

УДК 547.781

Дослідження інгібувальної активності похідних імідазолону та їх нециклічних попередників по відношенню до протеїнкінази СК2 людини

В.М. Наумчук, Г.П. Волинець, О.Б. Горбатюк,
С.С. Лукашов, В.Г. Бджола, С.М. Ярмолюк*

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

Резюме. Проведено тестування інгібувальної активності похідних імідазолону та їх попередників по відношенню до протеїнкінази СК2. Знайдено сім інгібіторів СК2 зі значеннями IC_{50} у діапазоні від 8 до 30 μ M.

Ключові слова: імідазолони, протеїнкіназа СК2, інгібітор.

Вступ. Похідні імідазолону проявляють низку біологічних активностей, зокрема, експериментально показано, що вони володіють протираковими [1] та антибактеріальними [2] властивостями.

У низці досліджень продемонстровано, що похідні імідазолону ефективно інгібують протеїнкінази HGFR (hepatocyte growth factor receptor) [3] і BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1) [4], а також інші ензими, зокрема DPP4 (dipeptidyl peptidase 4) [5], COX-2 (cyclooxygenase 2) [6], TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme) [7], PDE4 (фосфодіестеразу 4) [8] та ін.

Протеїнкіназа СК2 відіграє центральну роль у регуляції сигнальних шляхів клітини, задіяних у проліферації, трансформації, апоптозі та старінні клітин [9]. СК2 є ключовим компонентом регуляторної мережі протеїнкіназ, залученої в низку аспектів онкогенезу. Також було показано, що протеїнкіназа СК2

активує і пригнічує експресію важливих онкогенів та супресорів пухлин, а її експресія і активність надрегульовані фактично при всіх типах раку. Нещодавні дослідження продемонстрували роль СК2 в регуляції епітеліально-мезенхімного переходу, що є раннім етапом у метастазуванні пухлин [10].

Таким чином, високоактивні й селективні інгібітори СК2 в далекоглядній перспективі можуть бути основою лікарських засобів для терапевтичного втручання при онкологічних захворюваннях.

Раніше нами було виявлено високу інгібувальну активність похідних 3-арил-5-аміноіндазолу стосовно протеїнкінази СК2 [11]. Суттєвим обмеженням для застосування цих похідних була їх низька розчинність у воді, тому з метою її збільшення ми спробували дослідити суміжні гетероциклічні системи, зокрема похідні імідазолону. Нами було синтезовано низку похідних імідазолону різноманітної структури [12]. У цій роботі досліджено інгібувальну дію по відношенню до протеїнкінази СК2 отриманих сполук, а також відповідних нециклічних напівпродуктів.

Результати й обговорення. З метою визна-

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5222458

E-mail address: yarmolyuksm@gmail.com

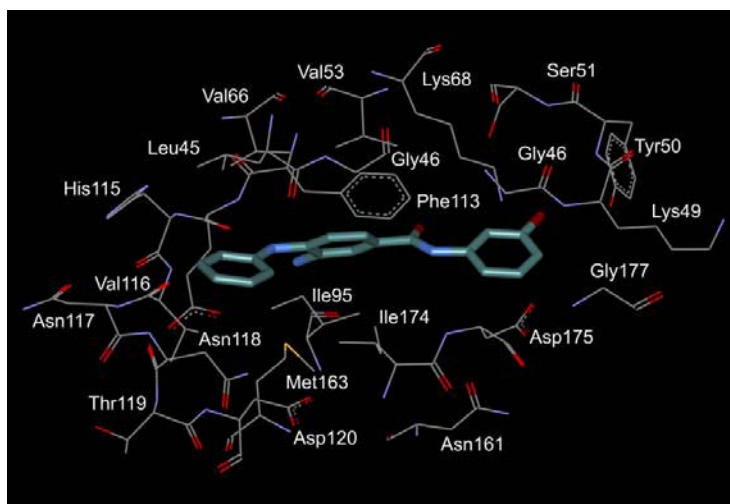


Рис. 1. Комплекс сполуки **12** з амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2, отриманий за допомогою молекулярного докінгу

чення ефективності похідних імідазолону як нових інгібіторів протеїнкінази СК2 людини було проведено тестування з використанням люциферазної реакції похідних імідазолону та їх синтетичних попередників, синтезованих нами раніше [12]. Залишкову активність СК2 визначали при концентрації інгібітора 10 μM . Для семи найперспективніших сполук (**9**, **11**, **12**, **17**, **19**, **20**, **21**) встановлювали значення IC_{50} , що знаходилися в діапазоні від 8 до 30 μM . Хімічні структури досліджуваних сполук і результати тестування наведено в табл. 1.

Похідні з невеликою молекулярною вагою не виявили високої афінності і, відповідно, не продемонстрували низьких значень залишкової активності.

Утворення індазольного циклу, як виявилося, не вело до збільшення активності порівняно з нециклічними попередниками. Мікромолярні значення IC_{50} , що спостерігалися для деяких сполук, вірогідно, пов'язані з наявністю в їхньому складі фрагментів 3-амінофенолу в 6-аміноіндазолі, що трапляються в складі відомих інгібіторів інших протеїнкіназ.

Для передбачення типу зв'язування похідних імідазолону та їх попередників з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені СК2 було проведено докінг тестованих сполук в активний центр цієї протеїнкінази.

У ході вивчення комплексів досліджуваних лігандів з ферментом було виявлено, що основний внесок у їх взаємодію роблять гідрофобні контакти з амінокислотними залишками

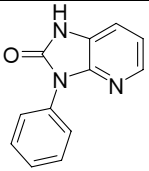
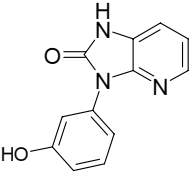
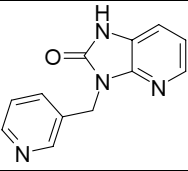
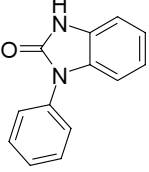
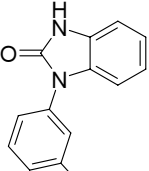
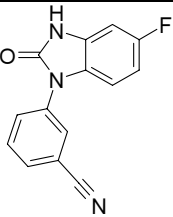
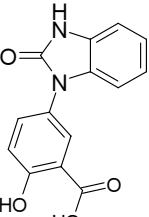
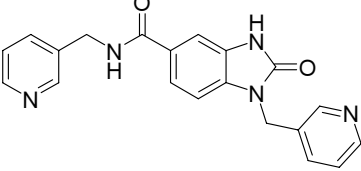
Leu45, Val53, Val66, Phe113, Val116, Ile174 та Met163. Однак, за результатами докінгу не було ідентифіковано формування водневих зв'язків за участю атомів ліганду й амінокислотними залишками активного сайту СК2. Комплекс найактивнішої сполуки **12** з амінокислотними залишками активного центру СК2 наведено на рис. 1.

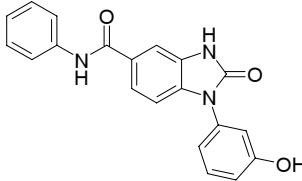
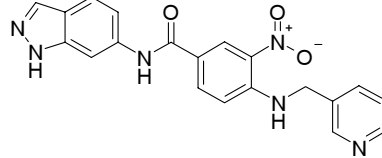
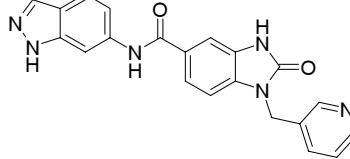
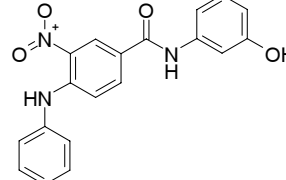
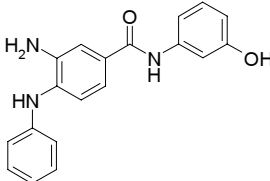
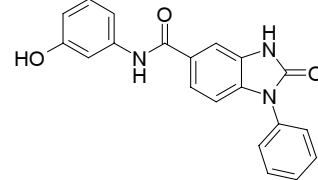
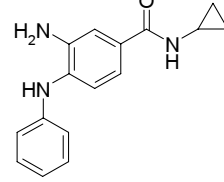
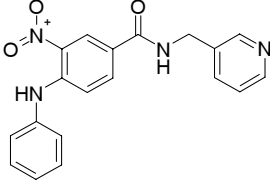
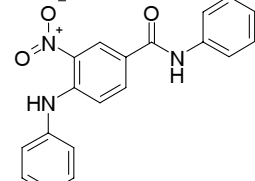
Вірогідно, подальша оптимізація інгібувальної активності по відношенню до СК2 може ґрунтуватися на введенні додаткових гідрофільних груп на фенільному та оксифенільному кільцях сполуки **12**, що, зокрема, будуть сприяти формуванню водневих зв'язків із Val116, що знаходиться в шарнірній ділянці протеїнкінази СК2 і з консервативним Lys68.

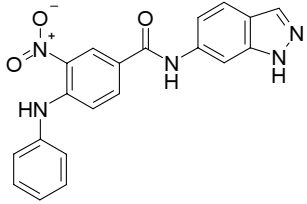
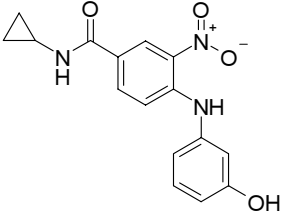
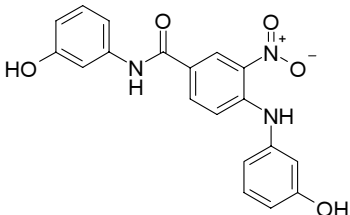
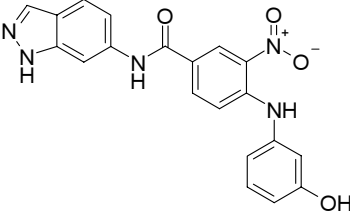
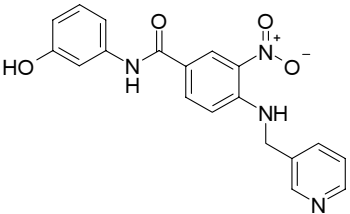
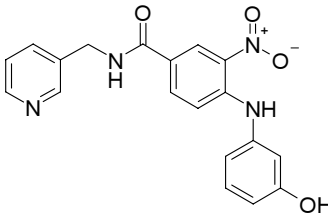
Експериментальна частина. Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази СК2 людини з використанням люциферазної реакції. Вимірювання активності протеїнкінази СК2 в присутності синтетичних сполук проводили методом непрямой детекції. Залишкові концентрації АТФ визначали за допомогою люциферазної суміші (Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay, Promega) за інтенсивністю люмінесценції, яку вимірювали на люмінометрі (VICTOR 1420-50 Multilabel Counter, PerkinElmer).

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав 3 мкл 10x буфера для СК2 (20 мМ Тріс-НCl, рН 7,5; 50 мМ КCl; 10 мМ MgCl_2); 3 мкл (6 мкг) пептидного субстрату

Хімічна структура сполук та їх інгібувальна активність по відношенню до протеїнкінази СК2

№	Хімічна структура сполуки	Залишкова активність СК2 при концентрації інгібітора 10 μM	IC ₅₀ , μM
1	2	3	4
1		73	
2		64	
3		66	
4		71	
5		66	
6		50	
7		71	
8		71	

1	2	3	4
9		61	24
10		50	17,8
11		57	
12		73	
13		41	8
14		63	30
15		71	
16		71	
17		68	

1	2	3	4
18		36	10
19		64	
20		62	18
21		51	21
22		62,5	
23		68	

RRRDDDSDDD (New England Biolabs); 0,02 мкл (10 одиниць) рекомбінантної протеїнкінази CK2 (New England Biolabs); 13 мкл дистильованої води. Аліквоти реакційної суміші 19 мкл/пробу поміщали в лунки планшета (Optiplate 96, PerkinElmer, Cat #6005290). До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітора, попередньо розчиненого в ДМСО, у необхідній концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл 22,5 мкМ

АТФ. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 7,5 мкМ.

Після інкубації, що тривала 25 хв. при 30 °С, у кожен лунку додавали 30 мкл люциферазної суміші Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay, Promega), що одночасно зупиняла кінзну і починала люциферазну реакцію із залишковим АТФ. Планшет переносили в люмінометр (Perkin Elmer Multilabel Counter, Victor3) і проводили вимірювання рівня люмі-

несценції згідно з протоколом програми приладу (1 секунда на пробу). Як негативний контроль використовували 1 мкл ДМСО.

Молекулярний докінг. Для рецепторно-орієнтованого гнучкого докінгу було використано пакет програм «DOCK4.0». Просторову структуру каталітичної субодиниці СК2 було взято з бази даних «RCSB Protein Data Bank» (ID: 3NSZ). Сфери активного сайту розраховано програмами «Sphgen» (пакет «DOCK») та «Conolly MS».

Обертальні зв'язки та якірні елементи молекул лігандів ідентифікували програмою «DOCK» в автоматичному режимі. Множинні якірні елементи в структурі ліганду були дозволені. Орієнтаційний пошук здійснено із застосуванням автоматичного збігу. Було дозволено локальну мінімізацію та ремінімізацію енергії орієнтацій і конформацій ліганду

та його якірних елементів. Параметри мінімізації енергії взято за умовчанням.

Розрахунок геометрії лігандів здійснювали в силовому полі YFF [13]. Часткові атомні заряди лігандів розраховували методом Кірхгофа [14]. Параметри докінгу використовували, як описано раніше [15].

Візуалізацію комплексів проводили за допомогою програми «ViewerLite v.4.2» [16].

Висновки. Досліджено інгібувальну активність похідних імідазолону та їх нециклических попередників стосовно протейнінази СК2. Знайдено 7 мікромольних інгібіторів СК2 зі значеннями IC_{50} у діапазоні від 8 до 30 μ M, запропоновано шляхи їх подальшої структурної оптимізації з метою покращення активності.

Надійшла в редакцію 31.03.2015 р.

Investigation of inhibitory activity of imidazolone derivatives and their precursors toward human protein kinase CK2

V.M. Naumchuk, G.P. Volynets, O.B. Gorbatiuk, S.S. Lukashov, V.G. Bdzhola, S.M. Yarmoluk

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

Summary. We have investigated inhibitory activity of imidazolone derivatives and their precursors toward protein kinase CK2. As a result, we have found seven inhibitors with IC_{50} values in the range from 8 to 30 μ M.

Keywords: imidazolones, protein kinase CK2, inhibitor.

Перелік літератури

1. Kamal A., Ramakrishna G., Raju P., Viswanath A., Ramaiah M.J., Balakishan G., Pal-Bhadra M. Synthesis and anti-cancer activity of chalcone linked imidazolones // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2010. — Vol. 20, No. 16. — P. 4865-4869.
2. Saravanan S., Selvan P.S., Gopal N., Gupta J.K., De B. Synthesis and antibacterial activity of some imidazole-5-(4H)one derivatives // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. — 2005. — Vol. 338, No. 10. — P. 488-492.
3. Liao W., Hu G., Guo Z., Sun D., Zhang L., Bu Y., Li Y., Liu Y., Gong P. Design and biological evaluation of novel 4-(2-fluorophenoxy)quinoline derivatives bearing an imidazolone moiety as c-Met kinase inhibitors // *Bioorg. Med. Chem.* — 2015. — Vol. 23, No. 15. — P. 4410-4422.
4. Niculescu-Duvaz D., Gaulon C., Dijkstra H.P., Niculescu-Duvaz I., Zambon A., Menard D., Suijkerbuijk B.M., Nourry A., Davies L., Manne H., Friedlos F., Ogilvie L., Hedley D., Whittaker S., Kirk R., Gill A., Taylor R.D., Raynaud F.I., Moreno-Farre J., Marais R., Springer C.J. Pyridoimidazolones as novel potent inhibitors of v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF) // *J. Med. Chem.* — 2009. — Vol. 52, No. 8. — P. 2255-2264.
5. Liu Y., Jiang C., Wu H., Wu P., Si M., Hu Y., Liu T. Design, synthesis and biological evaluation of novel imidazolone derivatives as dipeptidyl peptidase 4 inhibitors // *Med. Chem.* — 2013. — Vol. 9, No. 7. — P. 938-946.
6. Hassanein H.H., Khalifa M.M., El-Samaloty O.N., El-Rahim M.A., Taha R.A., Magda, Ismail M.F. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolone derivatives as potential COX-2 inhibitors // *Arch. Pharm. Res.* — 2008. — Vol. 31, No. 5. — P. 562-568.
7. Sheppeck J.E., Gilmore J.L., Tebben A., Xue C.B., Liu R.Q., Decicco C.P., Duan J.J. Hydantoins, triazolones, and imidazolones as selective non-hydroxamate inhibitors of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2007. — Vol. 17, No. 10. — P. 2769-2774.
8. Andres J.I., Alonso J.M., Diaz A., Fernandez J., Iturrino L., Martinez P., Matesanz E., Freyne E.J., Deroose F., Boeckx G., Petit D., Diels G., Megens A., Somers M., Van Wauwe J., Stoppie P., Cools M., De Clerck F., Peeters D., de Chaffoy D. Synthesis and biological evaluation of imidazol-2-one and 2-cyanoimidazole derivatives: novel series of PDE4 inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2002. — Vol. 12, No. 4. — P. 653-658.
9. Montenarch M. Cellular regulators of protein

kinase CK2 // Cell Tissue Res. — 2010. — Vol. 342, No. 2. — P. 139-146.

10. Filhol O., Giacosa S., Wallez Y., Cochet C. Protein kinase CK2 in breast cancer: the CK2 β regulatory subunit takes center stage in epithelial plasticity // Cell. Mol. Life. Sci. — 2015. — Vol. 72, No. 17. — P. 3305-3322.

11. Lukashov S.S., Kukharensko O.P., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. 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» (October 5-9, 2009. Kharkiv, Ukraine). — С. 21.

12. Наумчук В.М., Лукашов С.С., Остринська О.В., Борисенко І.П., Фесун І.М., Плетньова Л.В., Ярмолюк С.М. Синтез 1-алкіл-, 1-арил-2-бензімідазолонів та амідів 2-оксобензімідазол-5-карбонової кислоти // Ukr. Bioorg. Acta. — 2014. — Т. 12, № 2. — P. 40-46.

13. Bursulaya B.D., Totrov M., Abagyan R., Brooks III C.L. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking // J Comput Aided Mol Des. — 2003. — 17. — P. 755-763.

14. Yakovenko O.Ya., Oliferenko A.A., Golub A.G., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. The new method of distribution integrals evaluations for high throughput virtual screening // Ukr. Bioorg. Acta. — 2007. — Vol. 5, No. 1. — P. 52-62.

15. Yakovenko O.Ya., Oliferenko A.A., Bdzhola V.G., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Kirchhoff atomic charges fitted to multipole moments: implementation for a virtual screening system // J Comput Chem. — 2008. — 29. — P. 1332-1343.

16. The structures were visualized using the program ViewerLite v.4.2. (Accelrys Inc.; <http://www.accelrys.com>).