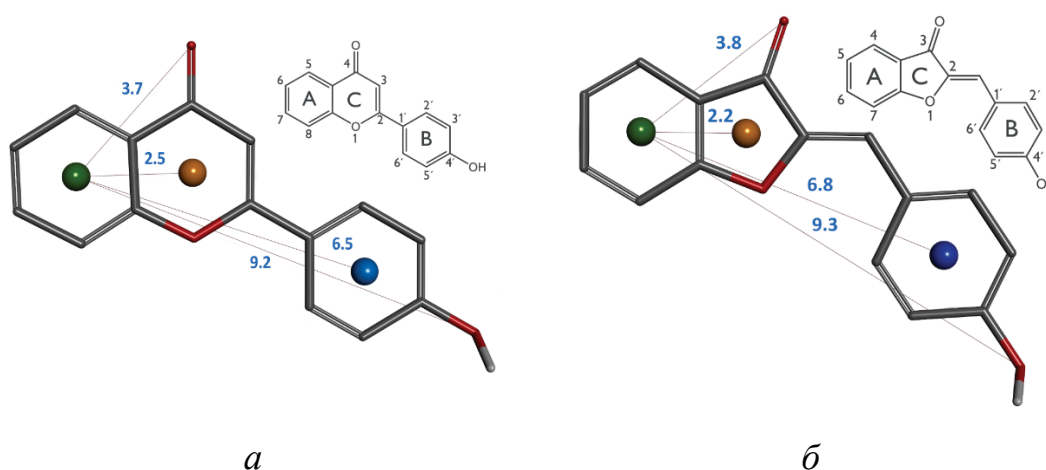
Б) відстань між центром кільця А та акцептором водневого зв'язку в 3 позиції кільця С аурону та 4 позиції кільця С флавону.

В) Відстань між центром кільця А та акцептором водневого зв'язку в положенні 4'.

Таблиця 6.1.

### Порівняння геометричних характеристик флавону та аурону

Відстань	Флавіон	Аурон	$\Delta$	Відстань	Флавіон	Аурон	$\Delta$
A-C	2.5 Å	2.2 Å	0.3 Å	A-карбонільна група (на кільці С)	3.7 Å	3.8 Å	0.1 Å
A-B	6.5 Å	6.8 Å	0.3 Å	A-карбоксильна група (4'-позиція кільця В)	9.2 Å	9.3 Å	0.1 Å



**Рис. 6.3.** Порівняння загальної структури 4'-гідрокси флавону (а) та 4'-гідрокси аурону (б). Центр кільця А позначено зеленою сферою, центр кільця В – синьою сферою, центр кільця С – помаранчевою

Важливо відмітити, що похідні ауронів можуть мати дві ізомерні форми Е та Z. Оскільки саме Z-форма є найбільш стабільною, а методики синтезу досліджуваних сполук і літературні дані щодо відомих ауронів [182, 183] підтверджують тотальну перевагу існування саме цієї форми, в даній роботі розглядатиметься лише структура Z-форми аурону.

Аналіз геометрії цих двох класів сполук проводився в програмному забезпеченні BIOVIA Discovery Studio Visualizer [95] компанії BIOVIA та показав,

що різниця відстаней між центрами кілець не перевищує 0,3 Å, що не є критичним для формування гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками Val66, Phe113 та Ile174 АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2. Відстані між центром кільця А та акцепторами водневого зв'язку на кільці С та акцептором водневого зв'язку в положенні 4' на кільці В не перевищують 0,1 Å, що не є критичним для формування водневих зв'язків з амінокислотними залишками шарнірної ділянки Val116 та консервативним Lys68.

Враховуючи подібність геометрії флавону і аурону та раніше отримані дані залежності активності від структури похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонів та 4'-гідроксифлавонів, для розробки інгібіторів протеїнкінази СК2 серед ауронів було синтезовано ряд похідних з замісниками ОН, СООН, ОСН<sub>3</sub> та NO<sub>2</sub> в положенні 4'.

Щодо гідрофобних замісників на кільці А потрібно відзначити важливість наявності гідрофобних замісників в положеннях 6- та 8- кільця А у флавону, що відповідатиме 5- та 7-му положенню кільця А аурону. Таким чином було синтезовано 5,7-дихлоро- (6.16-6.31) та 4,7-дихлоро (6.32-6.51) заміщені похідні аурону. Також щоб більш ретельно дослідити залежність активності від структури було синтезовано 5-хлоро-4,6-диметил заміщені похідні аурону (6.1-6.15).

Отже для експерименту в лабораторії відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ було синтезовано 51 похідне аурону для подальшого біохімічного тестування.

## **6.2. *In vitro* тестування похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону відносно протеїнкінази СК2**

Інгібувальну здатність синтезованих сполук перевіряли при концентрації в реакційній суміші 10, 3, 1, 0,3, 0,1 та 0,03 μМ. Значення IC<sub>50</sub>, CLogP та CLipE досліджуваних всіх сполук зазначені в додатку Б. Значення найбільш активних сполук – в таблиці 6.2 [181].



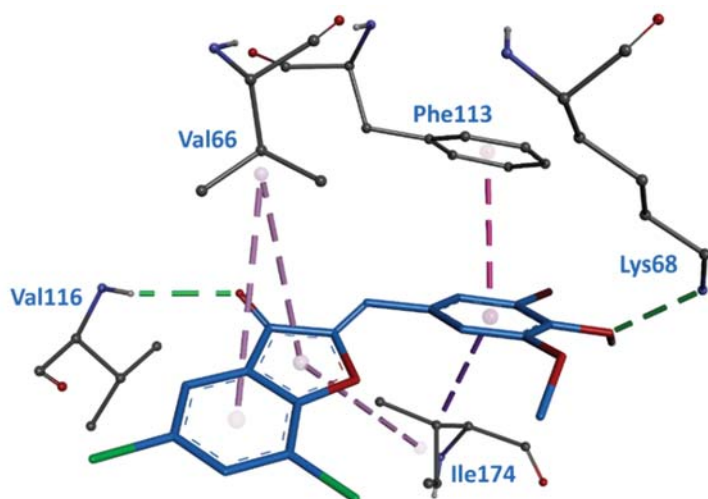
Таблиця 6.2.

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

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

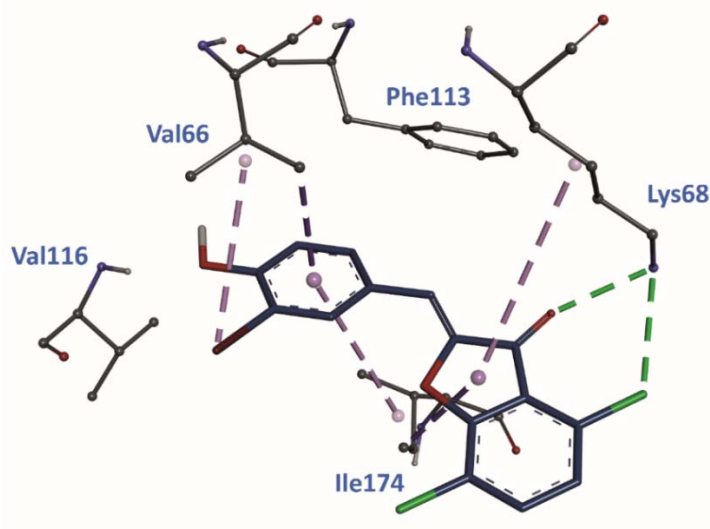
Як видно з таблиці 6.2, похідні аурону проявили високу інгібувальну здатність щодо протеїнкінази СК2, тому для інтерпретації даних біохімічного тестування та з'ясування способу зв'язування був проведений молекулярний докінг та проаналізовано низку комплексів похідних аурону із АТФ-акцепторним сайтом СК2. Докінг проводився в просторову структуру протеїнкінази СК2 людини з ідентифікатором Protein Data Bank. Результати пошуку PDB ID: 3NSZ.

Згідно з даними комп'ютерного моделювання, для 35 сполук був виявлений спосіб зв'язування, подібний до того, що був встановлений для флавонів рентгено-структурним аналізом [68]. Відповідно до цього типу взаємодії кільця А і С знаходяться в аденін-зв'язувальній ділянці, кетогрупа в 3-ому положенні кільця С формує водневий зв'язок із амінокислотним залишком Val116, що локалізований у шарнірній ділянці. Кільце В направлене вглиб АТФ-акцепторного сайту та формує π-π взаємодію з Phe113. На рис. 6.4 представлений спосіб зв'язування найактивнішої сполуки **6.29**.



**Рис. 6.4.** Комплекс сполуки **6.29** з АТФ-акцепторним сайтом СК2, отриманий за допомогою молекулярного докінгу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії позначені фіолетовими

Спосіб зв'язування інших 17 сполук відрізняється тим, що кільце В направлене на вихід із АТФ-акцепторного сайту. А система кілець АС направлена вглиб сайту, займаючи гідрофобну ділянку I. У цій групі представлені похідні 4,7-дихлоро-2,3-дигідро-1-бензофуран-3-ону (**6.32-6.51**). Можливо це пояснюється тим, що атом Хлору в положенні R<sup>4</sup> може утворювати стеричні перешкоди для формування водневого зв'язку із шарнірною ділянкою. На рис. 6.5 представлений типовий спосіб зв'язування для похідних 4,7-дихлоро-2,3-дигідро-1-бензофуран-3-ону. Однак варто зазначити, що подальший аналіз залежності активності від структури, спростовує дані результати молекулярного докінгу щодо способу зв'язування зазначеного на рис. 6.5.



**Рис. 6.5.** Комплекс сполуки **6.43** з АТФ-акцепторним сайтом СК2, отриманий за допомогою молекулярного докінгу. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, гідрофобні взаємодії позначені фіолетовими

Базуючись на даних біохімічного тестування, ефективність гідрофобних замісників на кільці А можна розташувати в наступному порядку: 5-хлоро-4,6-

диметил- (6.1-6.15)  $\ll$  4,7-дихлоро- (6.32-6.51)  $\leq$  5,7-дихлорозаміщені похідні аурону (6.16-6.31).

Як було зазначено вище, для флавонів найбільш важливу роль в інгібуванні відігравав замісник в положенні 4' на кільці В. Даний результат був зафіксований і для аурунів. Замісник, що є акцептором водневого зв'язку, в цій позиції бере участь в формуванні водневого зв'язку з консервативним Lys68. Згідно таблиці 2, переважна більшість найбільш активних сполук містять гідроксильну групу в положенні 4' (6.16, 6.19, 5.20, 6.21, 6.22, 6.26, 6.27, 6.29, 6.31, 6.32, 6.35, 6.37, 6.38, 6.42, 6.43, 6.44, 6.45, 6.47, 6.48, 6.4). Зважаючи на ці дані, замісники в положенні 4' за ефективністю можна розмістити в наступній послідовності:  $\text{OH} > \text{NO}_2 > \text{COOH} \geq \text{OCH}_3$ .

Варто відмітити, що сполуки з акцептором водневого зв'язку в положенні 3' (7b та 8b) проявляють значно меншу інгібувальну активність щодо протеїнкінази СК2, ніж сполуки з акцептором водневого зв'язку в 4' (6.18 та 6.34). Однак наявність акцептора водневого зв'язку в положенні 3' і одночасно в положенні 4' призводить до значного підвищення інгібувального ефекту сполуки щодо протеїнкінази СК2. Проаналізувавши інші додаткові замісники в положенні 3', можна побудувати ряд їхньої ефективності:  $\text{Cl} \geq \text{Br} \geq \text{NO}_2 > \text{OCH}_3 > \text{COOH} > \text{H}$ .

Додавання замісників в положення 2' не несе за собою виразного впливу на прояв інгібувальної активності щодо СК2 досліджуваними сполуками.

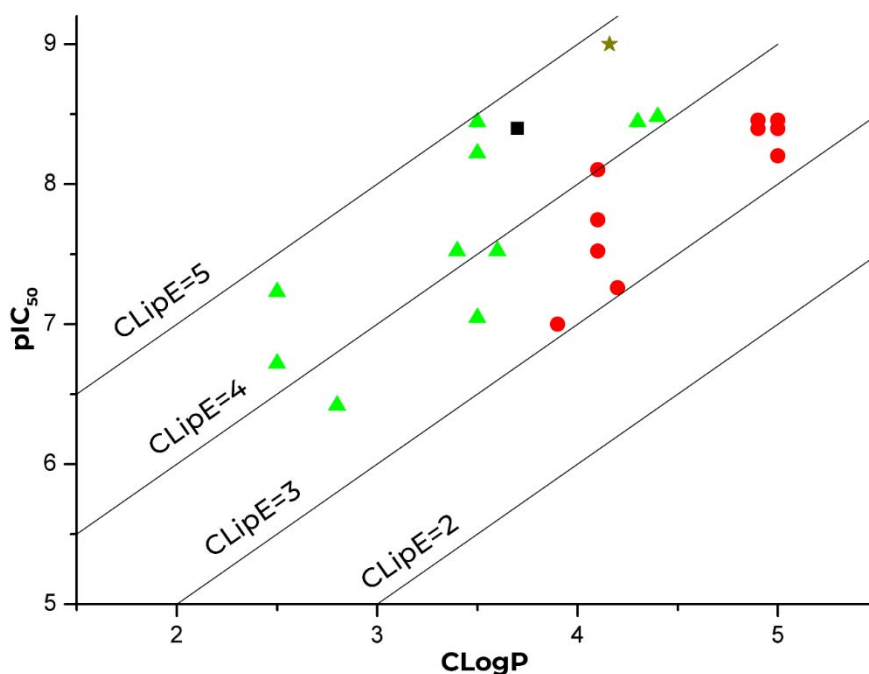
### **6.3. Оптимізація похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону з урахуванням афінності та фізико-хімічних параметрів**

Відповідно був підтверджений високий потенціал похідних аурону як інгібіторів протеїнкінази СК2. Також була підтверджена гіпотеза, що у зв'язку з структурною подібністю аурунів та флавонів, ці сполуки мають схожу залежність активності від структури.

Однак, варто зазначити, що найбільш активні сполуки 6.19, 6.26, 6.27, 6.29, 6.35 та 6.34 мають відносно високі значення параметру CLogP (4,9-5,0). Щоб

досконало оцінити ефективність знайдених сполук, було вирішено використати параметр ліпофільної ефективності (LipE). Він поєднує значення афінності ліганду до мішені (в нашому випадку це  $IC_{50}$ ) та ліпофільності [171, 184]. Використовуючи цей параметр в процесі розробки біологічноактивних речовин, можна оцінювати вплив структурних змін як на активність так і на ліпофільність сполуки [185].

Проаналізувавши найбільш активні сполуки, було знайдено, що найкращий показник ліпофільної ефективності був у сполуки **6.27** та дорівнював 4. На рис. 6.6 показано розкид значень LipE досліджуваних сполук (червоні кружечки) по відношенню до відомих інгібіторів протеїнази СК2.



**Рис. 6.6.** Графік залежності CLogP від  $pIC_{50}$ . Червоними точками показані значення CLipE похідних аурону до оптимізації, зеленими трикутниками – після проведеної оптимізації. CLipE сполуки FNH79 показаний чорним квадратом, а CLipE CX-4945 – темнозеленою зірочкою. Сполуки FNH79 та CX-4945 додані як сполуки порівняння

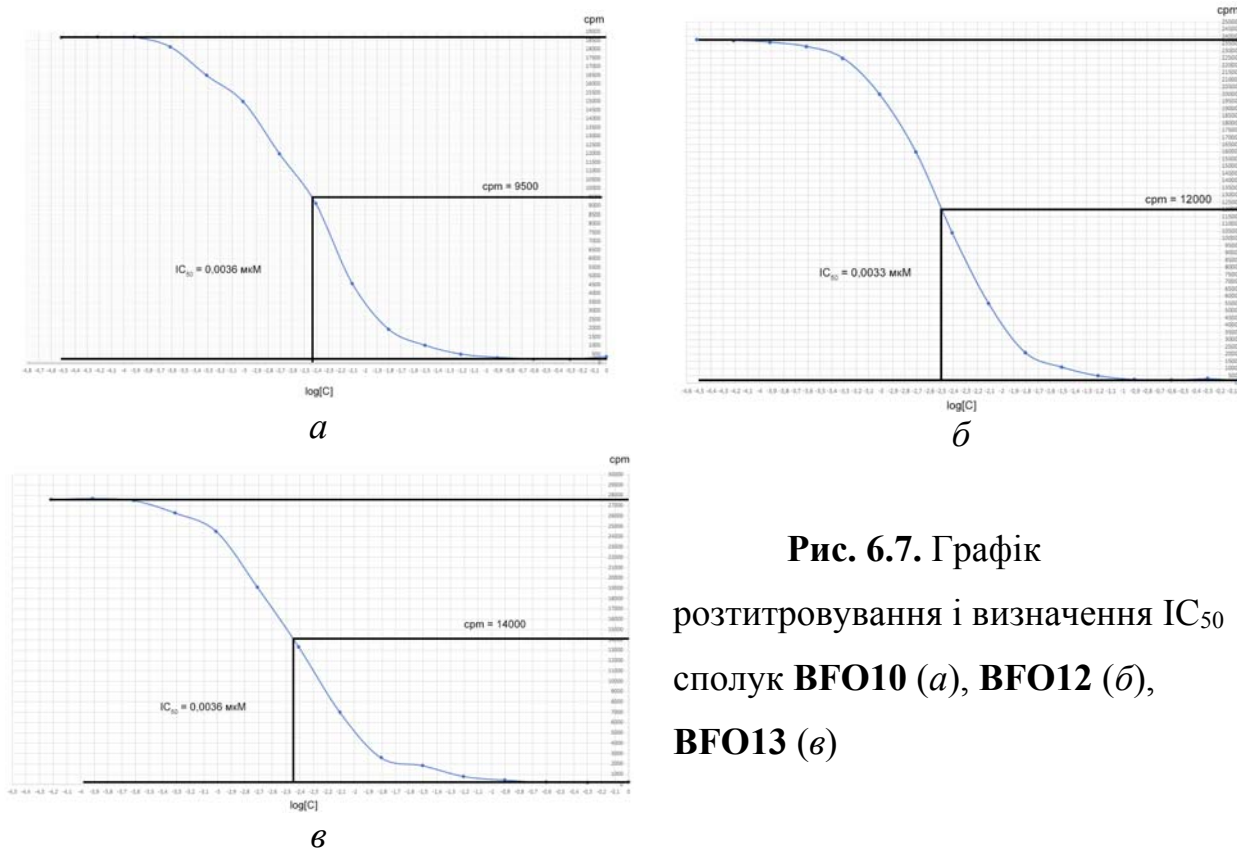
Високі значення LogP або ліпофільності можуть призвести до виявлення в подальших дослідженнях побічних ефектів, зокрема токсичність, викликану неспецифічним ліпофільним зв'язуванням [186]. Враховуючи це, було вирішено провести оптимізацію ефективності інгібування похідних аурону.

З цією метою в лабораторіях відділу біомедичної хімії Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ було синтезовано 86 похідних аурону для подальшого тестування. Результати біохімічного тестування зазначені в додатку В. Значення  $IC_{50}$  найбільш активних сполук – в таблиці 6.3 та рис. 6.7.

Таблиця 6.3.

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

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



**Рис. 6.7.** Графік розтитровування і визначення  $IC_{50}$  сполук **BFO10** (а), **BFO12** (б), **BFO13** (в)

Для початку було вирішено зменшити кількість атомів галогену на кільці А. Таким чином було синтезовано серії сполук 7-хлоро- (**6.59-6.72**), 5-хлор- (**6.73-6.91**), 7-бromo- (**6.92-6.101**) та 5-бромозаміщених (**6.52-6.58**) похідних аурону. Було встановлено, що бромозаміщені похідні аурону проявлять значно вищу інгібувальну здатність відносно протеїнкінази СК2, ніж хлорозаміщені похідні. Для доказу цього твердження слід порівняти активності пари сполук **6.56** та **6.78** ( $IC_{50}$  становлять 0,51 and 0,35 мкМ відповідно), та сполук **6.97** та **6.68** ( $IC_{50}$  становлять 0,0033 та 0,0036 мкМ відповідно). Якщо порівнювати заміщення в 5 та в 7 положенні, то слід зазначити, що галоген заміщені похідні аурону в позиції 7 кільця А проявляють кращу інгібувальну активність, ніж заміщені в позиції 5. Щоб довести це твердження варто подивитись на активності пар сполук **6.68**,  $IC_{50}$  якої дорівнює 0,0036 мкМ та **6.83**, яка інгібує СК2 на 33% при концентрації 0,03 мкМ; сполуки **6.94** та **6.52**, які інгібують СК2 на 24,6% при концентрації сполуки 1 мкМ та 2,2% при концентрації сполуки 3 мкМ відповідно; сполуки **6.96** та **6.58**, які інгібують СК2 на 16,8% при концентрації сполуки 0,03 мкМ та на 44% при

концентрації сполуки 3 мкМ відповідно. Таким чином було встановлено, що найбільш вдала позиція для галогенового замісника на кільці А – позиція 7.

Іншим шляхом зменшення ліпофільності стало введення гідрофільного замісника в кільце А. Для перевірки цієї гіпотези було синтезовано дві серії сполук **6.122-6.133** та **6.134-6.137**. Перші з них містять гідроксильну групу в положенні 6 на кільці А та проявили значно нижчу активність порівняно з галогеновмісними сполуками. Найкраща сполука цієї серії **6.133** мала значення  $IC_{50}$  0,059 мкМ. Другі ж, окрім гідроксильної групи в 6-му положенні, додатково містять метильну групу в положенні 7, але це не сприяло покращенню інгібувальної здатності цих сполук щодо СК2.  $IC_{50}$  найкращої сполуки **6.135** з цієї серії становить 0,347 мкМ.

Серія незаміщених по кільцю А ауронів **6.102-6.121** очікувано проявили значно меншу активність відносно СК2, ніж галогенозаміщені. Найбільш активні сполуки цієї серії **6.108**, **6.117**, **6.118** мали значення  $IC_{50}$  0,55, 0,38 та 0,191 мкМ відповідно.

У результаті було отримано 7 сполук із значеннями показника  $CLipE$  більше 4 (див. рис. 6). Найбільш ефективними серед них були сполуки **6.69**, **6.98**, **6.97** та **6.133**. Значення  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  цих сполук, а також відповідні параметри відомих інгібіторів СК2 представлені в таблиці 6.4.

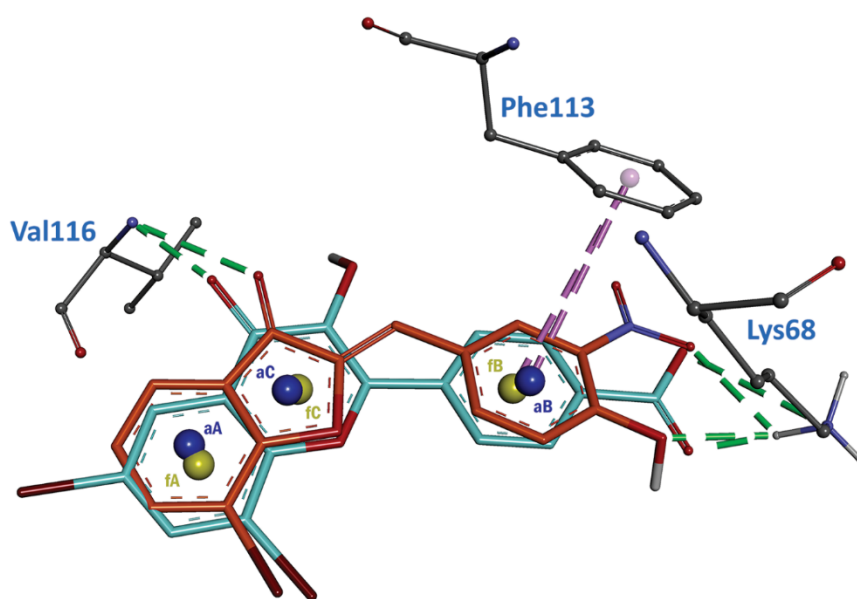
Таблиця 6.4.

**Порівняння  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  досліджуваних похідних аурону та відомих інгібіторів СК2**

Сполука	$IC_{50}$ , $\mu M$	$ClogP$	$CLipE$
<b>CX-4945</b>	0,001	4,16	4,84
<b>FLC26</b>	0,009	3,92	3,85
<b>FNH79</b>	0,004	4,2	4,48
<b>6.69 (BFO11)</b>	0,006	3,5	4,72
<b>6.98 (BFO13)</b>	0,0036	3,5	4,94
<b>6.97 (BFO12)</b>	0,0033	4,4	4,08
<b>6.133 (BFO15)</b>	0,059	2,5	4,73

Оскільки від початку було задекларована структурна подібність флавонів та ауронів, було проведено молекулярний докінг в просторову структуру з ідентифікатором 4UBA [68], для порівняння способу зв'язування найефективнішого похідного аурону **6.98** із відомим закристалізованим інгібітором СК2 серед флавонів - **FLC26**.

На рисунку 6.8 показана модель зв'язування інгібітора **6.98**, що отримана молекулярним докінгом, та інгібітора **FLC26**, що отримана методом кристалографічного аналізу [68].



**Рис. 6.8.** Порівняння механізмів зв'язування сполуки **FLC26** (бірюзовий), отриманої методом кристалографічного аналізу (PDB ID: 4UBA) [68] та **6.98** (помаранчевий), отриманої методом молекулярного докінгу. Центроїди кілець А(fA), В(fB) та С(fC) інгібітора FLC26 позначені жовтими сферами, а центроїди кілець А(aA), В(aB) та С(aC) інгібітора **6.98** позначені синіми сферами. Водневі зв'язки позначені зеленими пунктирними лініями, а гідрофобні взаємодії – фіолетовими

Як видно з рисунку 6.7, між центроїдами кілець (aA, fA; aC, fC та aB, fB) цих сполук спостерігається майже повне співпадіння, що обумовлює формування однакових взаємодій з ключовими амінокислотними залишками. Враховуючи відносну жорсткість структур флавону і аурону, накладання кілець призводить до



однакового розташування акцепторів водневого зв'язку. Таким чином сполуки **FLC26** та **6.98** проявлять високу інгібувальну здатність щодо протеїнкінази СК2 ( $IC_{50}$  цих сполук становить 9 та 3,3 нМ відповідно).

Отже, був доведений 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 параметру  $IC_{50}$ .

Використовуючи комплексний підхід до оптимізації, розроблено низку високоефективних інгібіторів протеїнкінази СК2. Найкращі сполуки **6.69 (BFO11)**, **6.98 (BFO13)**, **6.97 (BFO12)** та **6.133 (BFO15)** можуть стати чудовими кандидатами для подальших досліджень на клітинах та *in vivo*.

### **Висновки:**

1. Ідентифіковано нові високоефективні інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних бензиліденбензофуран-3-ону: **BFO1**, **BFO2**, **BFO3**, **BFO4**, **BFO5**, **BFO6**, **BFO7**, **BFO8**, що мають значення  $IC_{50}$  відносно протеїнкінази СК2 0,055, 0,0035, 0,0063, 0,0079, 0,0035, 0,004, 0,004 та 0,03 мкМ відповідно.

2. Досліджено залежність інгібувальної активності від хімічної будови замісників похідних бензиліденбензофуран-3-ону. Наявність гідроксильної групи в положенні R5' є ключовою для активності ауронів щодо СК2. На кільці А залежність інгібувальної активності від структури замісників наступна: 5-хлоро-4,6-диметил- (**6.1-6.15**)  $\ll$  4,7-дихлоро- (**6.32-6.51**)  $\leq$  5,7-дихлорозамішені похідні аурону (**6.16-6.31**).

3. Запропоновано модель зв'язування похідних бензиліденбензофуран-3-ону з АТФ-зв'язувальною кишенею. Ключовими для активності сполук є водневі зв'язки з амінокислотними залишками шарнірної ділянки та Lys68. Також важливу роль в стабілізації сполуки в сайті зв'язування грають гідрофобні взаємодії, особливо з Phe113. Підтвердженням важливості гідрофобних взаємодій з АТФ-зв'язувальною кишенею є той факт, що похідні аурону з гідрофільними

замісниками на кільці А мали значну гіршу активність, ніж аналогічні, але з гідрофобними замісниками.

4. Встановлено, що заміною гідрофобних замісників на їхні біоізостерні аналоги та варіацією їхнього розташування на каркасній структурі активних сполук, можна впливати на їхню ліпофільну ефективність (LipE). В результаті таких замін отримано нові інгібітори СК2 з покращеними значеннями LipE на 21,9% (сполуки **6.16** та **6.92** CLipE 3,06 та 3,92 відповідно), 22,7% (сполуки **6.26** та **6.68** CLipE 3,2 та 4,14 відповідно) та 30,7% (сполуки **6.44** та **6.118** CLipE 3,42 та 4,94 відповідно).

5. Цикл направленої оптимізації дозволив розробити ряд нових похідних аурону з наномолярними значеннями IC<sub>50</sub>, але водночас із кращими фізико-хімічними показниками. Сполука **BFO13** має значення параметру ліпофільної ефективності (LipE = 4.94) більше, ніж у інгібітора СК2 CX-4945 (LipE = 4.84), що перебуває на стадії клінічних випробувань.

**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Protopopov MV, Vdovin VS, Starosyla SA, Borysenko IP, Prykhod'ko AO, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Flavone inspired discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones (aurones) as potent inhibitors of human protein kinase CK2. *Bioorg Chem.* 2020 Sep;102:104062.

3. 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.

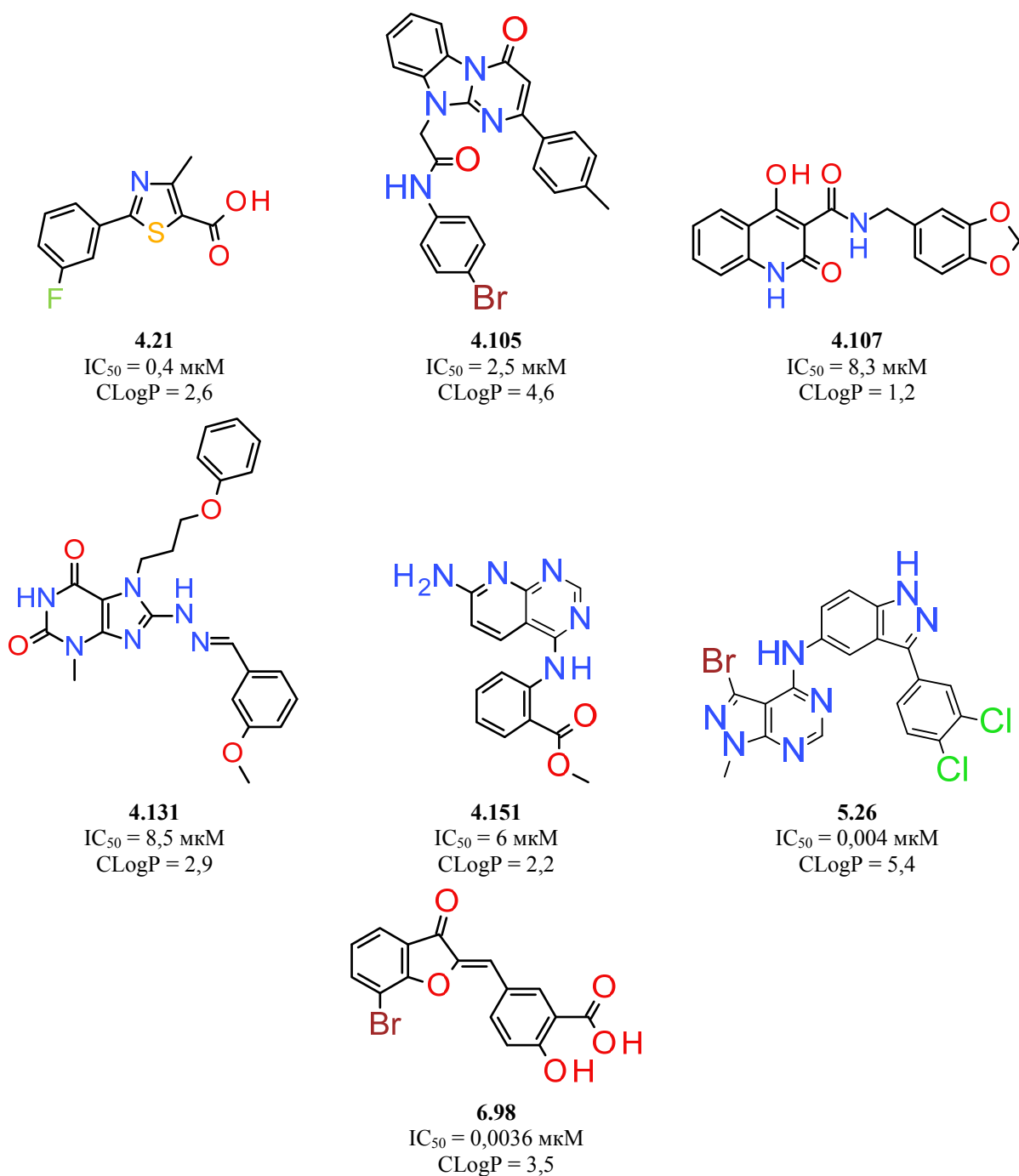
## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### 7.1 Аналіз та узагальнення знайдених інгібіторів протеїнкінази СК2

В роботі було досліджено біологічну активність 310 сполук відносно протеїнкінази СК2 та визначено значення  $IC_{50}$  для 122 сполук, методом прямої детекції залишкової активності протеїнкінази з використанням радіоактивно-міченого АТФ [110]. В роботі було детально досліджено сім хімічних класів. Структури найбільш активних сполук кожного з них представлені на рис. 7.1.

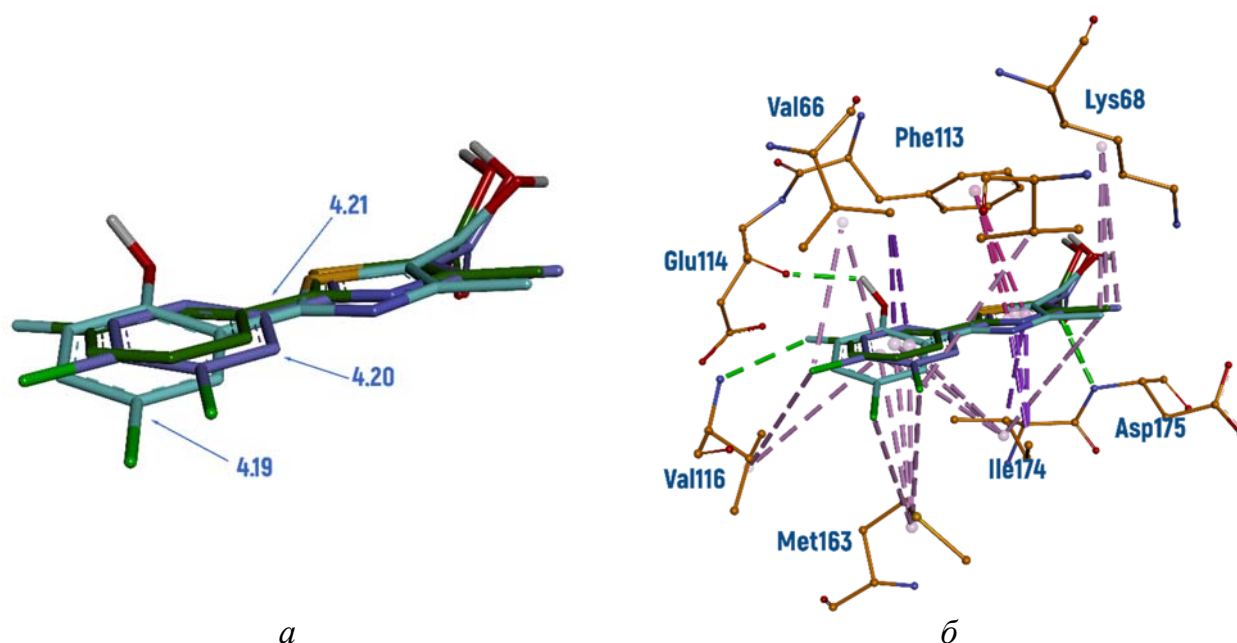
Порівнюючи знайдені інгібітори з результатами роботи Голуба [54], зокрема з визначеними ним характерними рисами «ідеального» інгібітору протеїнкінази СК2, а саме наявністю, як мінімум двох конденсованих ароматичних кілець між гідрофобними залишками Ile174 та Val66, було встановлено, що таким параметрам відповідає шість із семи досліджених класів (похідні дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону, 2-піридону, пурин-2,6-діону, піридо[2,3-d]піримідину, 5-гетериламіно-1H-індазоліу та бензиліденбензофуран-3(2H)-ону). Наявність донорно-акцепторних груп, що можуть утворювати водневі зв'язки з амінокислотними залишками Lys68, Asp175, Glu81, присутня у шести з семи досліджуваних класів (похідні 4-метил-1,3-гіазол-5-карбокиської кислоти, 2-піридону, пурин-2,6-діону, піридо[2,3-d]піримідину, 5-гетериламіно-1H-індазоліу та бензиліденбензофуран-3(2H)-ону). Три класи інгібіторів мали розгалужені і довгі лінкери, що, ймовірно, сприяли нестійкій фіксації сполуки в сайті зв'язування, що негативно впливало на активність сполук. Такі лінкери присутні у похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону, 2-піридону та пурин-2,6-діону (сполуки **4.105**, **4.107**, **4.131** із значеннями  $IC_{50}$  2,5, 8,3 та 8,5 мкМ), відповідно похідні цих класів мали відносно низькі значення  $IC_{50}$ .



**Рис. 7.1.** Структури, значення  $IC_{50}$  та  $CLogP$  найбільш ефективних інгібіторів з семи досліджених хімічних класів

Найбільш цікавим з точки зору взаємодії інгібітора з активним сайтом були сполуки похідні 4-метил-1,3-тіазол-5-карбоксильної кислоти. Цей клас був ідентифікований з використанням молекулярного докінгу. Одним із критеріїв відбору сполуки **4.19** була здатність формувати водневий зв'язок з шарнірною ділянкою протеїнкінази СК2. Однак в процесі дослідження було перевірено інгібувальну здатність щодо СК2 32 аналогів сполуки **4.19** та ідентифіковано

сполуку 2-(3,4-дихлорфеніл)-4-метил-тіазол-5-карбоксильна кислота (**4.20**),  $IC_{50}$  якої становить 3,5 мкМ. Дослідження способу взаємодії сполуки **4.20** з АТФ-акцепторним сайтом СК2 показало, що вона не формує водневий зв'язок із шарнірною ділянкою СК2. Сполуки **4.19-4.21** мають дуже схожий механізм взаємодії (див. рис. 7.2) і відсутність водневого зв'язку з шарнірною ділянкою погіршує їхні інгібувальні властивості більш, ніж у чотири рази.  $IC_{50}$  сполуки **4.19**, що формує водневий зв'язок з шарнірною ділянкою, становить 0,8 мкМ, а сполуки **4.20** – 3,5 мкМ (не формує водневий зв'язок).



**Рис. 7.2.** Порівняння розташування сполук сполук **4.19**, **4.20** та **4.21** в сайті зв'язування. *а* – накладання сполук **4.19**, **4.20** та **4.21** та *б* – їхній комплекс з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2

Варто зазначити, що наявність водневого зв'язку з шарнірною ділянкою є ключовою для інгібіторів протеїнкіназ І типу. Однак дослідження інших лабораторій [69-73] та наші доводять, що органічні сполуки можуть інгібувати протеїнкіназу СК2 без утворення водневого зв'язку з шарнірною ділянкою.

## 7.2 Аналіз та узагальнення використаних методів комп'ютерного моделювання

Інший висновок дисертаційної роботи стосується методології дослідження. Інгібітори серед похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбоксильної кислоти, дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону, 2-піридону, пурин-2,6-діону та піридо[2,3-d]піримідину були ідентифіковані, використовуючи методи комп'ютерного моделювання, а саме молекулярного докінгу та фармакофорного скринінгу. Серед них є досить ефективні сполуки з субмікромолярними значеннями  $IC_{50}$ . Однак найбільш активні сполуки, що досліджувались в дисертаційній роботі (похідні 5-гетериламіно-1H-індазолію та бензиліденбензофуран-3(2H)-ону), знайдені шляхом ретельного аналізу взаємодій замісників каркасного гетероциклу з амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту СК2 та співставленням з *in vitro* активністю досліджуваних сполук. Це в жодному разі не зменшує важливість використання методів комп'ютерного моделювання, а лише підкреслює важливість ретельного підбору бібліотек хімічних сполук для проведення скринінгу.

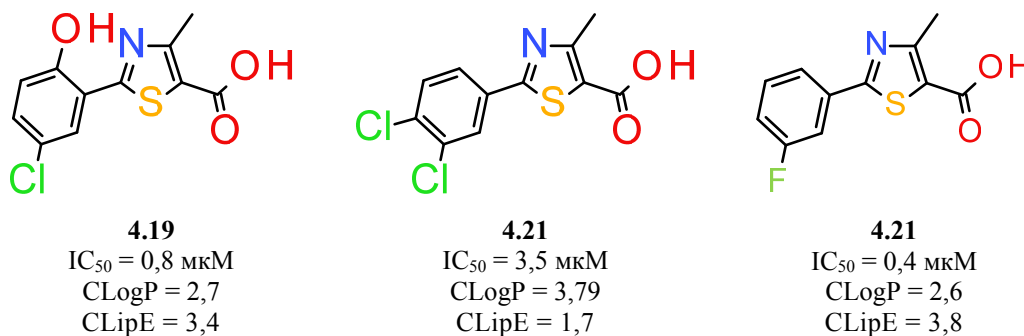
Звісно, щоб охопити максимально велику частину хімічного простору, бібліотека для віртуального скринінгу повинна бути максимально великою та різноманітною. Однак, якщо підходити до віртуального скринінгу раціонально, постає необхідність використовувати різноманітні дескриптори, що описують структурні та фізико-хімічні особливості сполук. Тобто застосовувати методи QSAR (Quantitative structure–activity relationship/ Пошук кількісних співвідношень структура-властивість). Таким чином, в даній роботі було порівняно структурні особливості похідних флавону та ауруну та висунуто припущення, що при зазначеній подібності (див. таблиця 6.1), розроблені похідні ауруну матимуть схожий тип взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом СК2 такий самий як і у флавону, а, відповідно, і високу активність щодо СК2. Результати описані в розділі 6, підтверджують це припущення.

### 7.3 Аналіз та узагальнення фізико-хімічних властивостей знайдених інгібіторів

Одна з основних задач дисертаційної роботи полягала в розробці біодоступних інгібіторів протеїнкінази СК2. В цій роботі біодоступність оцінювалась таким параметром як LogP, що описує ліпофільність сполуки. Цей параметр фігурує в низці правил, що використовуються при розробці біологічно активних сполук, зокрема правило Ліпінського [178] та правило трьох [179]. Якщо значення LogP занижкі – досліджувані сполуки не проникнуть крізь мембрану клітини і не дістануться своїх молекулярних мішеней. Водночас, якщо ж значення LogP зависокі, сполука може застрягнути в мембрані клітини або ж при потрапленні в кров вона неспецифічно зв'яжеться з її білками і не потрапить в клітину. Тому завдання роботи полягало не просто в пошуку інгібіторів протеїнкінази в допустимих значеннях LogP, а в намаганні шляхом проведення хімічної оптимізації розробити сполуки, LogP яких розташовується в середині діапазону допустимих значень цього параметру (допустимі значення LogP знаходяться в межах від -0,4 до 5) [178].

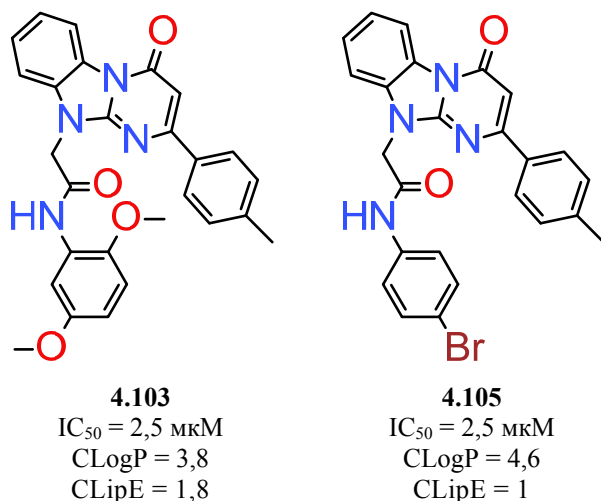
Звісно такі модифікації необхідно проводити без втрати активності досліджуваних сполук. З метою оцінки оптимізації було застосовано параметр ліпофільної ефективності (LipE), що поєднує в собі афінність сполуки до мішені (в даній роботі застосовувався параметр IC<sub>50</sub>) та LogP. Значення LipE для відомих інгібіторів протеїнкіназ, що є затвердженими лікарськими засобами, знаходиться в межах від 2 до 8,5 [165]. Ці значення використані в роботі як стандарт для інгібіторів протеїнкіназ.

Серед похідних 4-метил-1,3-тіазол-5-карбоксільної кислоти було розроблено 3 сполуки див. рис. 7.3. LogP ідентифікованих сполук знаходились всередині допустимого діапазону значень. Значення LipE відповідають стандартам для протеїнкіназ.



**Рис. 7.3.** Структури, значення  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  сполук **4.19-4.21**

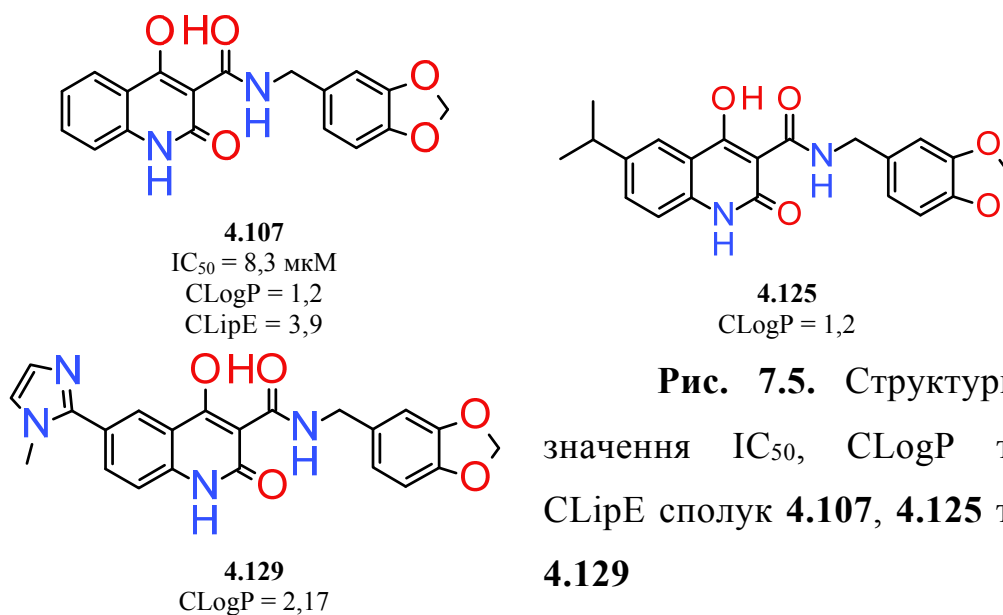
Пошук інгібіторів серед похідних дигідробензо[4,5]імідазо[1,2-а]піримідин-4-ону був завершений ідентифікацією 32 сполук зі значеннями  $IC_{50}$  від 2,5 до 7,5 мкМ та  $LogP$  від 3,2 до 5.  $LipE$  найбільш активних з них **4.103** та **4.105** становить 1 та 1,8 (див. рис. 7.4). На жаль, розробити більш ефективні сполуки серед цього хімічного класу в рамках даної роботи не вдалось, але були визначені можливі шляхи оптимізації похідних цього класу.



**Рис. 7.4.** Структури, значення  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  сполук **4.103** та **4.105**

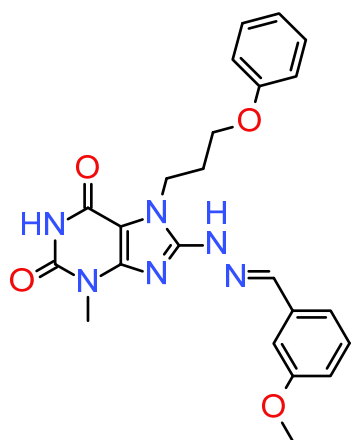
Серед похідних 2-піридону була розроблена сполука **4.107** ( $IC_{50} = 8,3$  мкМ,  $CLogP = 1,2$ ,  $CLipE = 3,9$ , див. рис. 7.5).  $CLogP$  знайденої сполуки доволі низьке, а дослідження взаємодії сполуки **4.107** з АТФ-акцепторним сайтом показали, що введення гідрофобних замісників може збільшити афінність за рахунок додаткових гідрофобних взаємодій з амінокислотними залишками сайту зв'язування; було розроблено 9 нових сполук на її основі.



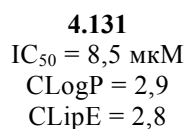


**Рис. 7.5.** Структури, значення  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  сполук **4.107**, **4.125** та **4.129**

Серед похідних пурин-2,6-діону була розроблена сполука **4.131** ( $IC_{50} = 8,5$  мкМ,  $CLogP = 2,9$ ,  $CLipE = 2,8$ , див. рис. 7.6).  $CLogP$  та  $CLipE$  знайденої сполуки знаходиться в допустимих межах, проте афінність до протеїнкінази СК2 занижка. Проаналізувавши механізм взаємодії похідних цього класу сполук, не вдалось виявити ефективних шляхів оптимізації.

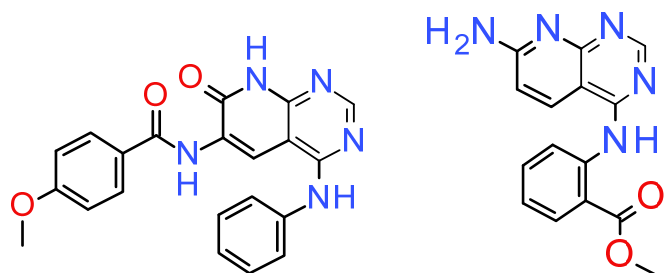


**Рис. 7.6.** Структура, значення  $IC_{50}$ ,  $CLogP$  та  $CLipE$  сполуки **4.131**



Серед похідних піридо[2,3-d]піримідину було ідентифіковано сполуки **4.150** та **4.151**.  $IC_{50}$  сполуки **4.150** нижче порогового значення для подальшого дослідження, тому оптимізацію проводили тільки для **4.151**. Підвищення їхньої афінності планувалось шляхом введення гідрофобних замісників. Така модифікація не погіршить біодоступності похідних цього класу, але може значно підвищити спорідненість до АТФ-акцепторного сайту СК2. Таким чином було

розроблено низку високоскорових сполук із значенням CLogP в межах від 2,8 до 3,4 (їхні структури представлені в таблиці 4.8).



**4.150**  
 $IC_{50} = 19,5$  мкМ  
 CLogP = 2,6  
 CLipE = 2,1

**4.151**  
 $IC_{50} = 6$  мкМ  
 CLogP = 2,2  
 CLipE = 3

**Рис. 7.7.** Структури, значення  $IC_{50}$ , CLogP та CLipE сполук **4.150** та **4.151**

Під час розробки нових інгібіторів серед похідних 5-гетериламіно-1H-індазоліу було виявлено, що найбільш активні сполуки з  $IC_{50}$  0,8-0,002 мкМ мали значення параметру CLogP від 5,5-8,7. Значення  $LogP > 5$  виходять за межі допустимих правилом Ліпінського. Сполуки **5.20-5.27** та **5.32** показали високу ефективність в тестуванні *in vitro*, в системі СК2 $\alpha$ , субстрат, АТФ, інгібітор, але будуть не ефективні при тестуванні на клітинах та організмах, а також можуть викликати небажані побічні ефекти, викликані неспецифічним гідрофобним зв'язуванням. Таким чином, шляхом ретельного аналізу молекулярних взаємодій знайдених інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом СК2, та аналізом залежності активності від структури і аналізом вкладу різних замісників в гідрофобність сполуки, було розроблено 9 сполук, що мають високі показники скорингових функцій та значення CLogP в межах від 2,3 до 4,7 (структури розроблених сполук представлені на рис. 5.6).

Серед похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону було ідентифіковано низку вискоефективних інгібіторів протеїнкінази СК2. Серед 51 дослідженого похідного було ідентифіковано 8 сполук,  $IC_{50}$  яких знаходиться в межах від 0,055 до 0,0035 мкМ, при CLipE  $> 3$ , однак CLogP  $> 4$ . Ретельно дослідивши міжмолекулярні взаємодії похідних бензиліденбензофуран-3(2H)-ону з АТФ-акцепторним сайтом СК2, було вирішено провести цикл оптимізації з метою зменшити ліпофільність сполук, але при цьому не погіршити їхню активність. Як наслідок, були розроблені сполуки, CLogP яких дорівнював 2,5 та 3,5, а

CLipE > 4 (результати наведені в таблиці 6.3). IC<sub>50</sub> найкращої сполуки **BF013 (6.98)** становило 0,0036 мкМ, CLogP – 3,5, CLipE – 4,94. CLipE сполуки вище, ніж у інгібітора СК2 CX-4945, що наразі проходить клінічні випробування. Це дає підставу стверджувати, що розроблені сполуки матимуть подібні властивості біодоступності і є хорошими кандидатами для досліджень на клітинах.

## 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  $R = 0,94$ , JСHEM –  $R = 0,91$  і ОСHEM –  $R = 0,9$ . 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 гідрофобні взаємодії з амінокислотними залишками Val66, Phe113, Met163.

4. Встановлено, що заміною гідрофобних замісників на їх біоізостерні аналоги та варіацією їх розташування на каркасній структурі активних сполук можна впливати на їх ліпофільну ефективність (LipE). У результаті таких замін

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 **BF013** має значення параметра ліпофільної ефективності (LipE = 4,94) більше, ніж у інгібітора СК2 СХ-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.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar 19;9(3):203–14.
2. Macarron R, Banks MN, Bojanic D, Burns DJ, Cirovic DA, Garyantes T, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Mar 1;10(3):188–95.
3. Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res.* 2015 Sep 25;38(9):1686–701.
4. Carpenter KA, Huang X. Machine Learning-based Virtual Screening and Its Applications to Alzheimer's Drug Discovery: A Review. *Curr Pharm Des.* 2018 Dec 7;24(28):3347–58.
5. Deore AB, Dhumane JR, Wagh R, Sonawane R. The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian J Pharm Res Dev.* 2019 Dec 15;7(6):62–7.
6. Amaratunga D, Göhlmann H, Peeters PJ. Microarrays. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* Elsevier; 2007. p. 87–106.
7. Wang Y, Zhang S, Li F, Zhou Y, Zhang Y, Wang Z, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics. *Nucleic Acids Res.* 2019 Nov 6;
8. Ewing B, Green P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet.* 2000;25(2):232–4.
9. Bohacek RS, McMartin C, Guida WC. The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective. *Med Res Rev.* 1996;16(1):3–50.
10. Lyne PD. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today.* 2002 Oct;7(20):1047–55.
11. Yu H, Adedoyin A. ADME–Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discov Today.* 2003 Sep;8(18):852–61.

12. Eastgate MD, Schmidt MA, Fandrick KR. On the design of complex drug candidate syntheses in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Chem*. 2017 Feb 8;1(2):0016.
13. Dorato MA, Buckley LA. Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. *Curr Protoc Pharmacol*. 2006 Mar;32(1).
14. Umscheid CA, Margolis DJ, Grossman CE. Key concepts of clinical trials: a narrative review. *Postgrad Med*. 2011 Sep;123(5):194–204.
15. Yuan X, Shao Y, Bystroff C. Ab Initio Protein Structure Prediction Using Pathway Models. *Comp Funct Genomics*. 2003;4(4):397–401.
16. Muhammed MT, Aki-Yalcin E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chem Biol Drug Des*. 2019 Jan;93(1):12–20.
17. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):421.
18. Lagoja I. Pyrimidine as Constituent of Natural Biologically Active Compounds. *Chem Biodivers*. 2005 Jan;2(1):1–50.
19. Li B, Turuvekere S, Agrawal M, La D, Ramani K, Kihara D. Characterization of local geometry of protein surfaces with the visibility criterion. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2008 May 1;71(2):670–83.
20. Roy S, Mandal C, K. Dutta S. Site-Directed Mutagenesis to Identify Key Residues in Structure-Function Relationship of Winged Bean Chymotrypsin-Trypsin Inhibitor and 3-D Structure Prediction. *Protein Pept Lett*. 2011 May 1;18(5):471–9.
21. Brady GP, Stouten PFW. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. *J Comput Aided Mol Des*. 2000;14(4):383–401.
22. Laurie ATR, Jackson RM. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics*. 2005 May 1;21(9):1908–16.
23. Schmidtke P, Bidon-chanal A, Luque FJ, Barril X. MDpocket: Open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics*. 2011;27(23):3276–85.

24. Somarowthu S, Ondrechen MJ. POOL server: machine learning application for functional site prediction in proteins. *Bioinformatics*. 2012 Aug 1;28(15):2078–9.
25. Pérot S, Sperandio O, Miteva MA, Camproux A-C, Villoutreix BO. Druggable pockets and binding site centric chemical space: a paradigm shift in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2010 Aug;15(15–16):656–67.
26. Zhavoronkov A, Ivanenkov YA, Aliper A, Veselov MS, Aladinskiy VA, Aladinskaya A V., et al. Deep learning enables rapid identification of potent DDR1 kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*. 2019 Sep 2;37(9):1038–40.
27. Schneider P, Walters WP, Plowright AT, Sieroka N, Listgarten J, Goodnow RA, et al. Rethinking drug design in the artificial intelligence era. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 May 4;19(5):353–64.
28. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785–91.
29. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *J Mol Biol*. 1997 Apr;267(3):727–48.
30. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J Med Chem*. 2004 Mar;47(7):1750–9.
31. Hindle SA, Rarey M, Buning C, Lengauer T. Flexible docking under pharmacophore type constraints. *J Comput Aided Mol Des*. 2002;16(2):129–49.
32. Li J, Fu A, Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2019 Jun 15;11(2):320–8.
33. von Behren MM, Rarey M. Ligand-based virtual screening under partial shape constraints. *J Comput Aided Mol Des*. 2017 Apr 18;31(4):335–47.
34. Yang S-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discov Today*. 2010 Jun;15(11–12):444–50.



35. Toropov AA, Toropova AP. QSPR/QSAR: State-of-Art, Weirdness, the Future. *Molecules*. 2020 Mar 12;25(6):1292.
36. Melville J, Burke E, Hirst J. Machine Learning in Virtual Screening. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2009;12(4):332–43.
37. Vamathevan J, Clark D, Czodrowski P, Dunham I, Ferran E, Lee G, et al. Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jun 11;18(6):463–77.
38. Cozza G. The Development of CK2 Inhibitors: From Traditional Pharmacology to in Silico Rational Drug Design. *Pharmaceuticals*. 2017 Feb 20;10(4):26.
39. Bian Y, Ye M, Wang C, Cheng K, Song C, Dong M, et al. Global Screening of CK2 Kinase Substrates by an Integrated Phosphoproteomics Workflow. *Sci Rep*. 2013 Dec 10;3(1):3460.
40. Guerra B, Issinger O-G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*. 1999 Feb 1;20(2):391–408.
41. Niefind K. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J*. 2001 Oct 1;20(19):5320–31.
42. Litchfield DW, Bosc DG, Canton DA, Saulnier RB, Vilk G, Zhang C. Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners. *Mol Cell Biochem*. 2001 Nov;227(1–2):21–9.
43. Litchfield DW, Slominski E, Lewenza S, Narvey M, Bosc DG, Gietz RD. Analysis of interactions between the subunits of protein kinase CK2. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(4):541–7.
44. Guerra B, Niefind K, Ermakowa I, Issinger OG. Characterization of CK2 holoenzyme variants with regard to crystallization. *Mol Cell Biochem*. 2001;227(1–2):3–11.
45. Bischoff N, Olsen B, Raaf J, Bretner M, Issinger O-G, Niefind K. Structure of the Human Protein Kinase CK2 Catalytic Subunit CK2 $\alpha'$  and Interaction Thermodynamics with the Regulatory Subunit CK2 $\beta$ . *J Mol Biol*. 2011 Mar;407(1):1–12.

46. Pechkova E, Zanotti G, Nicolini C. Three-dimensional atomic structure of a catalytic subunit mutant of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2003 Dec 1;59(12):2133–9.
47. Sajnaga E, Szyszka R, Kubinski K. Site-Directed Mutagenesis in the Research of Protein Kinases - The Case of Protein Kinase CK2. *Genet Manip DNA Protein - Examples from Curr Res*. 2013
48. Chantalat L. Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J*. 1999 Jun 1;18(11):2930–40.
49. Raaf J, Brunstein E, Issinger O, Niefind K. The interaction of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 $\beta$  in a preformed conformation and is enthalpically driven. *Protein Sci*. 2008 Dec 2;17(12):2180–6.
50. Backes A, Zech B, Felber B, Klebl B, Müller G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition. *Expert Opin Drug Discov*. 2008 Dec;3(12):1409–25.
51. Qiao Y, Chen T, Yang H, Chen Y, Lin H, Qu W, et al. Small molecule modulators targeting protein kinase CK1 and CK2. *Eur J Med Chem*. 2019 Nov;181:111581.
52. Jakobi R, Traugh JA. Site-Directed Mutagenesis and Structure/Function Studies of Casein Kinase II Correlate Stimulation of Activity by the  $\beta$  Subunit with Changes in Conformation and ATP/GTP Utilization. *Eur J Biochem*. 2008 Jun 28;230(3):1111–7.
53. Traxler PM. Protein tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Ther Pat*. 1997 Jun 25;7(6):571–88.
54. Голуб АГ. *In silico* дизайн інгібіторів протеїнкінази СК2 [Дисертація]. Київ, Україна; Інститут молекулярної біології і генетики НАН України; 2007. 139 ст.
55. Krentz GM. Gene expression profiles reveal alternative targets of therapeutic intervention for the treatment of drug-resistant non-small cell lung cancers [PhD Thesis]. Lexington, USA; University of Kentucky; 2017, 276 p.

56. Lian H, Su M, Zhu Y, Zhou Y, Soomro SH, Fu H. Protein Kinase CK2, a Potential Therapeutic Target in Carcinoma Management. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019 Jan 1;20(1):23–32.

57. Бджола ВГ, Ярмолюк СМ, Яковенко ОЯ, Дубініна ГГ, Голуб АГ, Сапелкін ВМ, Лукашов СС, винахідники; Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, патентовласник, Застосування 4-заміщених 3-карбоксихінолінів як інгібіторів протеїнкінази СК2. Патент України № 68984. 2004 сер. 16.

58. Приходько АО, Бджола ВГ, Дубініна ГГ, Яковенко ОЯ, Голуб АГ, Ярмолюк СМ, винахідники; Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, патентовласник; Застосування 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів як інгібіторів протеїнкінази СК2. Патент України № 69165. 2004 сер. 16.

59. Meggio F, Shugar D, Pinna LA. Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur J Biochem.* 1990 Jan;187(1):89–94.

60. Pagano MA, Meggio F, Ruzzene M, Andrzejewska M, Kazimierczuk Z, Pinna LA. 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep;321(4):1040–4.

61. Cozza G, Pinna LA. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2016 Mar 3;20(3):319–40.

62. Chilin A, Battistutta R, Bortolato A, Cozza G, Zanatta S, Poletto G, et al. Coumarin as Attractive Casein Kinase 2 (CK2) Inhibitor Scaffold: An Integrate Approach To Elucidate the Putative Binding Motif and Explain Structure–Activity Relationships. *J Med Chem.* 2008 Feb;51(4):752–9.

63. Sekiguchi Y, Nakaniwa T, Kinoshita T, Nakanishi I, Kitaura K, Hirasawa A, et al. Structural insight into human CK2 $\alpha$  in complex with the potent inhibitor ellagic acid. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Jun;19(11):2920–3.

64. Janeczko M, Masłyk M, Kubiński K, Golczyk H. Emodin, a natural inhibitor of protein kinase CK2, suppresses growth, hyphal development, and biofilm formation of *Candida albicans*. *Yeast.* 2017 Jun;34(6):253–65.

65. Battistutta R, Sarno S, De Moliner E, Papinutto E, Zanotti G, Pinna LA. The Replacement of ATP by the Competitive Inhibitor Emodin Induces Conformational Modifications in the Catalytic Site of Protein Kinase CK2. *J Biol Chem*. 2000 Sep;275(38):29618–22.
66. Golub AG, Bdzhola VG, Ostrynska O V., Kyshenia I V., Sapelkin VM, Prykhod'ko AO, et al. Discovery and characterization of synthetic 4'-hydroxyflavones—New CK2 inhibitors from flavone family. *Bioorg Med Chem*. 2013 Nov;21(21):6681–9.
67. Golub AG, Bdzhola VG, Kyshenia Y V., Sapelkin VM, Prykhod'ko AO, Kukharenko OP, et al. Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem*. 2011 Oct 7;356(1–2):107–15.,
68. Guerra B, Bischoff N, Bdzhola VG, Yarmoluk SM, Issinger O-G, Golub AG, et al. A Note of Caution on the Role of Halogen Bonds for Protein Kinase/Inhibitor Recognition Suggested by High- And Low-Salt CK2 $\alpha$  Complex Structures. *ACS Chem Biol*. 2015 Jul 17;10(7):1654–60.
69. Hochscherf J, Lindenblatt D, Witulski B, Birus R, Aichele D, Marminon C, et al. Unexpected Binding Mode of a Potent Indeno[1,2-b]indole-Type Inhibitor of Protein Kinase CK2 Revealed by Complex Structures with the Catalytic Subunit CK2 $\alpha$  and Its Paralog CK2 $\alpha'$ . *Pharmaceuticals*. 2017 Dec 13;10(4):98.
70. Haidar S, Bouaziz Z, Marminon C, Laitinen T, Poso A, Le Borgne M, et al. Development of Pharmacophore Model for Indeno[1,2-b]indoles as Human Protein Kinase CK2 Inhibitors and Database Mining. *Pharmaceuticals*. 2017 Jan 9;10(4):8.
71. Jabor Gozzi G, Bouaziz Z, Winter E, Daflon-Yunes N, Aichele D, Nacereddine A, et al. Converting potent indeno[1,2-b]indole inhibitors of protein kinase CK2 into selective inhibitors of the breast cancer resistance protein ABCG2. *J Med Chem*. 2015;58(1):265–77.
72. Alchab F, Ettouati L, Bouaziz Z, Bollacke A, Delcros J-G, Gertzen C, et al. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling of Substituted Indeno[1,2-b]indoles as Inhibitors of Human Protein Kinase CK2. *Pharmaceuticals*. 2015 Jun 8;8(2):279–302.

73. Hundsdörfer C, Hemmerling H-J, Götz C, Totzke F, Bednarski P, Le Borgne M, et al. Indeno[1,2-b]indole derivatives as a novel class of potent human protein kinase CK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2012 Apr;20(7):2282–9.

74. Kazimierczuk Z, Pinna LA., Meggio F, Andrzejewska M, inventor. New derivatives of 4, 5, 6, 7-tetrabromobenzimidazole and method of their preparation. WO2005092866, 2005 March 29.

75. Rice KD, Bussenius J, Costanzo S, Kennedy AR, Kim AI, Manalo L, Peto CJ, inventor;. Pyrazolo-pyrimidines as casein kinase ii (CK2) modulators. WO2007048066; 2006 Oct 23.,

76. Koltun ES, Kearney P, Aay Naing, Arcalas A, Wai Ki Vicky Chan, Curtis JK, Hongwang Du Ping Huang, Kane B, Moon Hwan Kim, Pack M, Tshako AL, Wei Xu, Zaharia CA, Zhou P, inventor; EXELIXIS, INC, assignee. Pyrimidinones as casein kinase ii (ck2) modulators. WO2008143759. 2008 Nov 27.

77. Claude Cochet, Renaud Prudent, inventor; Protein-kinase CK2 inhibitors and their therapeutic applications. EP1911451. 2008 Apr. 16.

78. Prudent R, Moucadel V, Nguyen C-H, Barette C, Schmidt F, Florent J-C, et al. Antitumor Activity of Pyridocarbazole and Benzopyridoindole Derivatives that Inhibit Protein Kinase CK2. *Cancer Res*. 2010 Dec 1;70(23):9865–74.

79. Cochet C, Prudent R, Moucadel V, Chi-Hung N'guyen, inventor; Condensed pyridine derivatives useful as potent inhibitors of the protein kinase CK2. WO2011013002A1, 2011 Feb 03.

80. Chua PC., Pierre F, Whitten JP. Inventor; Serine-threonine protein kinase and parp modulators. WO2008028168. 2008 Nov 13.

81. Toray Industries, assignee; Indoloquinoxaline carboxylic acid derivative or pharmacologically allowable salt thereof, and casein kinase 2 inhibitor containing the same active component. JP2010173971; 2010

82. Jose J, Götz C, Gratz A, Kuckländer U, Inventor; Verwendung von dibenzofuranonderivaten zur inhibierung von kinasen. WO2011161151, 2011 Dec. 29

83. Markwalder JA., Fink BE., Gavai AV., Liqi He, Soong-Hoon Kim, Seitz SP. Inventor; Substituted pyrrolotriazines as protein kinase inhibitors. WO2011123493. 2011 Oct 06.
84. Cozza G, Pinna LA, Moro S. Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012 Sep 21;22(9):1081–97.
85. Chuaqui CE, Dowling JE, Lyne P, Pontz T, Qing Ye, inventor; 3 -cyano- 5 -arylamino-7 -cycloalkylaminopyrrolo [1, 5 -a] pyrimidine derivatives and their use as antitumor agents, WO2013144532A1, 2013 Oct. 03
86. Brent A. Rupnow, Maria Jure-Kunkel, inventor; Combination of ck2 inhibitors and immune checkpoint modulators for cancer treatment, WO2017070137A1, 2017 Apr. 27
87. Purandare AV, Zimmermann K, Honghe Wan, inventor; Prodrugs of 2-(4-(3-((4-amino-7-cyano-imidazo[2,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)amino)phenyl)piperazin-1-yl)propanamide derivatives as ck2 inhibitors for the treatment of cancer. WO2017070135A1, 2017 Apr 27., Purandare AV, Zimmermann K, Honghe Wan, inventor; Prodrugs of imidazotriazine compounds as CK2 inhibitors, US10550125B2, 2020 Feb. 04
88. Sterling T, Becker DJ, Savarese D, Dorband JE, Ranawake UA, Packer CV. Beowulf: A Parallel Workstation For Scientific Computation. In *Proceedings of the 24th International Conference on Parallel Processing.* 1995. P. 11-14.
89. Tange O. GNU Parallel 2018. Apr 27;
90. RCSB The Protein Data Bank (PDB). USA; 1971 [29 січня 2021].  
Доступно за посиланням: <https://www.rcsb.org/>
91. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform.* 2011 Oct 7;3:33.
92. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des.* 2004 Mar;18(3):167–73.
93. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model.* 1999 Feb;17(1):57–61.

94. Ferguson AD, Sheth PR, Basso AD, Paliwal S, Gray K, Fischmann TO, et al. Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2. *FEBS Lett.* 2011;585(1):104–10.
95. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
96. Velec HFG, Gohlke H, Klebe G. DrugScore CSD Knowledge-Based Scoring Function Derived from Small Molecule Crystal Data with Superior Recognition Rate of Near-Native Ligand Poses and Better Affinity Prediction. *J Med Chem.* 2005 Oct;48(20):6296–303.
97. Neudert G, Klebe G. DSX : A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein–Ligand Complexes. *J Chem Inf Model.* 2011 Oct 24;51(10):2731–45.
98. 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.
99. Starosyla SA, Volynets GP, Protopopov MV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. The development of algorithm for pharmacophore model optimization and rescoring of pharmacophore screening results. *Ukr Bioorg Acta.* 2016; 14(1):24–34
100. Kinoshita T, Sekiguchi Y, Fukada H, Nakaniwa T, Tada T, Nakamura S, et al. A detailed thermodynamic profile of cyclopentyl and isopropyl derivatives binding to CK2 kinase. *Mol Cell Biochem.* 2011;356(1–2):97–105.],
101. Nakaniwa T, Kinoshita T, Sekiguchi Y, Tada T, Nakanishi I, Kitaura K, et al. Structure of human protein kinase CK2 $\alpha$ 2 with a potent indazole-derivative inhibitor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2009 Feb 1;65(2):75–9
102. López-Ramos M, Prudent R, Moucadel V, Sautel CF, Barette C, Lafanechère L, et al. New potent dual inhibitors of CK2 and Pim kinases: discovery and structural insights. *FASEB J.* 2010 Sep 16;24(9):3171–85.

103. Battistutta R, Cozza G, Pierre F, Papinutto E, Lolli G, Sarno S, et al. Unprecedented Selectivity and Structural Determinants of a New Class of Protein Kinase CK2 Inhibitors in Clinical Trials for the Treatment of Cancer. *Biochemistry*. 2011 Oct 4;50(39):8478–88.

104. Dowling JE, Chuaqui C, Pontz TW, Lyne PD, Larsen NA, Block MH, et al. Potent and Selective Inhibitors of CK2 Kinase Identified through Structure-Guided Hybridization. *ACS Med Chem Lett*. 2012 Apr 12;3(4):278–83.

105. Dowling JE, Alimzhanov M, Bao L, Block MH, Chuaqui C, Cooke EL, et al. Structure and Property Based Design of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Inhibitors of CK2 Kinase with Activity in Vivo. *ACS Med Chem Lett*. 2013 Aug 8;4(8):800–5.

106. Cozza G, Girardi C, Ranchio A, Lolli G, Sarno S, Orzeszko A, et al. Cell-permeable dual inhibitors of protein kinases CK2 and PIM-1: structural features and pharmacological potential. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Aug 18;71(16):3173–85.

107. Sekiguchi Y, Nakaniwa T, Kinoshita T, Nakanishi I, Kitaura K, Hirasawa A, et al. Structural insight into human CK2 $\alpha$  in complex with the potent inhibitor ellagic acid. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Jun;19(11):2920–3.

108. Koltun ES, Tshako AL, Brown DS, Aay N, Arcalas A, Chan V, et al. Discovery of XL413, a potent and selective CDC7 inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jun;22(11):3727–31.

109. Protopopov M V., Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzholova VG, et al. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell*. 2017 Aug 31;33(4):291–301.

110. Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc*. 2006 Aug 3;1(2):968–71.

111. Rutkowska E, Pająk K, Józwiak K. Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol Pharm - Drug Res*. 2013;70(1):3–18.

112. Dąbrowska M, Starek M, Skuciński J. Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: A review. *Talanta*. 2011 Oct;86:35–51.



113. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. 178 p.

114. Протопопов МВ, Нипорко ОЮ, Бджола ВГ, Старосила СА, Ярмолюк СМ. Валідація *in silico* методів визначення ліпофільності/розчинності для раціонального дизайну лікарських засобів. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2013; 11: 44–52.

115. Pearlman RS. Molecular Structure Description. The Electrotopological State By Lemont B. Kier (Virginia Commonwealth University) and Lowell H. Hall (Eastern Nazarene College). Academic Press: San Diego. 1999. xx + 245 pp. ISBN 0-12-406555-4. *J Am Chem Soc.* 2000 Jul;122(26):6340–6340.

116. Mannhold R, Poda GI, Ostermann C, Tetko I V. Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of LogP Methods on more than 96,000 Compounds. *J Pharm Sci.* 2009 Mar;98(3):861–93.

117. Wang R, Gao Y, Lai L. Calculating partition coefficient by atom-additive method. *Perspect Drug Discov Des.* 2000;19:47–66.

118. Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, et al. Computation of Octanol–Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *J Chem Inf Model.* 2007 Nov 7;47(6):2140–8.

119. Meylan WM, Howard PH. Estimating log P with atom/fragments and water solubility with log P. *Perspect Drug Discov Des.* 2000;19:67–84.

120. Meylan WM, Howard PH, Boethling RS. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient. *Environ Toxicol Chem.* 1996 Feb;15(2):100–6.

121. Meylan WM, Howard PH. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci.* 1995 Jan;84(1):83–92.

122. Viswanadhan VN, Ghose AK, Revankar GR, Robins RK. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain. *J Chem Inf Model.* 1989 Aug 1;29(3):163–72.

123. Klopman G, Li J-Y, Wang S, Dimayuga M. Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach. *J Chem Inf Model.* 1994 Jul 1;34(4):752–81.

124. Tetko I V., Tanchuk VY, Villa AEP. Prediction of n -Octanol/Water Partition Coefficients from PHYSPROP Database Using Artificial Neural Networks and E-State Indices. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001 Sep;41(5):1407–21.,

125. Tetko I V., Tanchuk VY. Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program. *J Chem Inf Comput Sci.* 2002 Sep;42(5):1136–45.

126. Sushko I, Novotarskyi S, Körner R, Pandey AK, Rupp M, Teetz W, et al. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. *J Comput Aided Mol Des.* 2011 Jun 10;25(6):533–54.

127. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34 (Database issue):D668-72. 16381955. Доступно за посиланням: <https://go.drugbank.com/>

128. Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature.* 2004 Dec 15;432(7019):824–8.

129. Bohacek RS, McMartin C, Guida WC. The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective. *Med Res Rev.* 1996 Jan;16(1):3–50.

130. Gorgulla C, Boeszoermyeni A, Wang Z-F, Fischer PD, Coote PW, Padmanabha Das KM, et al. An open-source drug discovery platform enables ultra-large virtual screens. *Nature.* 2020 Apr 9;580(7805):663–8.

131. Schames JR, Henchman RH, Siegel JS, Sotriffer CA, Ni H, McCammon JA. Discovery of a Novel Binding Trench in HIV Integrase. *J Med Chem.* 2004 Apr;47(8):1879–81.

132. Clark DE. What has virtual screening ever done for drug discovery? *Expert Opin Drug Discov.* 2008 Aug 16;3(8):841–51.

133. MacConnachie AM. Zanamivir (Relenza®) — A new treatment for influenza. *Intensive Crit Care Nurs.* 1999 Dec;15(6):369–70.

134. Glaab E. Building a virtual ligand screening pipeline using free software: a survey. *Brief Bioinform.* 2016 Mar;17(2):352–66.

135. Hopkins AL, Keserü GM, Leeson PD, Rees DC, Reynolds CH. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Feb;13(2):105–21.

136. Protopopov MV, Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell.* 2017 Aug 31;33(4):291–301.

137. Protopopov MV, Volynets GP, Starosyla SA, Vdovin VS, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Identification of 1,3-thiazole-5-carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Protein Kinase CK2. *Curr Enzym Inhib.* 2017;14(2):152–9.

138. Protopopov MV, Ostrynska O V., Starosyla SA, Vodolazhenko MA, Sirko SM, Gorobets NY, Bdzhola VG, Dosenko SM, Yarmoluk SM. 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.

139. Mendez D, Gaulton A, Bento AP, Chambers J, De Veij M, Félix E, et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D930–40.

140. Davies M, Nowotka M, Papadatos G, Dedman N, Gaulton A, Atkinson F, et al. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jul 1;43(W1):W612–20.

141. Biswas A, Maity S, Pan S, Samanta R. Transition Metal-Catalysed Direct C–H Bond Functionalizations of 2-Pyridone Beyond C3-Selectivity. *Chem – An Asian J.* 2020 Jul 16;15(14):2092–109

142. Gonçalves DS, de S. Melo SM, Jacomini AP, J. V. da Silva M, Pianoski KE, Ames FQ, et al. Synthesis of novel 3,5,6-trisubstituted 2-pyridone derivatives and

evaluation for their anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem.* 2020 Jun;28(12):115549.

143. Kulén M, Núñez-Otero C, Cairns AG, Silver J, Lindgren AEG, Wede E, et al. Methyl sulfonamide substituents improve the pharmacokinetic properties of bicyclic 2-pyridone based: *Chlamydia trachomatis* inhibitors. *Medchemcomm.* 2019;10(11):1966–87.

144. Остринська ОВ, Українець ІВ, Сидоренко ЛВ, Старосила ЮА, Протопопов МВ, Кухаренко ОП, Бджола ВГ, Ярмолюк СМ. Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 2-піридону. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2015; 13: 17-25.

145. Rosemeyer H. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem Biodivers.* 2004 Mar;1(3):361–401.

146. Basnet RM, Zizioli D, Guarienti M, Finazzi D, Memo M. Methylxanthines induce structural and functional alterations of the cardiac system in zebrafish embryos. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2017;18(1):72.

147. Han H, Li C, Li M, Yang L, Zhao S, Wang Z, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 8-Mercapto-3,7-Dihydro-1H-Purine-2,6-Diones as Potent Inhibitors of SIRT1, SIRT2, SIRT3, and SIRT5. *Molecules.* 2020 Jun 15;25(12).

148. Luo C, Xie P, Marmorstein R. Identification of BRAF Inhibitors through In Silico Screening. *J Med Chem.* 2008 Oct 9;51(19):6121–7.

149. Jadhav GP, Kaur I, Maryati M, Airhihen B, Fischer PM, Winkler GS. Discovery, synthesis and biochemical profiling of purine-2,6-dione derivatives as inhibitors of the human poly(A)-selective ribonuclease Caf1. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015 Oct 1;25(19):4219–24.

150. Chłoń G, Pawłowski M, Duszyńska B, Szaro A, Tatarczńska E, Kłodzińska AL, et al. Synthesis, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor activity of new 1-phenylpiperazinypropyl derivatives with arylalkyl substituents in position 7 of purine-2,6-dione. *Pol J Pharmacol.* 53(4):359–68.

151. Protopopov MV, Ostrynska O V., Ivanchenko DH, Starosyla SA, Bdzholo VG, Romanenko MI, Yarmoluk SM. Developing of protein kinase CK2 inhibitors based on purine-2,6-diones derivatives. *Ukr Biochem J*. 2017 Oct 25;89(5):32–9.

152. Lagoja I. Pyrimidine as Constituent of Natural Biologically Active Compounds. *Chem Biodivers*. 2005 Jan;2(1):1–50.

153. Camarasa M, De La Bellacasa RP, González ÀL, Ondoño R, Estrada R, Franco S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-(8H)-ones as HCV inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2016;115:463–83.

154. Ghaedi A, Bardajee GR, Mirshokrayi A, Mahdavi M, Akbarzadeh T. Facile access to new pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives. *Mol Divers*. 2019 May 20;23(2):333–40.

155. Lavecchia MJ, Puig de la Bellacasa R, Borrell JI, Cavasotto CN. Investigating molecular dynamics-guided lead optimization of EGFR inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2016 Feb;24(4):768–78.

156. Reddy MVR, Akula B, Cosenza SC, Athuluridivakar S, Mallireddigari MR, Pallela VR, et al. Discovery of 8-Cyclopentyl-2-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3- d ]pyrimidine-6-carbonitrile ( 7x ) as a Potent Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) and AMPK-Related Kinase 5 (ARK5). *J Med Chem*. 2014 Feb 13;57(3):578–99.

157. Palmer BD, Smaill JB, Rewcastle GW, Dobrusin EM, Kraker A, Moore CW, et al. Structure–activity relationships for 2-anilino-6-phenylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones as inhibitors of the cellular checkpoint kinase Wee1. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 Apr;15(7):1931–5.

158. Zheng K, Park CM, Iqbal S, Hernandez P, Park H, LoGrasso P V, et al. Pyridopyrimidinone Derivatives as Potent and Selective c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Apr 9;6(4):413–8.

159. Kraus GA, Gupta V, Mokhtarian M, Mehanovic S, Nilsen-Hamilton M. New effective inhibitors of the Abelson kinase. *Bioorg Med Chem*. 2010 Sep;18(17):6316–21.

160. Goldstein DM, Soth M, Gabriel T, Dewdney N, Kuglstatter A, Arzeno H, et al. Discovery of 6-(2,4-Difluorophenoxy)-2-[3-hydroxy-1-(2-

hydroxyethyl)propylamino]-8-methyl-8 H -pyrido[2,3- d ]pyrimidin-7-one (Pamapimod) and 6-(2,4-Difluorophenoxy)-8-methyl-2-(tetrahydro-2 H -pyran-4-ylamino)pyrido[2,3- d ]pyrimidin-7(8 H )-one (R1487). *J Med Chem.* 2011 Apr 14;54(7):2255–65

161. Jubete G, Puig de la Bellacasa R, Estrada-Tejedor R, Teixidó J, Borrell JI. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones: Synthesis and Biomedical Applications. *Molecules.* 2019 Nov 16;24(22):4161.

162. Zinchenko AN, Muzychka L V., Smolii OB, Bdzhola VG, Protopopov MV, Yarmoluk SM. Synthesis and biological evaluation of novel amino-substituted derivatives of pyrido[2,3-d]pyrimidine as inhibitors of protein kinase CK2. *Biopolym Cell.* 2017 Oct 31;33(5):367–78.

163. Aguilera-Venegas B, Olea-Azar C, Arán VJ, Speisky H. Indazoles: a new top seed structure in the search of efficient drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Future Med Chem.* 2013 Oct;5(15):1843–59.

164. Denya I, Malan SF, Joubert J. Indazole derivatives and their therapeutic applications: a patent review (2013-2017). *Expert Opin Ther Pat.* 2018 Jun 3;28(6):441–53.

165. Wan Y, He S, Li W, Tang Z. Indazole Derivatives: Promising Anti-tumor Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019 Jan 3;18(9):1228–34.

166. Zhang S-G, Liang C-G, Zhang W-H. Recent Advances in Indazole-Containing Derivatives: Synthesis and Biological Perspectives. *Molecules.* 2018 Oct 26;23(11):2783.

167. Scott LJ. Niraparib: First Global Approval. *Drugs.* 2017 Jun 4;77(9):1029–34.

168. Baddam SR, Uday Kumar N, Panasa Reddy A, Bandichhor R. Regioselective methylation of indazoles using methyl 2,2,2-trichloromethylacetimidate. *Tetrahedron Lett.* 2013 Mar;54(13):1661–3.

169. Al-Bogami AS. Mechanochemical synthesis of cyclohexenones and indazoles as potential antimicrobial agents. *Res Chem Intermed.* 2016 Jun 10;42(6):5457–77.

170. Lukashov SS, Kukharenko OP, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Synthesis of 5-amino-3-arylindazole derivatives and study of their in vitro activity towards Ser/Thr and Tyr protein kinases. V International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles», Kharkiv. 2009:P.21

171. Johnson TW, Gallego RA, Edwards MP. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design. *J Med Chem.* 2018 Aug 9;61(15):6401–20.

172. Shultz MD. Setting expectations in molecular optimizations: Strengths and limitations of commonly used composite parameters. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2013;23(21):5980–91.

173. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res.* 2019 Jun;144:19–50.

174. Thomford N, Senthebane D, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018 May 25;19(6):1578.

175. Webster N. Webster's Revised Unabridged Dictionary of the English Language: The Dictionary Proper Being the Authentic Ed. of Webster's International Dictionary of One Thousand Eight Hundred and Ninety, Ed. Under the Supervision of Noah Porter... to which is Now Adde. Porter N, editor. G. & C. Merriam Company; 1913. 2026 p.

176. Bohlin L, Göransson U, Alsmark C, Wedén C, Backlund A. Natural products in modern life science. *Phytochem Rev.* 2010 Jun 7;9(2):279–301.

177. Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys.* 2018 May;646:107–12.

178. Jaisankar P, Gajbhiye RL., Mahato SK, Nandi D. Flavonoid Natural Products: Chemistry and Biological Benefits on Human Health: A Review. *Asian J. of Adv. Basic Sci.:* 3(1), 2014, 164-178

179. Nakanishi I, Murata K, Nagata N, Kurono M, Kinoshita T, Yasue M, et al. Identification of protein kinase CK2 inhibitors using solvent dipole ordering virtual screening. *Eur J Med Chem.* 2015 May;96:396–404.

180. Jagtap S V. Synthesis and biological activities of aurones: A Review. *Int J Pure Appl Biosci.* 2016 Apr 30;4(2):137–55.

181. Protopopov MV, Vdovin VS, Starosyla SA, Borysenko IP, Prykhod'ko AO, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Flavone inspired discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones (aurones) as potent inhibitors of human protein kinase CK2. *Bioorg Chem.* 2020 Sep;102:104062.

182. Goud BS, Panneerselvam K, Zacharias DE, Desiraju GR. 4,6-Dimethyl-2-(4-nitrobenzylidene)-3(2H)-benzofuranone. *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun.* 1995 Feb 15;51(2):265–7.

183. Reddy JS, Ravikumar N, Prasad JV, Krishna GG, Solomon KA. ( Z )-2-(4-Nitrobenzylidene)-1-benzofuran-3(2 H )-one. *Acta Crystallogr Sect E Struct Reports Online.* 2011 Nov 15;67(11):o2961–o2961.

184. Thompson LR, et al. Rapid assessment of a novel series of selective CB2 agonists using parallel synthesis protocols: A Lipophilic Efficiency (LipE) analysis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Aug;19(15):4406–9.

185. Freeman-Cook KD, Hoffman RL, Johnson TW. Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. *Future Med Chem.* 2013 Feb;5(2):113–5.

186. Tsopeles F, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017 Sep 2;12(9):885–96.

187. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004 Dec;1(4):337–41.

188. Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov Today.* 2003 Oct;8(19):876–7.

189. Protopopov M V., Vdovin VS, Lukashov SS, Ostrynska O V., Borysenko IP, Borovykov O V., et al. Evaluation of in vitro activity and SAR study of the novel hetaryl-amino-3-aryl-1H-indazole derivatives as inhibitors of protein kinase CK2. *Biopolym Cell.* 2021 Feb 26;37(1):62–72.



190. 1. Protopopov M V., Vdovin VS, Lukashov SS, Ostrynska O V., Borysenko IP, Borovykov O V., et al. The synthesis of 5-hetarylamino-3-aryl-1H-indazoles as inhibitors of protein kinase CK2. *Biopolym Cell*. 2020 Dec 31;36(6):466–76.

## ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Протопопов МВ**, Нипорко ОЮ, Бджола ВГ, Старосила СА, Ярмолук СМ. 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 LogP та LogS для бази лікарських засобів. Власноруч написано основну частину статті.*

2. **Protopopov MV**, Volynets GP, Starosyla SA, Vdovin VS, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. 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-тіфзол-5-карбоксільних кислот, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

3. **Protopopov MV**, Starosyla SA, Borovykov OV., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzhola VG, Yarmoluk SM. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. Biopolym Cell [Internet]. 2017 Aug 31;33(4):291–301. *Особистий внесок здобувача – докінг, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази CK2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.*

4. Zinchenko AN, Muzychka L V., Smolii OB, Bdzhola VG, **Protopopov MV**, Yarmoluk SM. 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» піридо[2,3-*

*d]*пiримiдинiв, побудова моделi зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальнiй кишенi протеїнкiнази CK2, бiохiмiчне тестування. Власноруч написано частину статтi з описом методик та обговорення результатiв молекулярного моделювання та бiохiмiчного тестування.

5. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Starosyla SA, Vodolazhenko MA, Sirko SM, Gorobets NY, Bdzhola VG, Dosenko SM, Yarmoluk SM. 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 – докинг, аналіз залежності «хімічна структура – інгiбувальна активність» дигiдробензо[4,5]iмiдазо[1,2-a]пiримiдин-4-онiв, побудова моделi зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальнiй кишенi протеїнкiнази CK2, бiохiмiчне тестування. Власноруч написано основну частину статтi.*

6. **Protopopov MV**, Ostrynska O V., Ivanchenko DH, Starosyla SA, Bdzhola VG, Romanenko MI, Yarmoluk SM. 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 – докинг, аналіз залежності «хімічна структура – інгiбувальна активність» пурин-2,6-дiонiв, побудова моделi зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальнiй кишенi протеїнкiнази CK2, бiохiмiчне тестування. Власноруч написано основну частину статтi.*

7. Остринська ОВ, Українець ІВ, Сидоренко ЛВ, Старосила ЮА, **Протопопов МВ**, Кухаренко ОП, Бджола ВГ, Ярмолюк СМ. Пошук нових iнгiбиторiв протеїнкiнази CK2 серед похiдних 2-пiридону. Ukr. Bioorg. Acta. 2015; 13: 17-25. *Особистий внесок здобувача – докинг, аналіз залежності «хімічна структура – інгiбувальна активність» 2-пiридону, побудова моделi зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальнiй кишенi протеїнкiнази CK2, бiохiмiчне тестування. Власноруч написано основну частину статтi.*

8. **Protopopov MV**, Vdovin VS, Starosyla SA, Borysenko IP, Prykhod'ko AO, Lukashov SS, Bilokin YV, Bdzhola VG, Yarmoluk SM. 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» бензиліденбензофуран-3(2H)-онів, побудова моделі зв'язування сполук в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2, біохімічне тестування. Власноруч написано основну частину статті.

### Тези наукових доповідей на конференціях

1. **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.

2. **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.

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

4. **Protopopov M**, Vdovin V., Lukashov S., Bilokin Y., Kachaput N., Bdzholo 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.

5. **Protopopov MV**, Lukashov S.S., Ostrynska O.V., Starosyla S.A., Vdovin V.S., Kukharenko O.P., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M. The synthesis and evaluation of 5-amino-3-phenylindazole as inhibitors of protein kinase CK2. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль.

6. **Protopopov M.V.**, Vdovin V.S., Lukashov S.S., Starosyla S.A., Bdzholo V.H., Yarmoluk S.M. Aurones as human protein kinase CK2 inhibitors. XVI

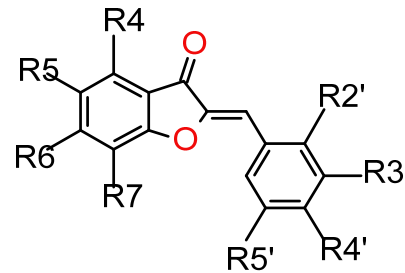
International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology», 2020, Lviv.

7. **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.

## ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1.

Структура, *in vitro* інгібувальна активність відносно СК2 та значення параметрів CLogP та CLipE похідних аурону



Спол.	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>2'</sup>	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>	R <sup>5'</sup>	IC <sub>50</sub> , мкМ	CLogP	CLipE
6.1	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	n/d	4,5	n/d
6.2	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	H	H	n/d	4,5	n/d
6.3	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H	n/d	4,5	n/d
6.4	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl	OH	H	0,2	5,2	1,5
6.5	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl	OH	OCH <sub>3</sub>	n/d	5,2	n/d
6.6	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	Br	OH	Br	n/d	6	n/d
6.7	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	4,5	n/d

Продовж. табл. Б.1.

6.9	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	OH	H	n/d	4,3	n/d
6.10	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	Br	OH	H	n/d	5,3	n/d
6.11	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	n/d	4,4	n/d
6.12	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	n/d	5,3	n/d
6.13	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	n/d	4,4	n/d
6.14	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	n/d	4,4	n/d
6.15	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	H	n/d	4,4	n/d
<b>6.16 (BFO1)</b>	H	Cl	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	0,055	4,2	3,06
6.17	H	Cl	H	Cl	H	OH	H	H	n/d	4,2	n/d
6.18	H	Cl	H	Cl	H	H	OH	H	n/d	4,2	n/d
<b>6.19 (BFO2)</b>	H	Cl	H	Cl	H	Cl	OH	H	0,0035	4,9	3,56
6.20	H	Cl	H	Cl	H	Cl	OH	OCH <sub>3</sub>	0,12	4,9	2,02
6.21	H	Cl	H	Cl	H	Cl	OH	Cl	0,1	5,6	1,4
6.22	H	Cl	H	Cl	H	Br	OH	Br	0,06	5,7	1,52
6.23	H	Cl	H	Cl	OH	H	OH	H	n/d	4	n/d
6.24	H	Cl	H	Cl	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	4,2	n/d

Продовж. табл. Б.1.

6.25	H	Cl	H	Cl	H	H	COOH	H	n/d	4,1	n/d
6.26 (BFO3)	H	Cl	H	Cl	H	Br	OH	H	0,0063	5	3,2
6.27 (BFO4)	H	Cl	H	Cl	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	0,0079	4,1	4
6.28	H	Cl	H	Cl	H	COOH	OH	H	n/d	3,9	n/d
6.29 (BFO5)	H	Cl	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	0,0035	5	3,46
6.30	H	Cl	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	n/d	4,1	n/d
6.31	H	Cl	H	Cl	H	OH	OH	NO <sub>2</sub>	0,1	3,9	3,1
6.32	Cl	H	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	0,06	4,2	3,02
6.33	Cl	H	H	Cl	H	OH	H	H	n/d	4,2	n/d
6.34	Cl	H	H	Cl	H	H	OH	H	n/d	4,2	n/d
6.35 (BFO6)	Cl	H	H	Cl	H	Cl	OH	H	0,004	4,9	3,5
6.36	Cl	H	H	Cl	H	Cl	OH	OCH <sub>3</sub>	n/d	4,9	n/d
6.37	Cl	H	H	Cl	H	Cl	OH	Cl	0,1	5,6	1,4
6.38	Cl	H	H	Cl	H	Br	OH	Br	0,12	5,7	1,22
6.39	Cl	H	H	Cl	OH	H	OH	H	n/d	4	n/d
6.40	Cl	H	H	Cl	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	4,2	n/d
6.41	Cl	H	H	Cl	H	H	COOH	H	n/d	4,1	n/d



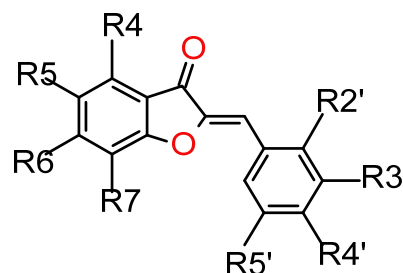
*Продовж. табл. Б.1.*

6.42	Cl	H	H	Cl	H	OH	OH	H	0,257	4	2,59
6.43 <b>(BFO7)</b>	Cl	H	H	Cl	H	Br	OH	H	0,004	5	3,4
6.44 <b>(BFO8)</b>	Cl	H	H	Cl	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	0,03	4,1	3,42
6.45	Cl	H	H	Cl	H	COOH	OH	H	0,25	3,9	2,7
6.46	Cl	H	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	n/d	5	n/d
6.47	Cl	H	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	0,018	4,1	3,64
6.48	Cl	H	H	Cl	H	OH	OH	NO <sub>2</sub>	0,15	3,9	2,92
6.49	Cl	H	H	Cl	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	1,38	4,1	1,76
6.50	Cl	H	H	Cl	NO <sub>2</sub>	H	H	OH	n/d	4,1	n/d
6.51	Cl	H	H	Cl	NO <sub>2</sub>	OH	H	H	1,1	4,1	1,8

## ДОДАТОК В

Таблиця В.1.

Структура, *in vitro* інгібувальна активність відносно СК2 та значення параметрів CLogP та CLipE похідних аурону після оптимізації ліпофільної ефективності



Спол.	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>2'</sup>	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>	R <sup>5'</sup>	IC <sub>50</sub> , мкМ	CLogP	CLipE
6.52	H	Br	H	H	H	H	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.53 (BFO9)	H	Br	H	H	H	Cl	OH	H	0,058	4,3	2,94
6.54	H	Br	H	H	H	Cl	OH	OC H <sub>3</sub>	0,35	4,3	2,16
6.55	H	Br	H	H	H	Cl	OH	Cl	0,25	5	1,6
6.56	H	Br	H	H	H	Br	OH	Br	0,35	5,2	1,26
6.57	H	Br	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	3,6	n/d

Продовж. табл. В.1.

6.58	H	Br	H	H	H	H	COOH	H	n/d	3,5	n/d
6.59	H	H	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	n/d	3,5	n/d
6.60	H	H	H	Cl	H	OH	H	H	n/d	3,6	n/d
6.61	H	H	H	Cl	H	H	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.62	H	H	H	Cl	H	Cl	OH	H	n/d	4,2	n/d
6.63	H	H	H	Cl	H	Cl	OH	Cl	0,08	4,9	2,2
6.64	H	H	H	Cl	H	Br	OH	Br	n/d	5,1	n/d
6.65	H	H	H	Cl	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	3,5	n/d
6.66	H	H	H	Cl	H	H	COOH	H	n/d	3,4	n/d
6.67	H	H	H	Cl	H	OH	OH	H	n/d	3,3	n/d
<b>6.68 (BFO10)</b>	H	H	H	Cl	H	Br	OH	H	0,0036	4,3	4,14
<b>6.69 (BFO11)</b>	H	H	H	Cl	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	0,006	3,5	4,72
6.70	H	H	H	Cl	H	COOH	OH	H	n/d	3,2	n/d
6.71	H	H	H	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	0,03	3,4	4,12
6.72	H	H	H	Cl	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	n/d	3,5	n/d
6.73	H	Cl	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	n/d	3,5	n/d
6.74	H	Cl	H	H	H	OH	H	H	n/d	3,6	n/d

6.75	H	Cl	H	H	H	H	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.76	H	Cl	H	H	H	Cl	OH	H	n/d	4,2	n/d
6.77	H	Cl	H	H	H	Cl	OH	Cl	n/d	4,9	n/d
6.78	H	Cl	H	H	H	Br	OH	Br	0,51	5	1,29
6.79	H	Cl	H	H	OH	H	OH	H	n/d	3,3	n/d
6.80	H	Cl	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	3,5	n/d
6.81	H	Cl	H	H	H	H	COOH	H	n/d	3,4	n/d
6.82	H	Cl	H	H	H	OH	OH	H	0,44	3,3	3,06
6.83	H	Cl	H	H	H	Br	OH	H	n/d	4,3	n/d
6.84	H	Cl	H	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	n/d	3,5	n/d
6.85	H	Cl	H	H	H	COOH	OH	H	n/d	3,2	n/d
6.86	H	Cl	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	n/d	4,3	n/d
6.87	H	Cl	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	n/d	3,4	n/d
6.88	H	Cl	H	H	H	OH	OH	NO <sub>2</sub>	n/d	3,2	n/d
6.89	H	Cl	H	H	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	n/d	3,5	n/d
6.90	H	Cl	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	OH	n/d	3,5	n/d
6.91	H	Cl	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	H	n/d	3,5	n/d

Продовж. табл. В.1.

6.92	H	H	H	Br	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	0,03	3,6	3,92
6.93	H	H	H	Br	H	OH	H	H	n/d	3,6	n/d
6.94	H	H	H	Br	H	H	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.95	H	H	H	Br	H	Cl	OH	H	n/d	4,3	n/d
6.96	H	H	H	Br	H	H	COOH	H	n/d	3,5	n/d
<b>6.97 (BFO12)</b>	H	H	H	Br	H	Br	OH	H	0,0033	4,4	4,08
<b>6.98 (BFO13)</b>	H	H	H	Br	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	0,0036	3,5	4,94
6.99	H	H	H	Br	H	COOH	OH	H	n/d	3,3	n/d
6.100	H	H	H	Br	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	0,09	3,5	3,55
6.101	H	H	H	Br	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	n/d	3,5	n/d
6.102	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	n/d	2,9	n/d
6.103	H	H	H	H	H	OH	H	H	n/d	2,9	n/d
6.104	H	H	H	H	H	H	OH	H	n/d	2,9	n/d
6.105	H	H	H	H	H	Cl	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.106	H	H	H	H	H	Cl	OH	OCH <sub>3</sub>	n/d	3,5	n/d
6.107	H	H	H	H	H	Cl	OH	Cl	n/d	4,2	n/d
6.108	H	H	H	H	H	Br	OH	Br	0,55	4,4	1,86

Продовж. табл. В.1.

6.109	H	H	H	H	OH	H	OH	H	n/d	2,7	n/d
6.110	H	H	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	2,9	n/d
6.111	H	H	H	H	H	H	COOH	H	n/d	2,8	n/d
6.112	H	H	H	H	H	OH	OH	H	n/d	2,7	n/d
6.113	H	H	H	H	H	Br	OH	H	n/d	3,6	n/d
6.114	H	H	H	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	n/d	2,8	n/d
6.115	H	H	H	H	H	COOH	OH	H	n/d	2,5	n/d
6.116	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	n/d	3,6	n/d
6.117	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	0,38	2,8	3,62
<b>6.118 (BFO14)</b>	H	H	H	H	H	OH	OH	NO <sub>2</sub>	0,191	2,5	4,22
6.119	H	H	H	H	H	OH	NO <sub>2</sub>	H	n/d	2,8	n/d
6.120	H	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	OH	n/d	2,8	n/d
6.121	H	H	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	H	n/d	2,8	n/d
6.122	H	H	OH	H	H	OH	H	H	n/d	2,7	n/d
6.123	H	H	OH	H	H	Cl	OH	H	n/d	3,3	n/d
6.124	H	H	OH	H	H	Cl	OH	OCH <sub>3</sub>	n/d	3,3	n/d
6.125	H	H	OH	H	H	Cl	OH	Cl	n/d	4	n/d

Продовж. табл. В.1.

6.126	H	H	OH	H	H	Br	OH	Br	n/d	4,1	n/d
6.127	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	n/d	2,4	n/d
6.128	H	H	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	n/d	2,6	n/d
6.129	H	H	OH	H	H	Br	OH	H	n/d	3,4	n/d
6.130	H	H	OH	H	H	COOH	OH	H	n/d	2,3	n/d
6.131	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	0,54	3,4	2,87
6.132	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NO <sub>2</sub>	n/d	2,5	n/d
<b>6.133 (BFO15)</b>	H	H	OH	H	H	NO <sub>2</sub>	OH	H	0,059	2,5	4,73
6.134	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	n/d	3,1	n/d
6.135	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	H	0,47	3,1	3,36
6.136	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	Br	OH	H	n/d	3,9	n/d
6.137	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Br	n/d	3,9	n/d