

УДК 541.69:54

ДИЗАЙН НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ Ser/Thr КИНАЗЫ PknB¹

Василевич Н.И., Афанасьев И.И.

ООО «Новые научные технологии», МОСКВА, УЛ. ГЕРОЕВ ПАНФИЛОВЦЕВ, 20,

e-mail: nvasilevich@asinex.com

Реферат

Используя предложенный ранее подход, включающий применение универсального Ser/Thr фармакофора, мы предложили новый класс соединений, потенциально способных ингибировать микобактериальную Ser/Thr киназу PknB. Подобно соединениям, предложенным ранее в литературе, они имели в своем составе арил-амино-тиазольный фрагмент, однако, в корне отличались положением третьей ароматической группы. Потенциальная активность нового класса соединений была подтверждена биологическими данными.

Ключевые слова

Серин-треониновые протеинкиназы, туберкулез, микобактериальная киназа PknB

Туберкулез является распространенным инфекционным заболеванием, вызываемым различными штаммами микобактерий, в первую очередь *[Mycobacterium tuberculosis](#)*. По данным ВОЗ, в 2014 году в мире 9,6 миллионов людей были больны туберкулезом, из них 1,5 миллионов человек скончалось от этого заболевания (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>).

Бактериальные протеинкиназы контролируют важнейшие процессы в прокариотических клетках, и в то же время значительно отличаются от протеинкиназ человека, что делает их привлекательными мишенями для селективно-

¹ Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии Минобрнауки России № 14.576.21.0019 от 27 июля 2014 Шифр «RFMEFI57614X0019»)

го и безопасного ингибирования. В *Mycobacterium tuberculosis* также идентифицировано 11 серин-треониновых протеинкиназ, большинство из которых являются трансмембранными рецепторными белками, передающими сигналы внутри клетки [1,2, 3]. Было обнаружено, что PknВ и PknА являются ключевыми киназами, необходимыми для роста микобактерий [4]. PknG является основным фактором вирулентности *M. tuberculosis*, и участвует в метаболизме глутамата [5, 6]. В то же время делеция гена *PknE* никак не влияет на жизнеспособность бактерии [7]. Таким образом, одной из ключевых мишеней для разработки новых таргетных противотуберкулезных препаратов является серин/треониновая киназа *Mycobacterium tuberculosis* PknВ, которая участвует в нескольких сигнальных путях в процессах клеточного деления и метаболизма. В настоящее время в ряде научных лабораторий ведется интенсивный поиск новых ингибиторов PknВ киназы, однако, до настоящего момента не было найдено ни одного ингибитора, который бы останавливал рост микобактерий в субмикромольных концентрациях [8, 9].

В научных лабораториях были предприняты попытки сконструировать фармакофорную модель микобактериальных Ser/Thr киназ. Интересным примером таких работ является статья Seal и соавт. [10], в которой описан новый комбинированный метод построения фармакофора, использующий как докинг структур в известную кристаллографическую модель киназы, так и подход, основанный на анализе известных лигандов. Авторы разработали фармакофорную модель, при помощи которой был проведен виртуальный скрининг среди базы соединений компании АСИНЭКС, состоящей из 393000 молекул. В результате этой работы были найдены 45 структур, подходящих под требования найденного авторами PknВ фармакофора. Все они содержали акцепторы и доноры водородных связей и несколько ароматических ядер в соответствующих ориентациях.

Анализ приведенных в работе структур позволил выделить два основных кластера: кластер 1, включающий 19 соединений и состоящий из центрального аминотиазольного фрагмента, связанного с двумя ароматическими ядрами, и

кластер 2, включающий 15 соединений и состоящий из двух ароматических (иногда бициклических) систем, связанных через NH-группу.

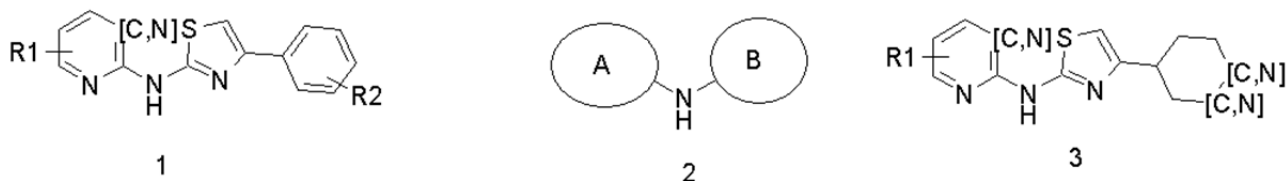


Рис.1.

В нашей лаборатории также проводились работы по поиску универсальной фармакофорной модели для Ser/Thr киназ [11]. С использованием функциональных возможностей программного обеспечения МОЕ (CCG) была получена фармакофорная модель соединений, от которых следует ожидать активность как ингибиторов серин-треониновых киназ [11] (Рис. 2). Эта фармакофорная модель также включала арил-аминотиазольный фрагмент, присутствующий в соединениях кластера 1. Ранее нами была продемонстрирована возможность адаптации найденного универсального фармакофора к отдельным киназам на примере киназы AuroraA. Соединения, полученные нами в результате этой работы, проявили чрезвычайно высокую активность к этой киназе, IC₅₀ составило 3-5 нМ [11, 12].

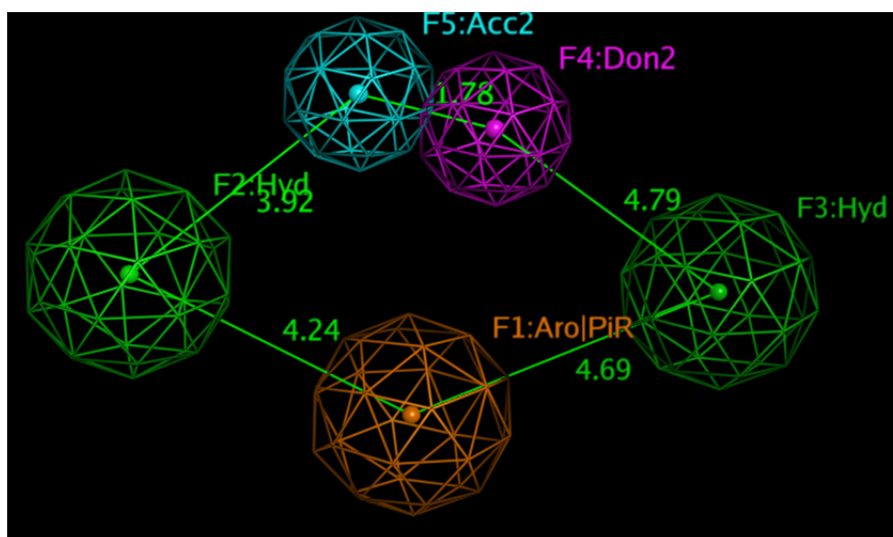


Рис.2. Фармакофорная модель соединений – ингибиторов Ser/Thr киназ. Зеленым цветом выделены гидрофобные области, коричневым – ароматический центр, голубым – проекция акцептора водородных связей, а сиреневым – проекция донора водородных связей

В отличие от соединений, выделенных Seal и соавт., соединения, сконструированные в нашей лаборатории, содержали насыщенный пиперидиновый (или пирролидиновый) цикл, замещенный по имино-группе и связанный с тиазольным ядром, а не ароматический цикл (Рис. 1, кластер 3).

Поскольку PknB является серин/треониновой киназой, мы решили адаптировать универсальный фармакофор к требованиям этой микобактериальной киназы. Согласно нашей модели, ориентация третьего ароматического ядра, связанного с тиазольным ядром, должна быть несколько иной, чем это предсказывают Seal и соавт.

Применив разработанную нами модель универсального фармакофора, мы ввели ароматическое ядро, связанное с универсальным фармакофорным фрагментом, через другую систему связей, насыщенный 2-пиперидиновый или 2-пирролидиновый фрагмент (Рис. 3 В и С). При этом тиазольный фрагмент может занимать как среднее, так и боковое положение. Подобная замена показала нам благоприятной, поскольку построенные таким образом молекулы являются более гибкими по сравнению со структурами, выделенными Seal, что позволяет им дополнительно адаптироваться к требованиям сайта связывания. Кроме того, исходя из нашего опыта, наличие трех связанных ароматических колец приводит к плохой растворимости и потенциальным проблемам с АДМЕ и СУР ингибированием. Выводя два ароматических ядра из сопряжения и добавляя основной атом азота, мы надеялись преодолеть эти недостатки.

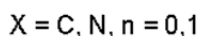
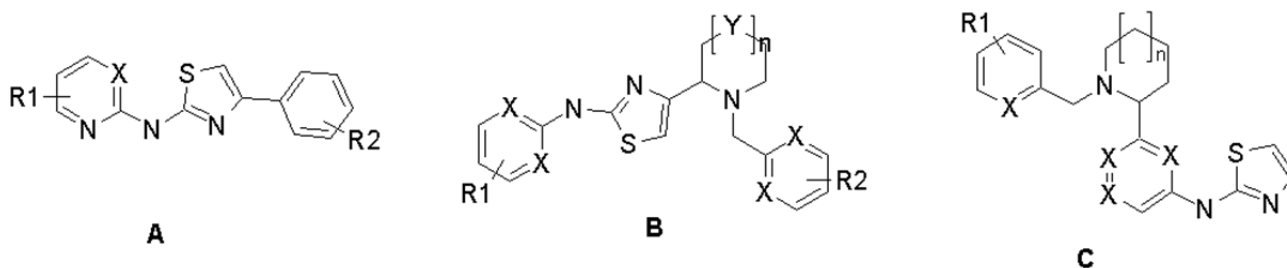
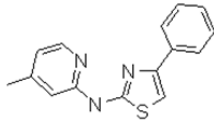
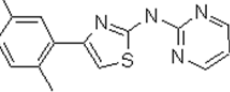
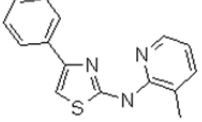
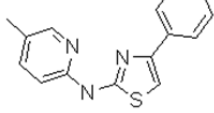
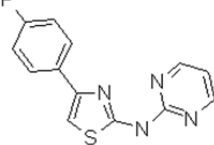


Рис. 3. Общая формула соединений, содержащих пиридил(или пиримидил)-амино-тиазольный фрагмент, отобранных авторами [11] как потенциальные ингибиторы PknB (А) и соединений, предложенных с помощью универсальной фармакофорной модели.

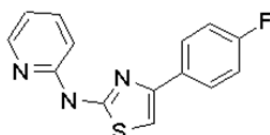
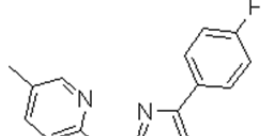
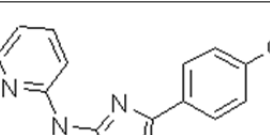
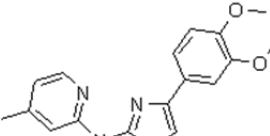
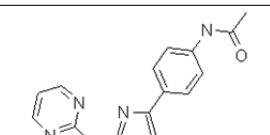
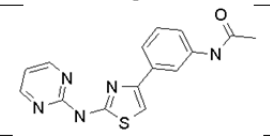
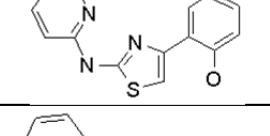
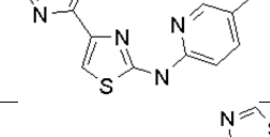
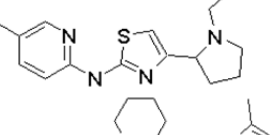
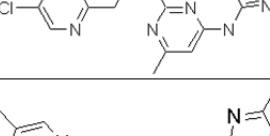
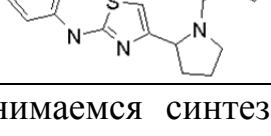
Нами было синтезировано несколько соединений, принадлежащих к сериям В и С, показанных на рис. 3. Некоторые из синтезированных нами соединений, а также соединения кластера, описанные в работе [10], были отправлены в компанию DiscoverX на исследование ингибирования микобактериальной киназы PknB. Методика определения основана на определении способности соединения конкурентно связываться с ДНК-меченой киназой в присутствии иммобилизованного лиганда. Способность конкурировать с иммобилизованным лигандом количественно измерялась при помощи ПЦР ДНК метки.

Результаты исследования представлены в Таблице 1. Из Таблицы видно, что ни одно из соединений, описанных авторами [10] как потенциальные ингибиторы PknB, не проявляет активности в концентрации <30 мкМ. Среди соединений, сконструированных при помощи модели универсального фармакофора, соединение **15** обнаружило умеренную активность 23 мкМ по отношению к микобактериальной киназе PknB. Это соединение принадлежит к скаффолду С и может служить перспективным соединением для разработки нового класса противотуберкулезных препаратов.

Таблица 1. Ингибирование микобактериальной киназы PknB соединениями, описанными в работе [10], и соединениями, предложенными на основании универсальной Ser/Thr фармакофорной модели.

№ соединения	Источник	Структура	PknB (M.tuberculosis)
1	[10]		>30 мкМ
2	[10]		>30 мкМ
3	[10]		>30 мкМ
4	[10]		>30 мкМ
5	[10]		>30 мкМ

№ соедине-	Источник	Структура	PknB
------------	----------	-----------	------

ния			(<i>M.tubercoulosis</i>)
6	[10]		>30 мкМ
7	[10]		>30 мкМ
8	[10]		>30 мкМ
9	[10]		>30 мкМ
10	[10]		>30 мкМ
11	[10]		>30 мкМ
12	[10]		>30 мкМ
13	[10]		>30 мкМ
14	ООО «Новые научные технологии»		>30 мкМ
15	ООО «Новые научные технологии»		23 мкМ
16	ООО «Новые научные технологии»		>30 мкМ

В настоящее время мы занимаемся синтезом соединений указанного класса и изучением их свойств как ингибиторов микобактериальной Ser/Thr киназы PknB.

Таким образом, используя предложенный ранее подход, включающий применение универсального Ser/Thr фармакофора, мы предложили новый класс соединений, потенциально способных ингибировать микобактериальную Ser/Thr киназу PknB. Подобно соединениям, предложенными ранее зарубежными авторами [10], они имели в своем составе арил-амино-тиазольный фрагмент, однако, в корне отличались положением третьей ароматической группы. Потенциальная активность нового класса соединений была подтверждена биологическими данными.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии Минобрнауки России № 14.576.21.0019 от 27 июля 2014 Шифр «RFMEFI57614X0019»).

Литература

1. A. Walburger, A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, *Science*, 304, 1800-1804 (2004).
2. R. Szekely, F. Waczek, I. Szabadkai, G. et.al., *Immunol. Lett*, 116, 225-231, (2008).
3. S. Pristic and R.N. Husson, *Microbiol Spectr.*, 2(5), 681-708, (2014).
4. T. Alber, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 650-657, (2009).
5. N. Scherr, S. Honnappa, G. Kunz, et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12151-12156 (2007).
6. H. M. O'Hare, R. Durán, C. Cerveñansky, et.al., *Mol. Microbiol.*, 70, 1408- 1423 (2008).
7. L. M. Gay, H.-L. Ng, T. A. J. Alber, *Mol. Biol.*, 360, 409-420 (2006).
8. T.M. Chapman, N. Bouloc, R.S. Buxton, et.al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 3349–3353 (2012).
9. K.E.A. Loughheed, S.A. Osborne, B. Saxty, D. et.al., *Tuberculosis*, 91, 277-286 (2011).
10. A. Seal, P. Yogeewari, D. Sriram, OSDD Consortium and D.J. Wild, *Journal of Cheminformatics*, 5:2 (2013).
11. N. I. Vasilevich, V. V. Tatarskiy Jr, E. A. Aksenova, D. N. Kazyulkin, I. I. Afanasyev, *Pharmaceuticals*, 9, 19 (2016).
12. N. I. Vasilevich, E. A. Aksenova, D.N. Kazyulkin, and I.I. Afanasyev, *Chem.Biology & Drug Design*, DOI: 10.1111/cbdd.12733, (2016).