

# **Биомишень-направленный скрининг ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ - потенциальных противораковых и антибактериальных лекарств**

*Штиль А. А., М.Н.Преображенская, В.Н. Даниленко*

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН  
НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН  
Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН

**Руководитель проекта: профессор В.Н. Даниленко**  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

**IV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
«МЕДБИОТЕК-4»**

Москва, 2 декабря 2008 г.

# Группа по изучению протеинкиназ как терапевтически важных мишеней

- В.Н.Даниленко (ИОГен РАН): концепция, новые бактериальные тест-системы для прескрининга ингибиторов киназ, проверка активности *in vitro* на панели киназ;
- М.Н.Преображенская (НИИНА РАМН): синтез новых ингибиторов - производных индолилмалеимидов;
- А.А.Штиль (РОНЦ РАМН): новые тест-системы в опухолевых клетках

# ЗАДАЧИ:

Мишень:  
валидация для  
создания  
тест-систем

СТПК-киназы  
*Actinobacteria*,  
СТПК  
человека

Лидерные  
соединения

прескрининг,  
отбор  
и оптимизация

Продвижение  
“кандидатов”  
в лекарства

предклини-  
ческое  
изучение

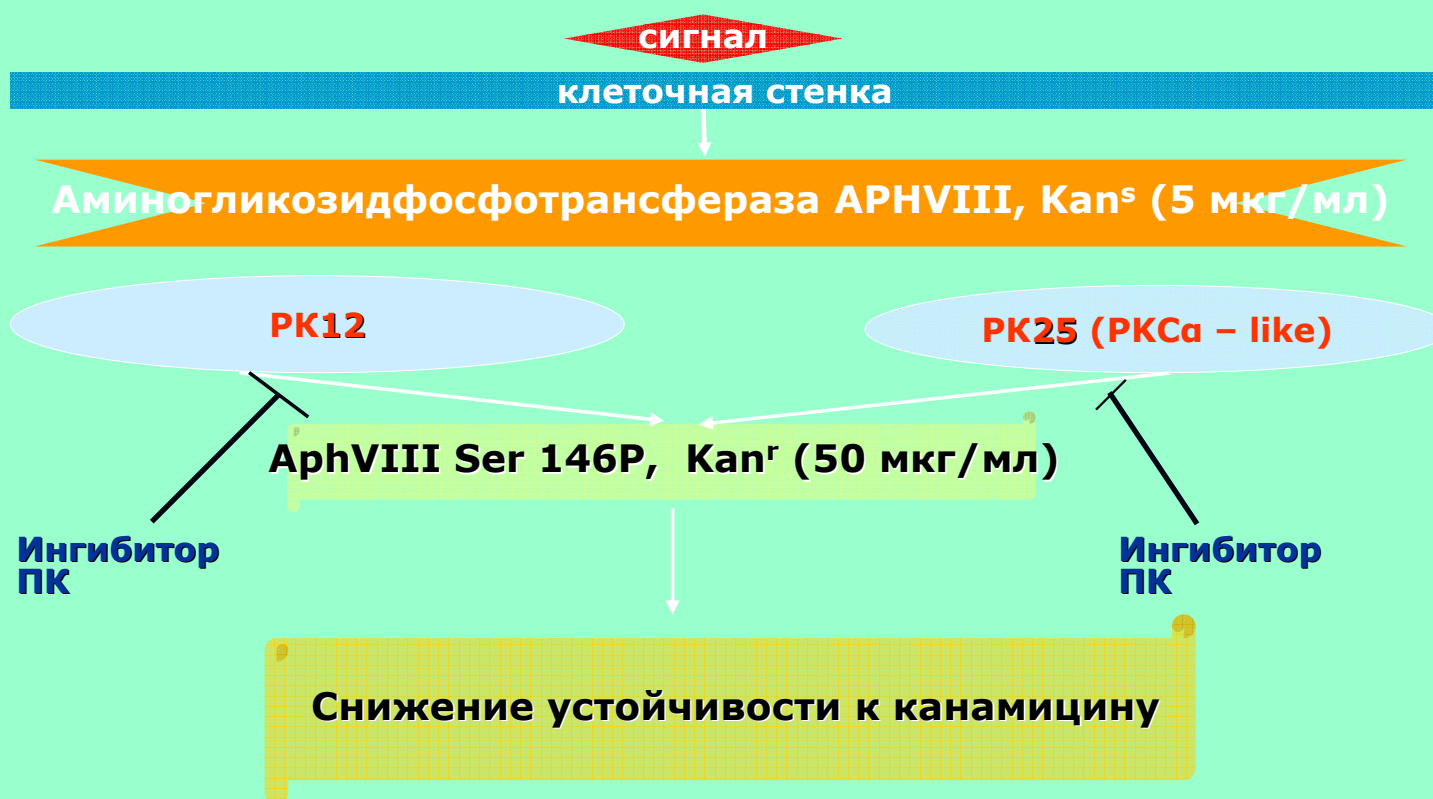
## Европейский консорциум 'Protein Kinases, Novel Drug Targets for Post-Genomic Era' (2007-2009):

- >30 лабораторий из 26 стран;
- 5 рабочих групп, 272 участника;
- Протеинкиназы как важнейший язык биологической регуляции; создание мишень-специфических лекарств;
- Финансирование European Commission

**Тест-системы для  
скрининга ингибиторов  
серин-треониновых ПК:**

*Actinobacteria,*  
**опухолевые клетки  
человека**

# Тест-система в актинобактериях

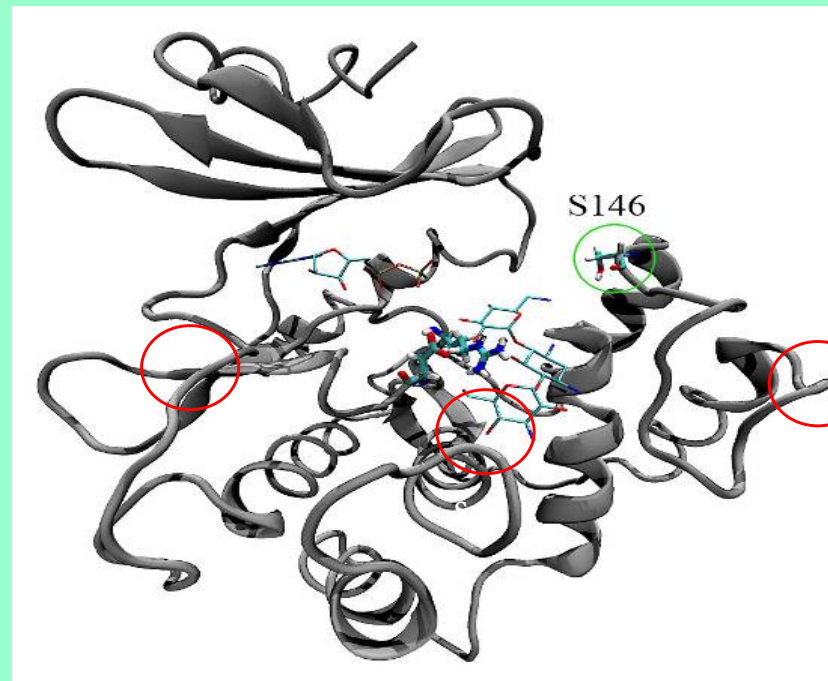


# Фосфорилирование Ser<sub>146</sub> увеличивает активность АРНVIII

AVAEG

S<sub>146</sub>VDLED

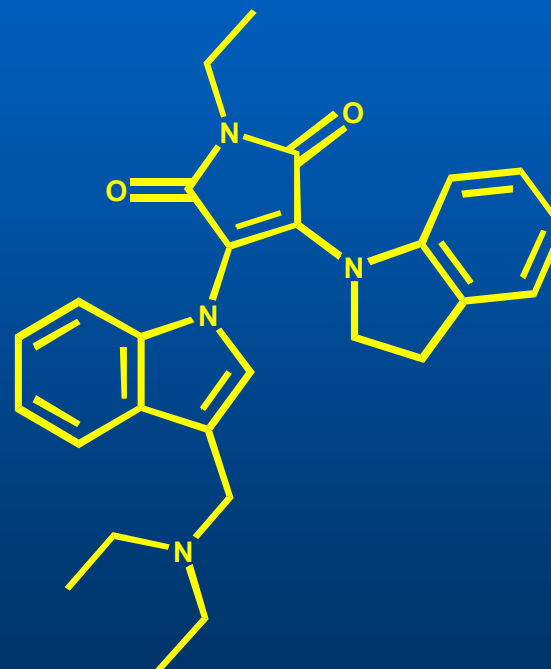
-фосфо-Ser в  
активационной  
петле



# Бис-индолилмалеимид I и ЛХТА-1313



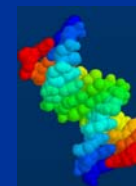
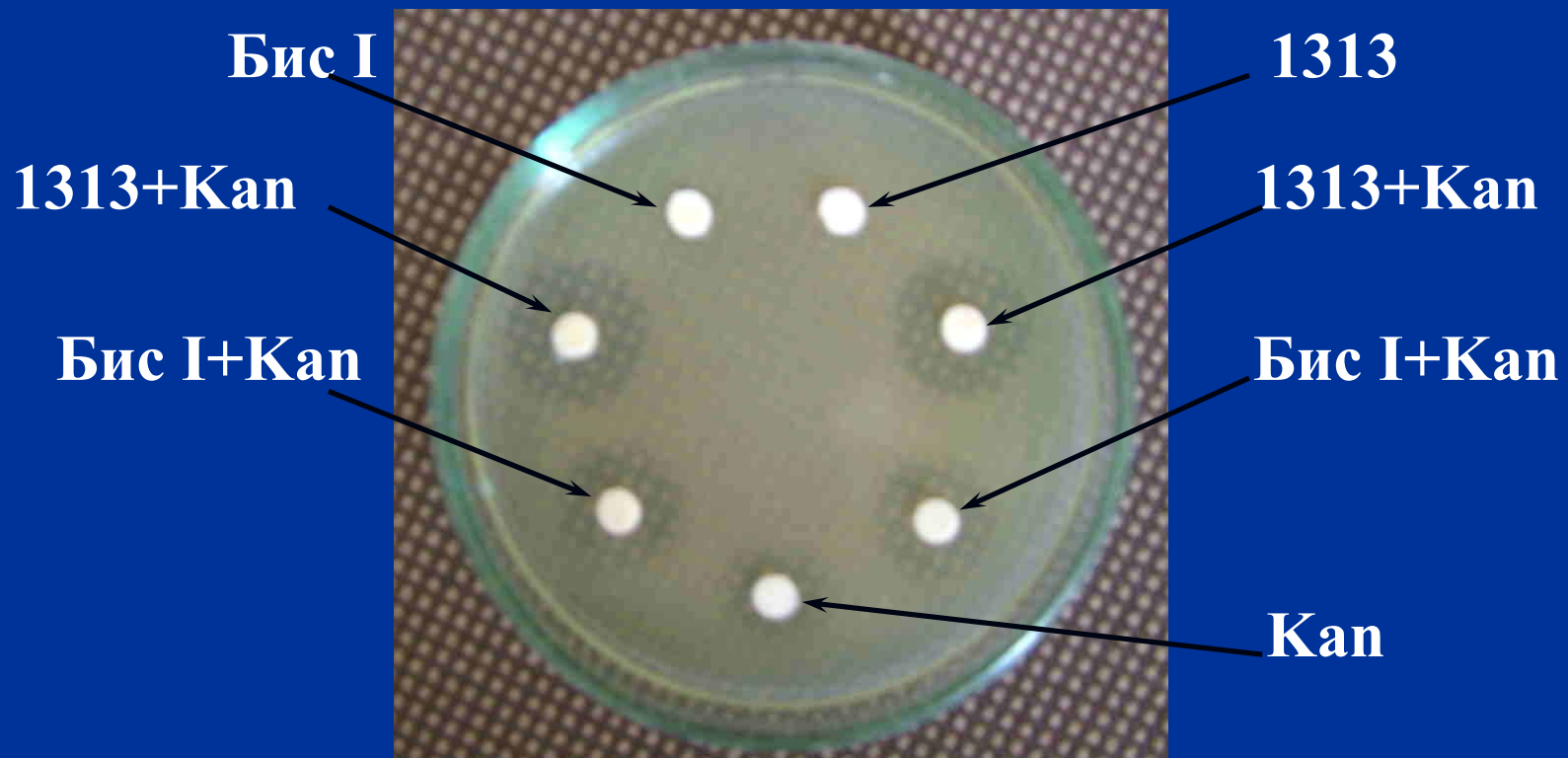
Бис-I



ЛХТА-1313



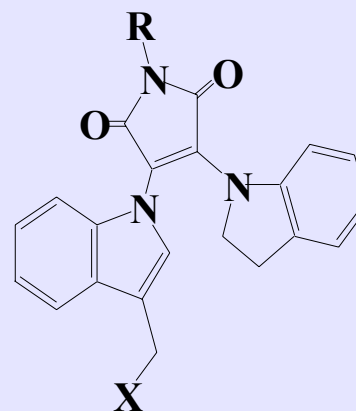
# ЛХТА-1313 активнее, чем Бис I



# Новые производные ингибируют $\alpha$ -PKC и снижают устойчивость *Actinomyces* к канамицину

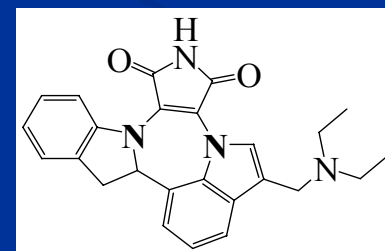
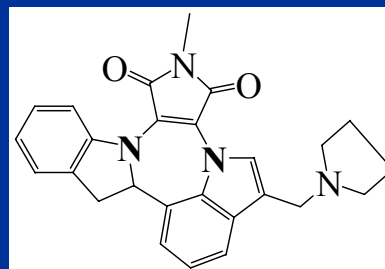
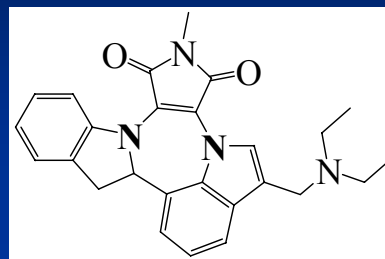
LCTA numbers	Substituents	Inhibition of <i>Actinomyces</i> resistance to Kanamycin	PKC- $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM) % of inhibition of protein kinases by 10 mM of the inhibitor
1183	X = NMe <sub>2</sub> , R = Me,	+++	120
1212	X = N-pyrrolidinyl, R = Me,	++++	125
1213	X = N-piperazinyl-N-Methyl, R = Me,	++++	ND
1237	X = N(Et) <sub>2</sub> , R = H	ND	90 ERK8 - 24±3 PKCa - 27±10 GSK3b - 31±3/
1286	R = - (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub> , X = N(Et) <sub>2</sub> ,	++++	133 SYK - 55±5/
1301	X = N(Et) <sub>2</sub> , R = Bn	++	CAMK1 - 14±2 RSK1 - 53±8 PKBb - 55±1 SmMLCK - 44±4
1313	X = N(Et) <sub>2</sub> , R = Et,	++++	117
1362	X = NHEt, R <sub>1</sub> = Me	++++	PKBb - 58±4
1403	X = N(Et) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Me	++	CAMK1 - 39±55 YES1 - 54±2

## 3-диалкиламинометил-индолил-производные



# Преимущественная активность полианнелированных производных дiazепина для бактерий

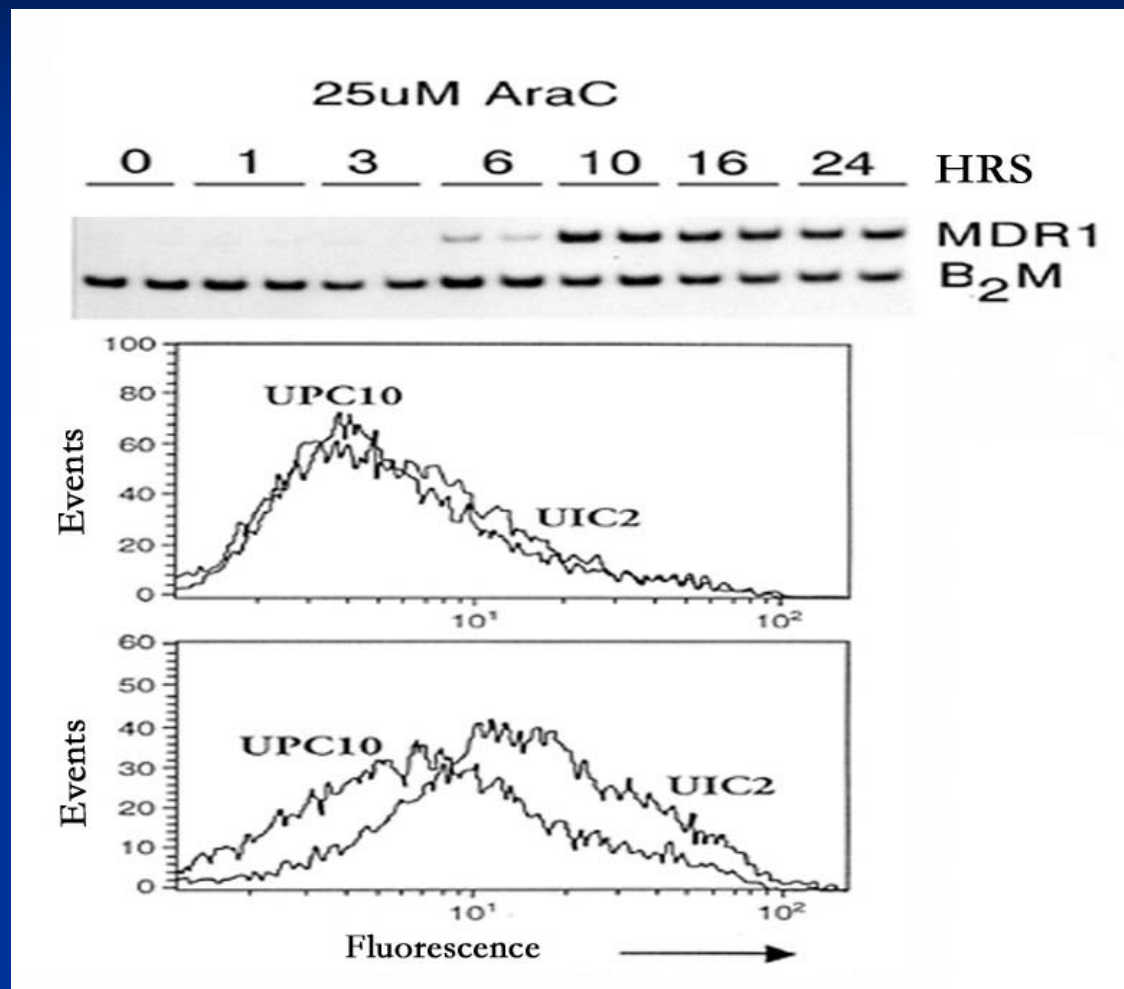
Соединение	Диаметр зоны лизиса, мм
4a	13±0.5
4b	14±1
5b	13±1
10e	9±1
Bis I	10±2
Bis V	7.5±0.5
Danilenko et al., <i>J.Med.Chem.</i> , 2008	



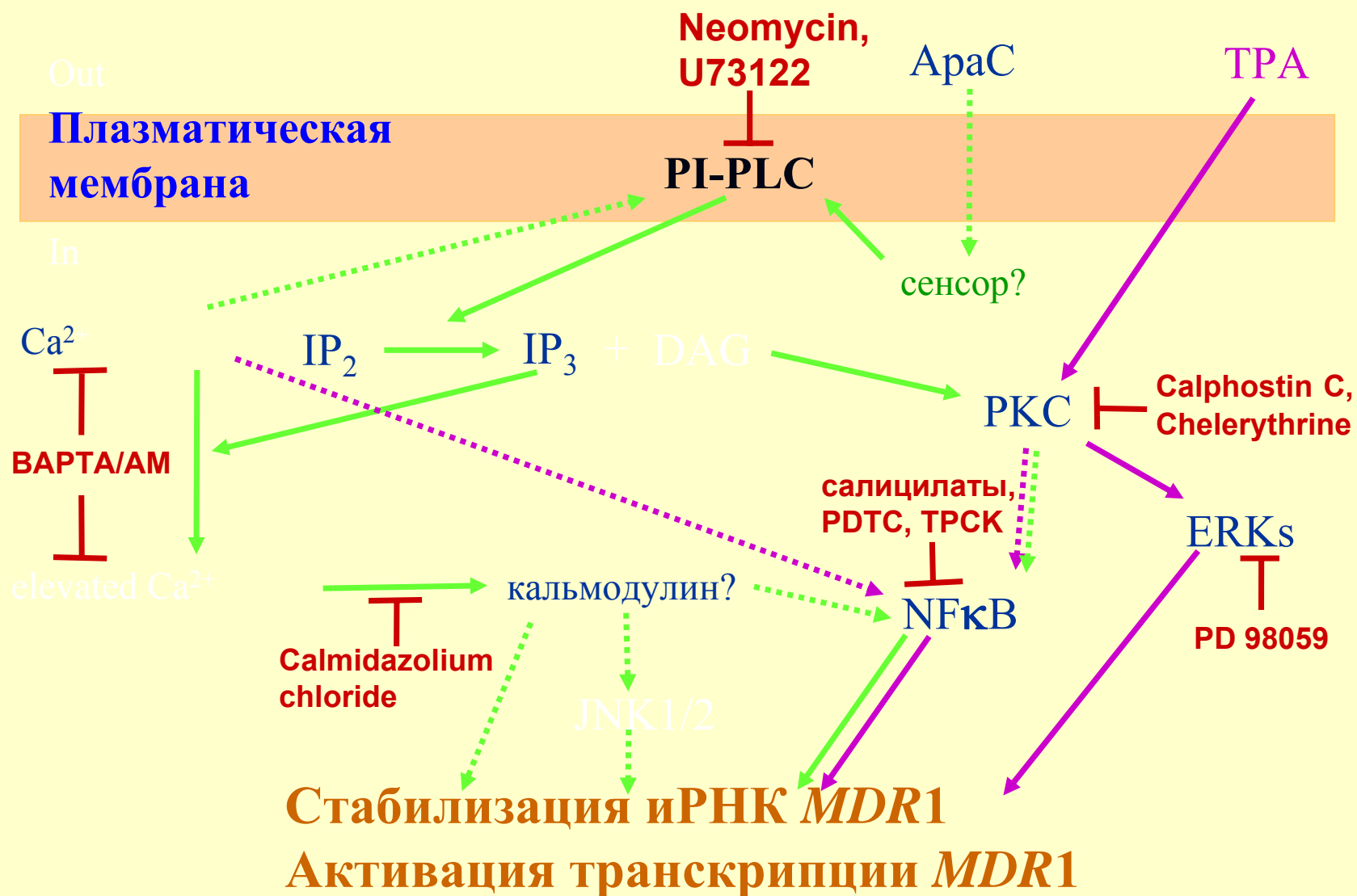
## Тест-система в опухолевых клетках

- Протеинкиназа С регулирует срочную активацию гена *MDR1* противоопухолевыми препаратами;
- В клетках лейкоза активация *MDR1* регулируется изоформой альфа;
- Ингибиторы  $\alpha$ -изоформы предотвращают активацию *MDR1*?

# Срочная активация *MDR1*



# Активация гена *MDR1*



## Новое соединение ЛХТА-1313 – более мощный ингибитор $\alpha$ -ПКС, чем Бис I

СОЕДИНЕНИЕ	IC <sub>50</sub> , нМ
Бис I	140 <sub>±</sub> 11
ЛХТА-1313	52 <sub>±</sub> 7

Активность рекомбинантной киназы в присутствии Ca<sup>2+</sup>, диолеина, фосфатидилсерина, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ и гистона H1

## IC<sub>50</sub> для ПКСа

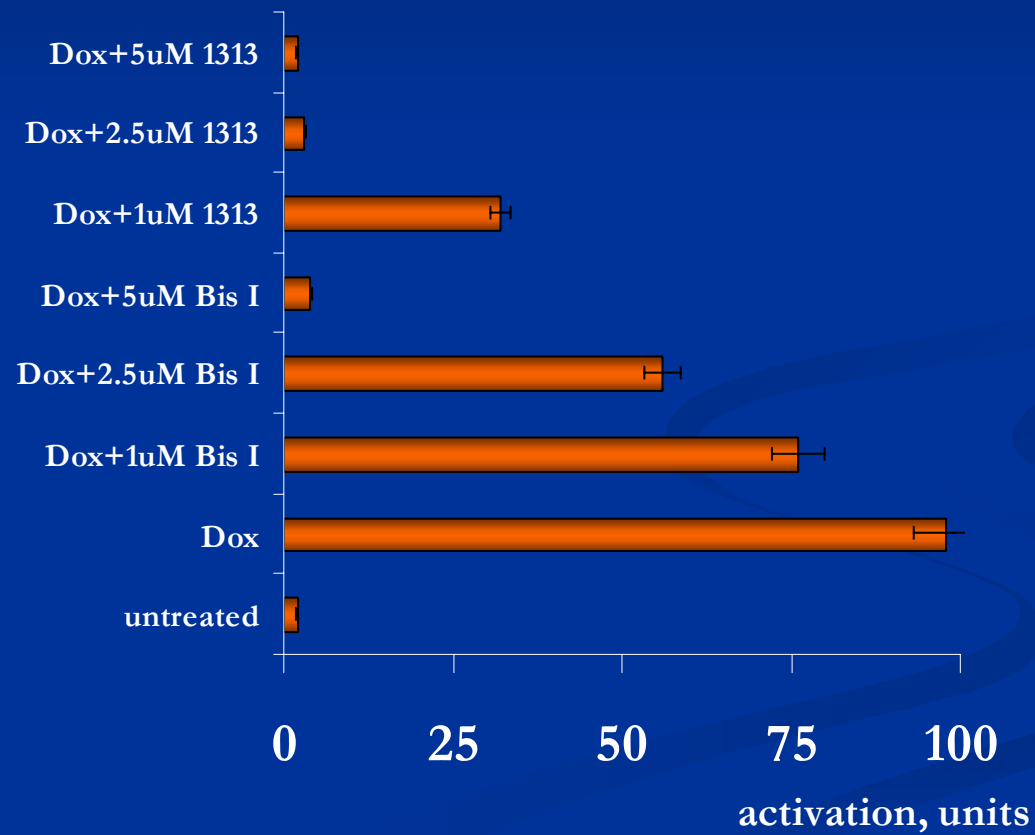
№	соединение	IC <sub>50</sub> ± SD, нМ
1	ЛСТА-1313	52±7
2	ЛСТА-1237	89±5
3	ЛСТА-1183	94±3
4	ЛСТА-1123	114±11
5	ЛСТА-1314	130±19
6	ЛСТА-1286	130±15
7	ЛСТА-1212	135±12
8	ЛСТА-1276	175±30
9	ЛСТА-1122	>250
10	ЛСТА-1222	>250
11	ЛСТА-1365	>250
12	ЛСТА-1398	>250
13	ЛСТА-1417	>250
14	ЛСТА-1367	>250
15	ЛСТА-1388	>250
16	Bis-I	100±6



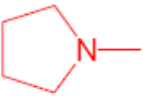
# Селективность ингибирования PKC соединением ЛХТА-1313

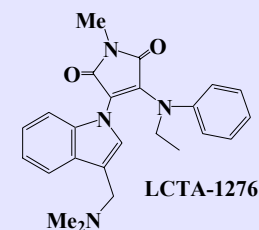
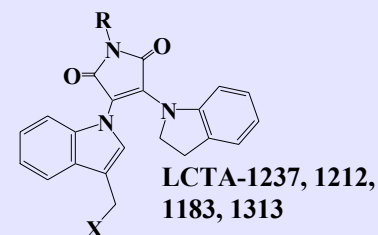
Киназа	Остаточная активность, %
PKC $\alpha$	7 $\pm$ 1*
PKC $\beta$ I	4 $\pm$ 2
PKC $\beta$ II	18 $\pm$ 2
PKC $\gamma$	11 $\pm$ 5
PKC $\delta$	31 $\pm$ 2
PKC $\epsilon$	40 $\pm$ 5
PKC $\theta$	39 $\pm$ 3
PKC $\iota$ / $\lambda$	41 $\pm$ 2
PKC $\zeta$	43 $\pm$ 4
PKA	91 $\pm$ 8

# ЛХТА-1313 предотвращает активацию гена *MDR1*



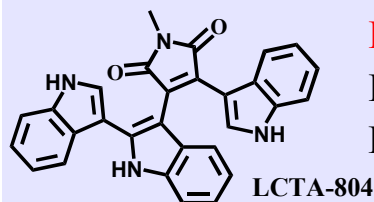
## Нетоксичные ингибиторы предотвращают активацию *MDR1* в клетках лейкоза K562

LCTA №	R	X	IC <sub>50</sub> PKCα (nM)	Cyto-toxicity IC <sub>50</sub> , μM (K562 cells)	Anti-MDR EC <sub>50</sub> , μM
1237	H	NEt <sub>2</sub>	89±5	16±4	5.4
1212	Me		125±22	>50	1.9
1183	Me	NMe <sub>2</sub>	94±3	>50	5.2
1313	Et	NEt <sub>2</sub>	117±14	20±4	1.8
1276	Me	NEt <sub>2</sub>	175±40	12±3	3.7

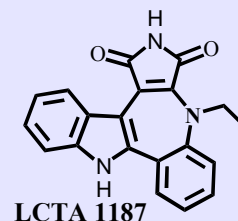


# Основные структуры, использованные для химических модификаций

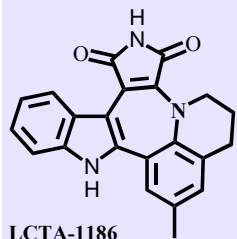
*% подавления, 10 мкМ*



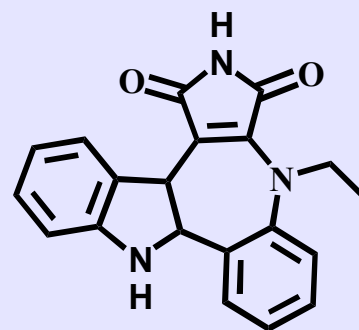
**PIM1 - 9; PIM3 - 13;**  
**PKCa - 30; FGF-R1 - 31**  
**IC<sub>50</sub> 2.3 mcM (L1210)**



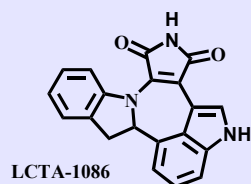
**DYRK3 - 11; PIM1 - 2; PIM2 - 7;**  
**PIM3 - 6; MST2 - 12; HIPK2 - 16;**  
**Src - 21; FGF-R1 - 10; ROCK2 - 30;**  
**MARK3 - 32; BRSK2 - 29; PAK4 -**  
**34; SYK -25; IC<sub>50</sub> 40 mcM**



**PIM1 - 4; PIM3 - 18; GF-R1 - 17;**  
**DYRK3 - 22; MST2 - 32;**  
**IC<sub>50</sub> 40 mcM (HeLa cells)**



**PIM1 - 17;**  
**LCTA-1455**



**PIM1 - 13; PIM3 - 9; HIPK2 - 14;**  
**RSK1 - 29; SmMLCK - 24;**  
**GSK3b - 26;; MARK3 - 34;**  
**DYRK2 - 33;; PIM2 - 38;**  
**IC<sub>50</sub> 40 mcM (HeLa cells)**

# ЗАДАЧИ:

Мишень:  
валидация для  
создания  
тест-систем

СТПК-киназы  
*Actinobacteria*,  
СТПК  
человека

Лидерные  
соединения

прескрининг,  
отбор  
и оптимизация

Продвижение  
“кандидатов”  
в лекарства

предклини-  
ческое  
изучение

# Выводы (I)

- Созданы новые тест-системы для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ;
- Тест-система в *Actinobacteria* основана на предотвращении фосфорилирования АРНVIII и сенситизации бактерий к аминогликозидным антибиотикам;
- Тест-система в опухолевых клетках основана на предотвращении активации гена *MDR1*.

## Выводы (II)

- Создана библиотека оригинальных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ на основе индолиламалеимидов;
- Скрининг химической библиотеки с использованием бактериальной и эукариотической тест-систем позволяет отобрать соединения-кандидаты в антибактериальные или противоопухолевые лекарства.

# **Благодарность:**

**С.М.Елизаров, М.А.Алексеева, О.Б.Беккер,  
О.Ю.Сусова**

**С.А.Лакатош, А.Ю.Симонов**