

## Пошук нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу

О.В. Остринська, В.Г. Бджола, О.П. Кухаренко, С.М. Ярмолюк\*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

**Резюме.** Робота присвячена пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу за допомогою методу рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу. Інгібувальні властивості сполук підтверджено за допомогою біохімічних тестів *in vitro*. Встановлено, що всі досліджувані сполуки цього класу пригнічували активність ензиму зі значенням  $IC_{50}$  у межах 0,2–24,5  $\mu$ M. Встановлено залежність «хімічна структура — інгібувальна активність» похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу і запропоновано спосіб їх зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2.

**Ключові слова:** протеїнкіназа СК2, похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, інгібітор, докінг, пухлиноутворення.

**Вступ.** Протеїнкіназа СК2 — висококонсервативна, убіквістична серин/треонінова протеїнкіназа, яка задіяна в регуляції великої кількості біохімічних функцій та інтеграції практично всіх шляхів внутрішньоклітинного сигналіну [1].

Доведено, що зміни в рівні експресії цього ензиму є причиною виникнення низки захворювань, включаючи нейродегенеративні патології (хвороба Альцгеймера і Паркінсона), запальні процеси, серцево-судинні захворювання, вірусні й паразитарні інфекції [2]. Окрім того, СК2 відіграє вирішальну роль у розвитку низки пухлин: аденокарциноми легень, раку молочної залози, простати, мозку, нирок, меланоми та колоректальної карциноми [3].

Активний пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 як перспективних лікарських препаратів проти низки захворювань триває вже понад 20 років [5]. Проте лише одна сполука СХ-4945

дійшла до першої стадії клінічних досліджень. Відомо, що цей інгібітор пригнічує здатність до виживання та ангіогенні сигнальні шляхи в лініях ракових клітин, а також проявляє протипухлинну активність на мишачих ксенотрансплантатах. Протипухлинний механізм дії СХ-4945 пов'язаний із пригніченням внутрішньо- і позаклітинних СК2-залежних процесів, які необхідні для підтримування фенотипу ракових клітин [6].

Основним завданням цієї роботи був пошук нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу. Поставлене завдання вирішували за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу комбінаторної бібліотеки, що налічувала 150 000 органічних сполук з подальшою оцінкою активності обраних інгібіторів на рекомбінантному білку СК2.

**Матеріали і методи.** Для рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу використано пакет DOCK 4.0 [7–10]. Молекулярний докінг проводили, як описано в роботі [11].

\* Corresponding author.

Tel.: +38044-5222458

E-mail address: yarmolyuksm@gmail.com

**Визначення ступеня інгібування активності СК2.** Вимірювання активності кінази в присутності синтетичних сполук проводили методом непрямой детекції (ATP consumption) [12]. Залишкові концентрації АТФ визначали за допомогою люциферазної суміші (Easy Light kit, PerkinElmer) за інтенсивністю люмінесценції, яку вимірювали на люмінометрі (Perkin Elmer VICTOR 1420-50 Multilabel Counter).

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 ml і включав 3 ml 10x буфера для СК2 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>); 3 ml (6 mg) пептидного субстрату RRRDDSDDD (New England Biolabs); 0,02 ml (10 одиниць) рекомбінантної протеїнкінази СК2 (New England Biolabs); 14 ml дистильованої води. Аліквоти реакційної суміші 19 ml/пробу поміщали в лунки планшета (Optiplate 96, Perkin Elmer, Cat #6005290). До кожної проби додавали 1 ml розчину інгібітора, попередньо розчиненого в DMSO, у необхідній концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 ml 22,5 mM АТФ. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 7,5 mM. Після інкубації, що тривала 25 хв при 30 °С, у кожну лунку додавали 30 ml люциферазної суміші («EasyLight» kinase, Perkin Elmer), що одночасно зупиняла кіназу і починала люциферазну реакцію із залишковим АТФ. Планшет перенесли в люмінометр (Perkin Elmer Multilabel Counter, Victor3) і проводили вимірювання рівня люмінесценції за протоколом програми приладу (1 с на пробу) [13]. Як негативний контроль використовували DMSO в кількості, що дорівнювала об'єму розчину інгібітора в DMSO (3,8 %).

Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням інтенсивності рівня люмінесценції у пробах із DMSO (100 % активності кінази, 0 % залишкового АТФ) із пробами, що містили інгібітор. Проби, в яких інтенсивність люмінесценції була істотно вищою за контроль (на 50-400 %), вважали такими, де кіназу активність пригнічено. Для сполук, що знаходилися в цих пробах, визначали IC<sub>50</sub> шляхом встановлення активності ферменту за різних концентрацій інгібітора. Діапазон концентрації сполуки для встановлення IC<sub>50</sub> обирали залежно від залишкової активності ензиму. Інгібітор перевіряли при 10 концентраціях, отриманих шляхом дво-

кратного розведення. Визначали показники лічильника для кожної концентрації інгібітора і будували залежність у координатах десятичного логарифма концентрації інгібітора (lg[I]) та cps (counts per second). Для середнього значення cps знаходили обернений логарифм концентрації, який дорівнював IC<sub>50</sub>.

**Результати й обговорення.** У роботі проведено пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 за допомогою методу рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу. Для скринінгу було використано бібліотеку, яка налічувала 150 000 низькомолекулярних органічних сполук і мала значну диверсійність. Докінг сполук проводили в АТФ-зв'язувальну кишеню протеїнкінази СК2 людини. У результаті скринінгу було знайдено декілька перспективних класів сполук. Особливу увагу привернули похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу, оскільки вони проявляють різнопланову фармакологічну активність і мають значний протипухлинний потенціал [14]. Комплекси похідних із кіназою, отримані за допомогою програми DOCK 4.0, проаналізовано за показниками енергії зв'язування лігандів із рецептором. Додатково проведено візуальну оцінку положення отриманих сполук в АТФ-зв'язувальному сайті СК2. Сім сполук, які мали найменшу енергію взаємодії (< -35 кДж/моль) і були комплементарними до активної кишені ензиму, було відібрано для біохімічного тестування.

Дослідження *in vitro* було проведено за допомогою методу непрямой детекції протеїнкіназної активності [12]. У результаті біохімічних експериментів встановлено, що всі відібрані похідні 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу інгібують активність кінази при концентрації інгібітора 33 μM більш ніж на 50 %. Величина IC<sub>50</sub> протестованих сполук знаходилася в межах 0,2-24,5 μM (табл. 1). Найактивнішою виявилась сполука **ТТТ5** — 8,10-дигбро-мо-2,6-диоксо-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-7-оксо-1,4-дитіа-3-аза-циклопента[с]фенантрен-5-карбоксилова кислота. Її IC<sub>50</sub> становила 0,2 μM.

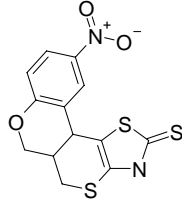
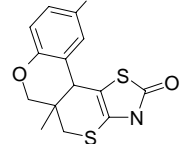
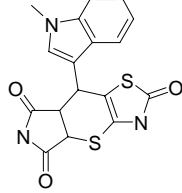
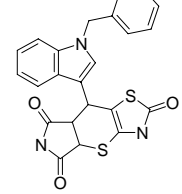
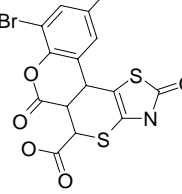
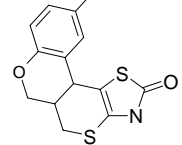
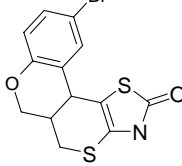
Проведений аналіз залежності «хімічна структура — інгібувальна активність» похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу показав, що найбільший вплив на активність сполук мають замісники, які збільшують за-

гальний розмір молекули. При порівнянні активності похідних **ТТТ3** і **ТТТ4** видно, що заміна метильного залишку в індольному гетероциклі на бензил погіршує активність сполуки у 8 разів ( $IC_{50}$  становить 3,1 і 24,5  $\mu\text{M}$  відповідно). Заміна атома Хлору сполуки **ТТТ6** на більший за розмірами атом Броду (сполука **ТТТ7**) теж призводить до зменшення інгібувальної активності. Ці речовини інгібували ензим зі значенням  $IC_{50}$  0,7 і 2,5  $\mu\text{M}$  відповідно. Проте наявність додаткового метильного радикалу в положенні 5а фенантренового гетероциклу сполуки **ТТТ2** ( $IC_{50}$  = 1,5  $\mu\text{M}$ ), на відміну від **ТТТ7** ( $IC_{50}$  = 2,5  $\mu\text{M}$ ), не вела до значної зміни активності інгібітора.

З метою з'ясування впливу окремих замісників на активність сполук було отримано їх комплекси із білком за допомогою молекулярного докінгу (рис. 1, 2). Аналіз комплексів *in silico* показав, що стабілізації сполук в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 сприяє низка гідрофобних контактів і водневих зв'язків. Гідрофобні взаємодії виникають між лігандом та амінокислотними залишками Met163, Val53, Val66, Ile174 і Phe113. Варто зазначити, що контакт із Phe113 реалізується за типом стекінг-взаємодії. Усі досліджувані сполуки утворюють водневий зв'язок із Lys68, що знаходиться в глибині сайту зв'язування. За літературними даними, ця амінокислота є однією з ключових для взаємодії з лігандом, а утворення водневого зв'язку за її участі є основною передумовою для прояву високої інгібувальної властивості речовини [15]. Так, водневий зв'язок виникає між атомом Оксигену карбонільної групи гетероциклу лігандів або Сульфуру, у випадку сполуки **ТТТ1**, та аміногрупою бічного ланцюга Lys68. Сполуки **ТТТ3** і **ТТТ4** утворюють додатковий водневий зв'язок за участі атома Нітрогену піроло-тіопірано-тіазолового циклу з Оксигеном карбонільної групи Leu45. Незважаючи на додатковий водневий зв'язок, ці інгібітори виявили найменшу інгібувальну активність по відношенню до СК2. Цей факт можна пояснити іншим положенням в АТФ-зв'язувальному сайті, яке спричинене більшим розміром молекули ліганду і, як наслідок, призводить до зникнення стекінг-взаємодії з Phe113 і до порушення гідрофобних контактів із Met163 та Val66.

Таблиця 1

Хімічна структура похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолу та їх інгібувальна активність ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{M}$ )

Назва	Хімічна структура	$IC_{50}$ , $\mu\text{M}$
ТТТ1		1
ТТТ2		1,5
ТТТ3		3,1
ТТТ4		24,5
ТТТ5		0,2
ТТТ6		0,7
ТТТ7		2,5

Найкраща інгібувальна активність сполуки **ТТТ5**, вірогідно, зумовлена міцнішими гідрофобними контактами ліганду з Met163 і Ile174 завдяки наявності в молекулі двох атомів Броду.

Отже, для прояву інгібувальних властивостей сполук найбільш важливими є їх взаємодії

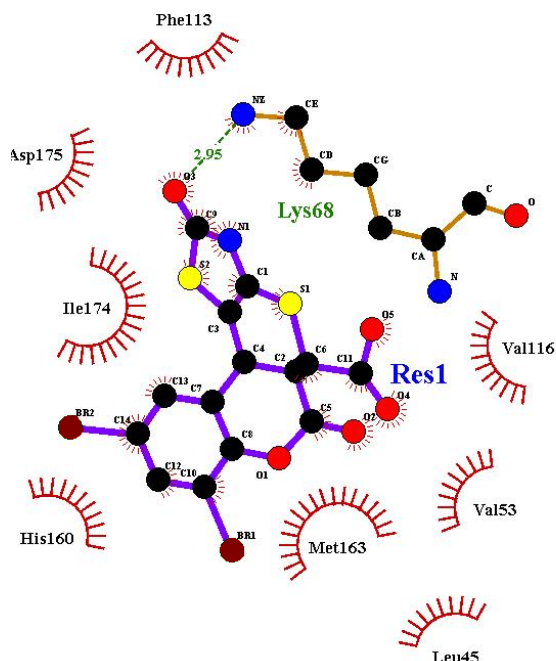


Рис. 1. Схематичне зображення типу зв'язування сполуки **TTT5** з активним сайтом протеїнкінази **CK2**. Дані отримано за допомогою молекулярного докінгу. Міжмолекулярні водневі зв'язки позначено пунктирними лініями. Атоми Карбону зображено чорними кружечками, атоми Оксигену — червоними, атоми Сульфуру — жовтими, атоми Нітрогену — синіми, атому Брому — коричневими.

з унікальними залишками Val66, Met163 та Ile174, що відповідають за зменшення величини активного сайту **CK2** і відіграють критичну роль при зв'язуванні ліганду з протеїном [16]. Додатковій стабілізації комплексу «інгібітор-ензим» сприяє стекинг із Phe113.

**Висновки.** Виявлено дві сполуки з інгібувальною активністю стосовно **CK2** із  $IC_{50}$  мен-

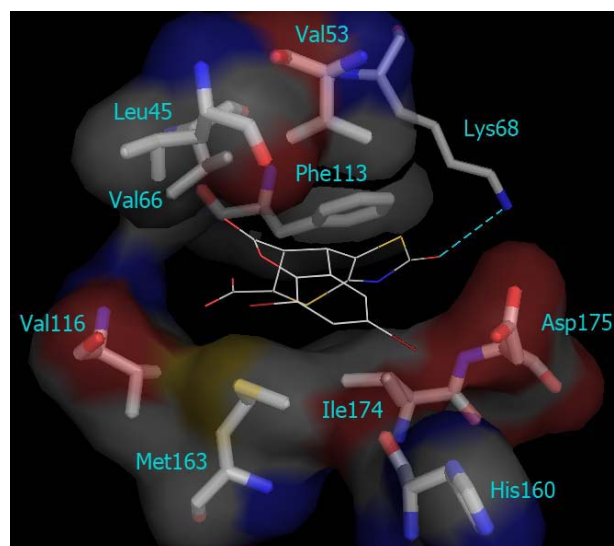


Рис. 2. Тип зв'язування сполуки **TTT5** в АТФ-акцепторному сайті, отриманий методом молекулярного докінгу. Міжмолекулярні водневі зв'язки позначено пунктирними лініями.

ше 1  $\mu\text{M}$ : 8,10-дибромо-2,6-диоксо-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-7-окса-1,4-дитіа-3-аза-циклопента[с]фенантрен-5-карбоксильна кислота ( $IC_{50}=0,2 \mu\text{M}$ ) і 10-хлоро-3,5а,6,11b-тетрагідро-5Н-7-окса-1,4-дитіа-3-аза-циклопента[с]фенантрен-2-он ( $IC_{50}=0,7 \mu\text{M}$ ). Запропоновано тип зв'язування лігандів з активним сайтом **CK2**, що дає змогу пояснити їх активність. Здобуті результати можуть бути основою для подальшого пошуку низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази **CK2** серед структурних аналогів похідних 3,4,5,6-тетрагідротіопірано-[2,3-d]тіазолу.

Надійшла в редакцію 14.11.2012 р.

#### Search of new low-molecular protein kinase **CK2** inhibitors among 3,4,5,6-tetrahydropirano[2,3-d]thiazole derivatives

O.V. Ostrynska, V.G. Bdzhola, A.P. Kukharenko, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine

**Summary.** This article is about search of new protein kinase **CK2** inhibitors among 3,4,5,6-tetrahydropirano[2,3-d]thiazole derivatives by receptor-based virtual screening method. Compounds inhibitory activity was confirmed by biochemical tests *in vitro*. All inhibitors has  $IC_{50}$  values in the range of 0,2 to 24,5  $\mu\text{M}$ . The structure-activity relationship of 3,4,5,6-tetrahydropirano[2,3-d]thiazole derivatives was investigated and the binding modes of their interaction with protein kinase **CK2** ATP-acceptor site were proposed.

**Keywords:** protein kinase **CK2**, 3,4,5,6-tetrahydropirano[2,3-d]thiazole derivatives, inhibitor, docking, tumor.

## Перелік літератури

1. Волинець Г.П., Голуб А.Г., Бджола В.Г., Ярмолюк С.М. Роль протеїнкінази CK2 у процесах онкогенезу, регуляції апоптозу та стресової відповіді клітини // *Ukrainica Bioorganica Acta*. — 2007. — № 2. — С. 25-32.
2. Guerra B., Issinger O-G. Protein kinase CK2 in human diseases // *Current Medicinal Chemistry*. — 2008. — No. 15. — P. 1870-1886.
3. Tawfic S., Yu S., Wang H., Faust R., Davis A., Ahmed K. Protein kinase CK2 signal in neoplasia // *Histol. Histopathol.* — 2001. — Vol. 16. — P. 573-582.
4. Ahmad K.A., Harris N.H., Johnson A.D., Lindvall H.C., Wang G., Ahmed K. Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells // *Mol Cancer Ther.* — 2007. — Vol. 6, No. 3. — P. 1006-1012.
5. Sarno S., Papinutto E., Franchin C., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierzczuk Z., Orzeszko A., Zanutti G., Battistutta R. and Pinna L.A. ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. — 2011. — No. 11. — P. 1340-1351.
6. Pierre F., Chua P.C., O'Brien S.E., Siddiqui-Jain A., Bourbon P., Haddach M., Michaux J., Nagasawa J., Schwabe M.K., Stefan E., Vialettes A., Whitten J.P., Chen T.K., Darjania L., Stansfield R., Bliesath J., Drygin D., Ho C., Omori M., Proffitt C., Streiner N., Rice W.G., Ryckman D.M., Anderes K. Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer // *Mol. Cell Biochem.* — 2011. — Vol. 356, No. 1-2. — P. 37-43.
7. Shoichet B.K., Stroud R.M., Santi D.V., Kuntz I.D., Perry K.M. Structurebased discovery of inhibitors of thymidylate synthase // *Science*. — 1993. — No. 259. — P. 1445-1450.
8. Bodian D.L., Yamasaki R.B., Buswell R.L., Stearns J.F., White J.M., Kuntz I.D. Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones // *Biochemistry*. — 1993. — No. 32. — P. 2967-2978.
9. Ring C.S., Sun E., McKerrow J.H., Lee G.K., Rosenthal P.J., Kuntz I.D., Cohen F.E. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1993. — No. 90. — P. 3583-3587.
10. Ewing T.J., Makino S., Skillman A.G., Kuntz I.D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases // *J. Comput. Aided Mol. Des.* — 2001. — No. 15. — P. 411-428.
11. Golub A.G., Yakovenko O. Ya., Prykhod'ko A.O., Lukashov S.S., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M. Evaluation of 4,5,6,7-tetrahalogeno-1H-isoindole-1,3(2H)-diones as inhibitors of human protein kinase CK2 // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2008. — No. 1784. — P. 143-149.
12. Koresawa M., Okabe T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase // *Assay Drug Dev Technol.* — 2004. — Vol. 2, No. 2. — P. 153-160.
13. Tamaoki T. Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors // *Methods in Enzymology*. — 1991. — No. 201. — P. 340-347.
14. Крицишин А.П., Зіменковський Б.С., Запрутко Луціюш, Лесик Р.Б. Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних 3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолу // *Орг. та фарм. хімії*. — 2010. — Т. 8, Вип. 1(29). — С. 37-43.
15. Sarno S., Salvi M., Battistutta R., Zanutti G., Pinna L.A. Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2005. — Vol. 1754, Iss. 1-2. — P. 263-270.
16. Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanutti G., Pinna L.A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetra-bromobenzotriazole // *Protein Sci.* — 2001. — No. 10. — P. 2200-2206.