

Інгібітори протеїнкінази СК2

А. О. Приходько, Г. Г. Дубініна, С. М. Головач, С. М. Ярмолук*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна*

Резюме. Протеїнкіназа СК2 — широко розповсюджена багатосубстратна кіназа, що має гальмівний вплив на певні клітинні механізми контролю апоптозу. СК2 розглядається як суттєвий фактор процесів пухлиноутворення і є перспективною мішенню для створення протиракових ліків. В огляді узагальнено результати пошуку інгібіторів цієї кінази серед хімічних сполук — антагоністів серин-треонінових кіназ: флавоноїдів, бензimidазольних та бензотриазольних галоген-похідних, ароматичних сульфамідів, похідних флуорену, ксантенону та ін. Проведено порівняльний аналіз їхньої ефективності, специфічності та можливих механізмів зв'язування з активним сайтом.

Ключові слова: протеїнкіназа, СК2, інгібітор, протиракові ліки.

Вступ. Протеїнкіназа СК2 (казеїнкіназа II) належить до сімейства серин-треонінових протеїнкіназ і присутня практично в усіх еукариотичних клітинах. СК2 було виявлено майже 45 років тому з допомогою її неприродних субстратів — казеїну та фосвітину. З казеїном і пов'язана назва цієї протеїнкінази. За десятиріччя досліджень було встановлено велику кількість її природних субстратів. На сьогодні СК2 вважається найплейотропнішою з усіх відомих протеїнкіназ. Дотепер відомо більше 300 субстратів цієї кінази, кількість їх постійно збільшується. Серед них ферменти метаболізму (глікоген-синтетаза та орнітин-декарбоксілаза), рецептори (інсулін та IGF-II рецептори), медіатори сигнальної трансдукції (PKA RII, кальмодулін, інгібітор протеїн-фосфатази-2), транскрипційні фактори (*c-Myc*, *c-Myb*, андроген-рецептор), онкосупресори (p53), ферменти нуклеїнових кислот (ДНК-полімераза I та II, ДНК-топоізомераза I та II), фактори трансляції

(eIF3, eIF5), ядерцеві білки (нуклеолін, HIV-1 Rev регулятор сплайсингу), білки цитоскелета (клатрин, спектрин) та багато інших. СК2 є ланкою багатьох трансдукторних шляхів клітини, широкосубстратною, переважно конститутивною кіназою, що негативно регулює апоптоз та передає в клітину сигнали, які посилюють анаболізм [1–6].

На відміну від інших серин-треонінових кіназ, протеїнкіназа СК2 має порівняно малу і досить гідрофобну кишеню зв'язування GTP [7]. Цим пояснюються «відмінності» цієї кінази від сімейства серин-треонінових кіназ, зокрема те, що вона має GTP-зв'язувальний сайт і активність її не пригнічується інгібіторами широкого спектру дії, наприклад, стауроспорином та іншими біс-індолілмалеїмідними похідними [8]. Унікальність СК2, очевидно, зумовлена наявністю в структурі зв'язувального сайту розгалужених гідрофобних залишків амінокислот — Val66 та Ile174 [7].

Гальмівний вплив СК2 на певні клітинні механізми контролю апоптозу, її підвищена активність у тканинах з прискороною проліферацією та в багатьох пухлинах дає можливість розглядати цю протеїнкіназу як суттєвий фак-

*Corresponding author.

Tel.: +38044-2522389; fax: +38044-2522458

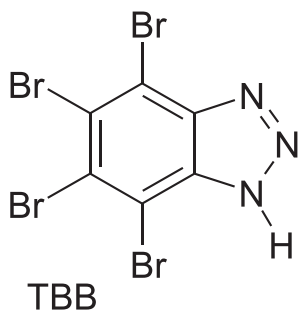
E-mail address:

sergiy@yarmoluk.org.ua

тор процесів пухлиноутворення. У зв'язку з цим в останні роки різними лабораторіями здійснено спроби пошуку специфічних інгібіторів СК2 як серед уже відомих класів інгібіторів серин-треонінових кіназ, так і серед комбінаторних бібліотек хімічних речовин з використанням молекулярного дизайну. Метою даної роботи було проаналізувати й узагальнити дані про відомі інгібітори цієї протеїнкінази з метою оптимізації та подальшого пошуку нових високоспецифічних її інгібіторів.

За хімічною структурою інгібітори СК2 можна поділити на поліпептиди, похідні бензimidазолу та бензотріазолу, флавоноїди, похідні антрахінону, кіназоліну, ізохіноліну, нафталіну, ксантену та флуорену. Серед поліпептидів виділяють поліглутамінові полімери та кополімери різного складу, гепарин [9—11]. Поліпептидні похідні виявляють високу гальмівну активність *in vitro* (K_i в межах наномолярних концентрацій), але *in vivo* пептиди під впливом ферментів клітини розщеплюються і дезактивуються. Тому серед інгібіторів СК2 основне місце посідають синтетично одержані та виділені з природних джерел «малі» молекули.

4,5,6,7-тетрабромобензотріазол (ТВВ) є специфічним високоселективним інгібітором СК2 (АТР/ГТР).



У роботі Lorenzo A. Pinna було тестовано 33 серин-треонінові (Ser/Thr-) і тирозинові (Tyr) протеїнкінази [12]. В експерименті використовували СК2, виділену з печінки щурів (*rat liver* СК2), та СК2 людини. У присутності ТВВ (10 μM) та 100 μM АТР тільки активність СК2 загальмовувалася на > 85 %, ще три кінази (фосфорилаз-кіназа (РНК), глікоген-синтеаз-кіназа β (GSK β), циклінзалежна кіназа 2/циклін А (CDK2/циклін А) пригнічувалася відповідно на 51, 36 і 30 %, усі інші кінази май-

же не гальмувалися. У таблиці 1 подано концентрації ТВВ (IC_{50}), при яких він пригнічує на 50 % активність різних кіназ.

Таблиця 1
Гальмування активності протеїнкіназ
4,5,6,7-тетрабромобензотріазолом (ТВВ)

Протеїнкіназа	IC_{50} (μM) \pm S.D.
СК2 (печінка щурів)	0,9 \pm 0,4
СК2 (людини)	1,6 \pm 0,3
СК1 (печінка щурів)	83,0 \pm 2,5
CDK1/циклін В	>100
CDK2/циклін А	15,6 \pm 2,1
GSK3 β	11,2 \pm 1,6
РНК	8,7 \pm 0,7

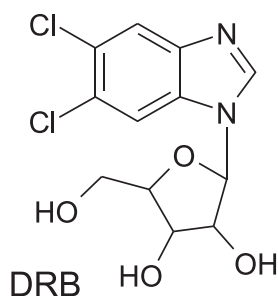
ТВВ також пригнічував ендогенну СК2 у культурі лімфоцитних клітин. Мutowана СК2, в якій замінено Val-66 на Ala, гірше гальмувалася ТВВ. IC_{50} ТВВ збільшувався у 27 разів і ставав близьким до IC_{50} інших інгібіторів широкого спектра дії, якщо використовувалася СК2, мutowана за Val66 та Ile174 [7]. Авторами статті [13] одержано кристал комплексу цієї кінази з інгібітором ТВВ. Установлено, що ТВВ взаємодіє з активним сайтом СК2 α , головним чином, за рахунок сил Ван-дер-Ваальса, досить щільно сідаючи у порожнину кишені. Один з атомів азоту п'ятичленного кільця ТВВ взаємодіє з двома зарядженими залишками Glu 81 та Lys 68 у глибині порожнини через дві молекули води. Gly-багата петля з проміжного положення у присутності косубстратів (АТР/ГТР) ТВВ займає верхнє положення. Селективність ТВВ пояснюється незначним, порівняно з іншими протеїнкіназами, розміром активного сайту СК2 і його сильною взаємодією з інгібітором.

У роботі [14] досліджено вплив ТВВ на СК2, виділену з різних джерел, у тому числі з дріжджів, та на рибосомну протеїнкіназу РК60S. Установлено, що ТВВ загальмовує СК2 з константою гальмування 0,7 μM , а РК60S — з $K_i=0,1$ μM .

Значно меншу гальмівну активність на СК2 порівняно з ТВВ виявляє хлор-похідна бензотріазолу — 4,5,6,7-тетрахлоробензотріазол (ТСbt) [15]. 4,5,6,7-Тетраметилбензотріазол також має меншу гальмівну властивість, хоча Ван-дер-Ваальсові радіуси метильної групи

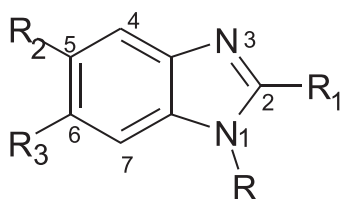
(2,0 Å) та бром (1,95 Å) значно не відрізняються за розмірами, але гідрофобність цієї групи є значно меншою за гідрофобність атома бром [16].

5,6-дихлоро-1-β-D-рибофуранозилбензimidазол (DRB або DiCl-RB) — селективний інгібітор СК2 (IC₅₀ ~ 6 μM) (www.calbiochem.com).



Крім СК2, DRB пригнічує кіназу, що стимулює інсулін, цитозольну кіназу p70S6 і ДНК-полімерази II.

У роботі [17] з метою пошуку оптимальної структури інгібітора синтезовано й тестовано 17 похідних бензimidазолу (табл. 2). Усі аналоги було тестовано з концентрацією 30 μM у присутності АТФ і казеїну як субстрату.



Ці дані свідчать про те, що незаміщений бензimidазол (Bz) та його нуклеозидна похідна (RB) майже не мають гальмівних властивостей. Наявність галогенів у положеннях 5 і 6 бензimidазольного циклу критична. Інгібіторні властивості зменшуються у ряду: diBr >> monoBr > diCl > diI >> diF > diH. Слабкі інгібіторні властивості глікозидних похідних фтор- та незаміщеного бензimidазолу автори пов'язують з недостатнім розміром замісників і, внаслідок цього, існування молекул переважно у син-конформації щодо глікозидного зв'язку; замісники, більші за атоми водню та фтору, сприяють анти-конформації. Наявність замісників (CH₃;CF₃) у другому положенні бензimidазолу та заміна рибози на арабінозу суттєво не зменшує інгібіторних властивостей. Таким чином, знайдено три інгібітори (DiBr-RB, Br-RB і DiBr-AB), кращі у порівнянні з відомим комерційним інгібітором DRB. Перший, на відміну від DRB, майже на 35 % сильніше пригнічує СК2 (табл. 3). Досліджено гальмування цієї протеїнкінази у присутності АТФ та GTP як фосфатних донорів. Для DiBr-RB константа гальмування — K_i: 2 μM (GTP); 6 μM (АТФ). Приблизна рівність цих величин свідчить про АТФ/GTP конкурентне зв'язування активного сайту СК2 з невеликою перевагою до GTP фосфатного донора. Дані про інгібування протеїнкінази DiBr-RB, подані в табл. 3, свідчать про

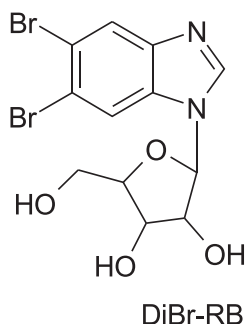
Таблиця 2

Дія похідних DRB на активність СК2

№	R	R ₁	R ₂	R ₃	Абревіатура	СК2 активність, %
1.	β-рибофураноза	H	H	H	RB	98
2.	β-рибофураноза	H	F	F	DiF-RB	91
3.	β-рибофураноза	H	Cl	Cl	DiCl-RB	51
4.	β-рибофураноза	H	Br	Br	DiBr-RB	16
5.	β-рибофураноза	H	H/Br	Br/H	Br-RB	49
6.	β-рибофураноза	H	H/I	I/H	I-RB	49
7.	β-рибофураноза	CH ₃	Cl	Cl	2-CH ₃ -DiCl-RB	60
8.	β-рибофураноза	CF ₃	Cl	Cl	2-CF ₃ -DiCl-RB	66
9.	3'-O-CH ₃ -β-рибофураноза	H	Cl	Cl	3'-O-CH ₃ -DiCl-RB	54
10.	5'-O-фосфат-β-рибофураноза	H	Cl	Cl	DiCl-RB-5'-фосфат	64
11.	2'-деокси-β-рибофураноза	H	Cl	Cl	2'-деокси-DiCl-RB	56
12.	CH ₂ -O-CH ₂ CH ₂ OH	H	Cl	Cl	1-ацикло-DiCl-RB	83
13.	α-арабінофураноза	H	Cl	Cl	DiCl-AB	59
14.	α-арабінофураноза	H	Br	Br	DiBr-AB	46
15.	H	H	H	H	Bz	99
16.	H	H	Cl	Cl	DiCl-Bz	63

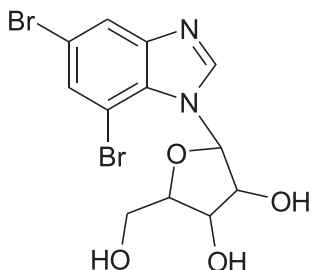
*№№ 5, 6 — суміш ізомерів моногалогенованих похідних бензimidазолу.

специфічність цього інгібітора саме до СК2 та меншою мірою до СК1.



Показано, що рибозид 5,7-дибромобензімідазолу існує в анти-конформації, виявляє високі гальмівні властивості, має специфічність до рослинної СК2 у 5—7 разів більшу, ніж до СК1. Збільшення кількості галогенів у ядрі бензімідазолу з двох до трьох сприяє підвищенню специфічності інгібітора до кінрази СК2 і зменшенню K_i з 24 до 4 μM [18].

Бензімідазольний аналог ТВВ — 4,5,6,7-тетрабромобензімідазол (ТВВz) гальмує СК2, одержані із дріжджів, печінки щурів, *Neurospora crassa*, *Candida tropicalis*, з константою загальмування K_i в межах 0,5—1,0 μM [16].

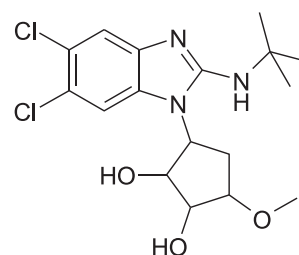


Уведення у друге положення 4,5,6,7-тетрабромобензімідазолу (ТВВz) сірки, галогенів, вторинних і третинних амінів дало можливість авторам [19] підвищити інгібіторні властивості одержаних сполук порівняно з незаміщеними.

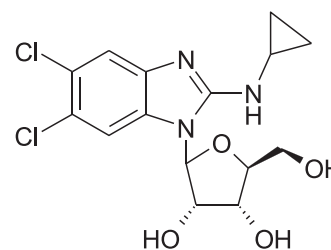
Упродовж останнього десятиліття велику кількість робіт присвячено пошуку препаратів проти людського цитомегаловірусу (HCMV) та

ВІЛ-1 (HIV-1) серед нуклеозидних галогенованих похідних бензімідазолу [20—28]. З'ясовано, що механізм їхньої дії полягає в пригніченні СК2, яка опосередковано посилює експресію гена HIV-1 або HCMV на транскрипційному рівні. Таким чином, інгібітори СК2 є інгібіторами транскрипції HIV-1. DRB уповільнює транскрипцію HIV-1 з ED50 = 2 μM саме через пригнічення цієї кінрази [20].

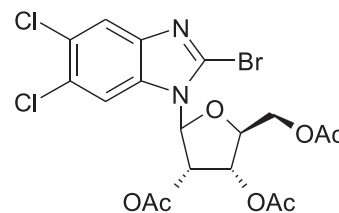
Запатентовано протівірусну активність цілої низки похідних 5,6-дихлорбензімідазолу проти HCMV, HIV-1, HSV-1:



$IC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ (HCMV на MRC5 клітинах) [23]



$IC_{50} = 0,06\text{—}1,23 \mu\text{M}$ (HCMV AD165 на MRC5 клітинах) [24]

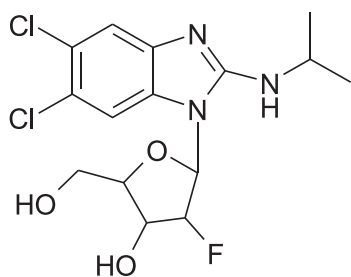


$IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ (HCMV AD165) [25]

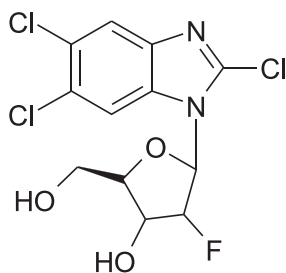
Таблиця 3

Дія DiBr-RB (30 μM) на активність кіназ

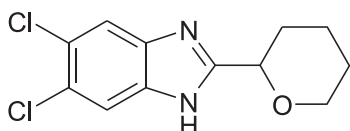
Ser/Thr- кінрази	Активність, %	Tyr- протеїнкінази	Активність, %
СК2 (печінка щурів)	20	ТРК-I	101
СК-ІІВ (з кукурудзи)	21	ТРК-ІА	99
СК1	48	ТРК-ІІВ	98
РКА	99	ТРК-ІІІ	84
РКС	97		
PRV-ПК	100		



$IC_{50} = 8,9 \pm 2,7 \mu M$ (HSMV) [26]

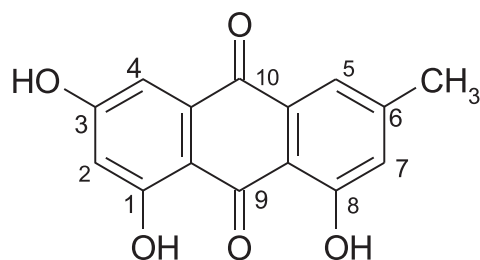


$IC_{50} = 50 \mu M$ (HSV-1) [27]



HSMV і протипухлинна активність на 19 лінійях ракових клітин [28]

1,3,8-тригідрокси-6-метилантрахінон (емодин) — похідна антрахінону, виділена з кореневищ *Reum palmatum* за допомогою екстракції етилацетатом, а також селективний інгібітор СК2 (IC_{50} 2 μM ; K_i 7,2 μM), механізм дії якого полягає у конкурентному зв'язуванні з АТФ-зв'язувальним сайтом.



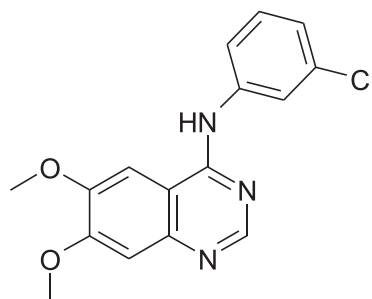
Емодин значно пригнічує активність цілого ряду серин-треонінових кіназ (циклін В/cdc2, РКА, РКС, СК1), але в концентраціях, які на 2—3 порядки є вищими порівняно із загальмуванням СК2 [29]. IC_{50} емодину зростає більш як на порядок і наближається до IC_{50} інших інгібіторів широкого спектра дії, якщо використовується СК2, мутована за Val66 та Ile174 [7, 12].

Рентгеноструктурне дослідження кристала комплексу СК2 з емодином показало, що зв'язування інгібітора з цією протеїнкіназою відбу-

вається за рахунок гідрофобної та Ван-дер-Ваальсової взаємодій. Найважливішу роль у зв'язуванні відіграє гідроксильна група в положенні 3 емодину, яка розташовується в кристалі поряд із His160 та Val45, Arg47-залишками, що належать до Gly-багатої петлі. Експеримент з мутованою СК2 у His160-залишку веде до незначного зменшення пригнічення емодином. Це свідчить про те, що His160 відіграє певну роль у кінетиці зв'язування інгібітора з активним сайтом. Критичність 3-ОН групи емодину доведено за допомогою похідних антрахінону — хризофанової кислоти, 1,8-дигідрокси-3-гідроксиметилантрахінону та 1,8-дигідроксиантрахінону, де ця група відсутня (табл. 4). Наявність у положенні 1 антрахінону електроноакцепторної нітрогрупи значно підвищує гальмівні властивості похідних антрахінону (табл. 4) [7].

Слід зазначити, що введення нітрогруп у структуру інгібіторів інших класів — флуорену та ксантенону — також значно підсилює гальмівні властивості цих сполук. У випадку похідних ксантенону — більш як на два порядки (табл. 5) [7]. Дані рентгеноструктурного дослідження кристала емодину з кукурудзяною СК2 свідчать про сусідство нітрогрупи з ϵ -аміногрупою Lys68, у результаті чого може утворюватися водневий зв'язок. Цим пояснюється підсилення гальмівних властивостей при введенні в молекулу інгібітора нітрогрупи [7].

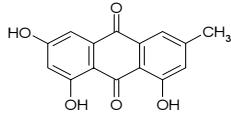
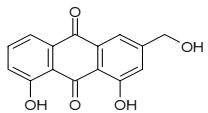
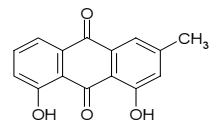
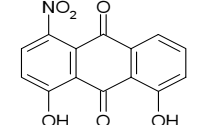
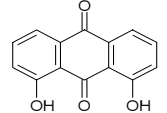
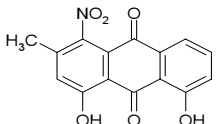
4-(3-Хлороаніліно)-6,7-диметоксихіназолін (тирфостин (tyrphostin) AG1478) відомий як високоспецифічний інгібітор тирозин-протеїнкінази (ТРК), а також рецептора епідермального фактора росту (EGFR) (IC_{50} 3 nM) [30].



У більших концентраціях він знижує активність СК2 (IC_{50} 25,9 μM) і є представником нового хіназолінового класу інгібіторів цієї протеїнкінази [31]. У концентраціях $IC_{50} > 100 \mu M$ тирфостин гальмує активність PDGFR- та HER2-неу кіназ.

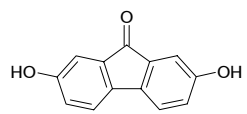
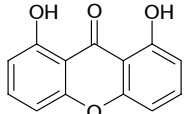
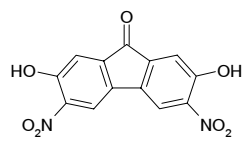
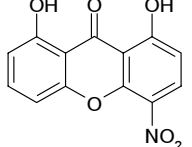
Таблиця 4

Пригнічення СК2 похідними емодину

Структура і назва інгібітора	IC ₅₀ (μM)	Структура і назва інгібітора	IC ₅₀ (μM)
	2,0		28,0
	>40		0,3
	>40		0,3

Таблиця 5

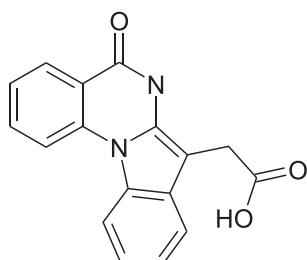
Гальмування СК2 похідними флуорену та ксантенону

Структура і назва інгібітора	IC ₅₀ (μM)	Структура і назва інгібітора	IC ₅₀ (μM)
	4,0		>40
	1,0		0,4

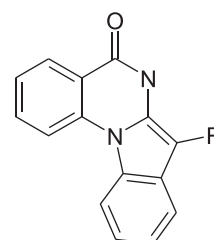
Для ряду 4-амінохіназолінів та 4-амінохінолінів проводилися віртуальний скринінг і комп'ютерне моделювання [32], які дали змогу виділити з великого набору сполук найперспективніші та тестувати їх на СК2. Було виявлено, що похідні хіназоліну, які мають у четвертому положенні залишок м-амінобензойної кислоти, мають більшу гальмівну активність, ніж амінохіназоліни [33].

Використання високотехнологічного докінгу (High-Throughput Docking) дозволило авторам статті [34] з великого масиву у майже 400 000 сполук вибрати всього 12 і тестувати їх на СК2.

(5-оксо-5,6-дигідроіндоло[1,2-а]хіназолін-7-іл)оцтова кислота гальмує активність СК2 з IC₅₀ = 80 nM.



Відсутність карбоксильної групи у структурі інгібітора призводить до зменшення гальмівних властивостей (табл. 6).



Таблиця 6

СК2-інгібіторні властивості 7-заміщених похідних індолахіназолону

R	IC ₅₀ (μM)	% пригнічення при 10 μM
CH ₃	–	12
CH ₂ COOH	0,080	97
CH ₂ CH ₂ OH	–	48

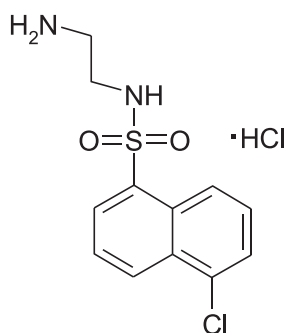
Селективність дії (5-оксо-5,6-дигідроіндо-
ло[1,2-а]хіназолін-7-іл)оцтової кислоти на СК2
було досліджено на 20 кіназах [34] (табл. 7).

Таблиця 7
Пригнічення активності кіназ
при дії 10 μM (5-оксо-5,6-дигідроіндо-
ло[1,2-а]хіназолін-7-іл)оцтової кислоти

Кіназа	% пригні- чення	Кіназа	% пригні- чення	Кіназа	% пригні- чення
СК2	97	IGF-1R	44	CDK1	51
c-Abl	25	c-Raf-1	30	c-src	0
HER-1	12	PDGFRb	11	Flt-4	30
HER-2	29	c-Kit	31	Tek	36
KDR	54	PKA	51	PDK1	9
Flt-3	41	PKB	30	Flt-1	21
c-Met	40	Ins-R	23		

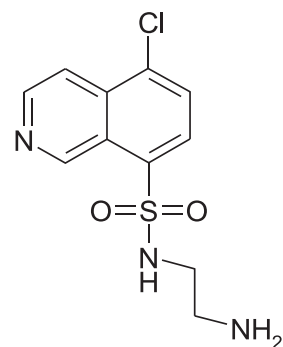
Таким чином, використання найсу-
часніших комп'ютерних технологій дало ав-
торам [34] можливість знайти новий селек-
тивний інгібітор СК2 — (5-оксо-5,6-дигідро-
індоло[1,2-а]хіназолін-7-іл)оцтову кислоту.

**N-(2-Аміноетил)-5-хлоронафтален-1-суль-
фонамід, HCl (A3)** — інгібітор широкого спект-
ра дії, у низьких концентраціях пригнічує ак-
тивність цілої низки кіназ, у тому числі й СК2
(www.calbiochem.com): СК2 ($K_i = 5,1 \mu\text{M}$); СК1
($K_i = 80 \mu\text{M}$); PKA ($K_i = 4,3 \mu\text{M}$); PKC ($K_i = 47 \mu\text{M}$);
PKG ($K_i = 3,8 \mu\text{M}$); myosin light chain kinase (K_i
 $= 7,4 \mu\text{M}$).



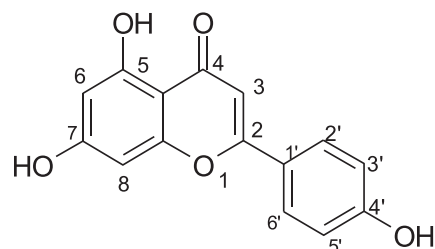
**N-(2-Аміноетил)-5-хлороізохінолін-8-
сульфамід (СКІ-7)** — інгібітор ізохінолінового
ряду, за структурою подібний до інгібітора
нафталенового ряду А-3, виявив гальмівну
дію на СК1 ($K_i = 8,5 \mu\text{M}$), а в більших концент-
раціях — на СК2 ($K_i = 70 \mu\text{M}$) [35].

Інші відомі інгібітори широкого спектра дії
ізохінолінового ряду (Н-89; Н-9; НА 1004) не
пригнічували СК2.



Флавоноїдні похідні

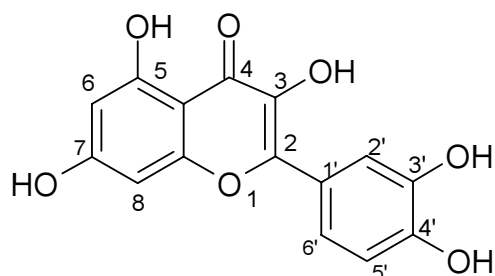
4',5,7-Тригідроксифлавоон (апігенін) — ос-
новний компонент трав'яної ромашки (Herba
chamomillae). Він міститься у багатьох фрук-
тах, городині, трав'яних напоях (ромашково-
му чаї та вині), виявляє інгібіторні власти-
вості щодо СК2, близькі до DRB та емодину.



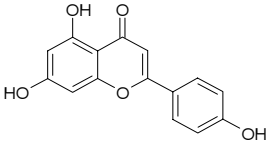
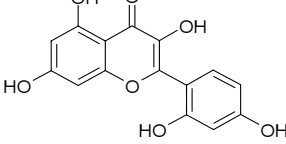
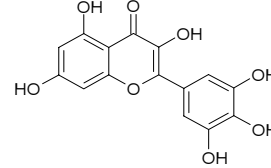
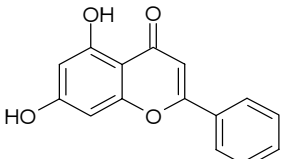
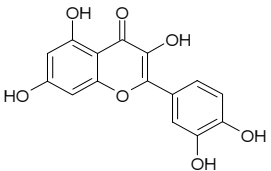
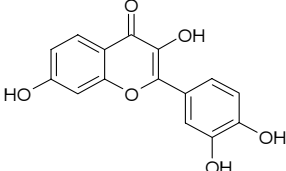
У роботі [6] досліджувалося виживання ра-
кових клітин залежно від наявності Аро2L/
TRAIL — активатора апоптозу та інгібіторів
СК2 (10 μM і 20 μM DRB, емодину та апігеніну).
У статті [7] зазначено, що СК2 людини
пригнічується апігеніном з $\text{IC}_{50} = 0,8 \mu\text{M}$.

**3,3',4',5,7-Пентагідроксифлавоон (кверци-
тин)**, на відміну від апігеніну, має додатково дві
гідроксильні групи в положеннях 3 і 3'. Він відо-
мий як інгібітор P13k-кінази ($\text{IC}_{50} 3,8 \mu\text{M}$), фос-
фоліпази А2 ($\text{IC}_{50} 2 \mu\text{M}$) (www.calbiochem.com).

У роботі [8] було тестовано кверцитин на 25
кіназах, включаючи СК2. У всіх дослідах вико-
ристовували кверцитин у концентрації 20 μM ,
СК2-кіназна активність у такому разі пригнічу-
валася на 80 % (табл. 9). У дослідженні [7]



Гальмування СК2 флавоноїдами

Структура і назва інгібітора		IC ₅₀ (μM)	Структура і назва інгібітора		IC ₅₀ (μM)
	4',5,7-Тригідрокси-флавоон (апігенін)	0,8		2',3,4',5,7-Пентагідроксифлавоон (морин)	10,0
	3,3',4',5,7-Пентагідрокси-флавоон (кверцитин)	0,55		5,7-Дигідрокси-флавоон (хризин)	9,0
	3,3',4',5,5',7-Гексагідрокси-флавоон (мірицетин)	0,92		3,3',4',7-Тетрагідрокси-флавоон (фізетин)	0,35

Таблиця 9

Пригнічення протеїнкіназ кверцитином (20 μM)

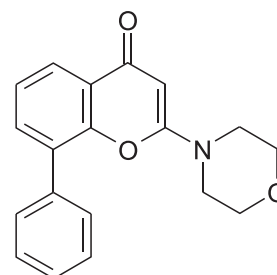
Протеїнкінази	Активність, %	Протеїнкінази	Активність, %
PKA	104±6	S6K1	25±0
CK2	19±3	GSK3	30±1
МАРКАР-K1b	20±3	ROCK-II	55±2
PRAK	68±6	AMPK	16±0
MSK1	51±2	RHK	32±4
PKB	99±2	PDK1	81±4
PKC	70±1	CHK1	56±1
SGK	35±0	PI3k	18±2

виміряно концентрацію кверцитину, при якій активність СК2 людини пригнічується на половину: IC₅₀ = 0,55 μM. Таким чином, наявність двох гідроксигруп порівняно з апігеном підвищує гальмівні властивості одержаного флавоноїду кверцитину.

Додаванням ще однієї гідроксигрупи в положення 5' одержано мірицетин, але його гальмівні властивості виявилися нижчими за показники апігеному та кверцитину (табл. 6). Інші флавоноїди — хризин та морин — мали на порядок меншу гальмівну активність. У випадку хризину на активність вплинула відсутність гідроксигруп у другому фенільному кільці; у випадку морину 2'-ОН група у фенільному кільці призвела до зменшення активності. Найактивнішим інгібітором серед флавоноїдів виявився фізетин (IC₅₀ = 0,35 μM). Слід зазначити, що у разі використання СК2,

мутованої у Val66-залишку, IC₅₀ фізетину та кверцитину майже не змінювалася, а хризину, морину й апігеному збільшувалася в декілька разів. Одержані дані дали змогу зробити висновки про те, що різні флавоноїди мають різну орієнтацію в активному сайті СК2 залежно від положення та кількості гідроксильних груп у їхній структурі [7].

2-(4-Морфолініл)-8-феніл-4Н-1-бензопіран-4-он (LY 294002) — селективний інгібітор PI3k-кінази (IC₅₀ 1,4 μM) та СК2 (IC₅₀ 6,9 μM),



Пригнічення протеїнкіназ інгібітором LY 294002 (50 μM)

Протеїнкінази	Активність, %	Протеїнкінази	Активність, %
PKA	104±6	S6K1	25±0
СК2	19±3	GSK3	30±1
МАРКАР-K1b	20±3	ROCK-II	55±2
PRAK	68±6	АМРК	16±0
MSK1	51±2	PHK	32±4
PKB	99±2	PDK1	81±4
PKC	70±1	CHK1	56±1
SGK	35±0	PI3k	18±2

що також належить до класу флавоноїдів. Необхідно відмітити, що активність інших протеїнкіназ лише несуттєво пригнічується під дією LY 294002 порівняно з впливом цього інгібітора на активність СК2 (табл. 10) [8].

Висновки. Отже, серед відомих інгібіторів протеїнкінази СК2 найефективнішими є ТВВ, 1,8-дигідрокси-4-нітроксантен-9-он (V2), флавоноїди фізетин та кверцитин, (5-оксо-5,6-ди-

гідроіндоло[1,2-а]хіназолін-7-іл)оцтова кислота, IC_{50} яких знаходяться в межах від 0,08 до 1,6 μM. Але специфічність цих інгібіторів, особливо флавоноїдів, є недостатньою для застосування в клінічних дослідженнях. Таким чином, пошуки високоспецифічних інгібіторів СК2, що пригнічували б її активність у наномолярних концентраціях, на сьогодні залишаються актуальними.

Inhibitors of protein kinase CK2

A. O. Prykhod'ko, G. G. Dubinina, S. M. Golovach, S. M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv-143, 03143, Ukraine

Abstract. This review presents general data on the CK2 inhibitors of various chemical structure. Protein kinase CK2 (CK2) has long been implicated in the regulation of cell growth and proliferation. The CK2 negative role has also been proven in some mechanisms accompanying cell-controlled apoptosis (anti-apoptotic protecting function). Thus, the CK2 is considered as a perspective target for anticancer drugs. Our review presents the results of the search of CK2 inhibitors among known classes of the serinethreonine kinase antagonists: flavonoids, benzimidazole and benztriazole derivatives, aromatic sulfamides, fluoren and xantenone derivatives and others. The comparative analysis of CK2 inhibitors and their efficacy, specificity and probable mechanism of binding to active site has been done.

Keywords: protein kinase, CK2, inhibitor, anticancer drugs.

Перелік літератури

1. Allende J.E., Allende C.C. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation // *FASEB J.* — 1995. — 9. — P. 313—323.
2. Pinna L. Protein Kinase CK2 // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 1997. — 29. — P. 551—554.
3. Marchiori F., Meggio F., Marin O., Borin G., Calderan A., Ruzza P., Pinna L. A. Synthetic peptide substrates for casein kinase 2. Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1988. — 971. — P. 332—338.
4. Marin O., Meggio F., Marchiori F., Borin G., Pinna L. A. Site specificity of casein kinase-2 (TS) from rat liver cytosol. A study with model peptide substrates // *Eur. J. Biochem.* — 1986. — 160. — P. 239—244.
5. Sheldin D.C., Leder P. Casein kinase Iia transgene-induced murine lymphomas: relation to theilerosis in cattle // *Science.* — 1995. — 267. — P. 894—897.
6. Ravi R., Bedi A. Sensitization of tumor cells to Apo2 ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of casein kinase II // *Cancer Res.* — 2002. — 62. — P. 4180—4185.
7. Sarno S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistuta R., Zanotti G., Pinna L. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors (In Process Citation) // *Pharmacol Ther.* — 2002. — 93, NN 2—3. — P. 159.
8. Davis S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors // *Biochem J.* — 2000. — 351. — P. 95—105.
9. Meggio F., Pinna L.A., Marchiori F., Borin G. Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases // *FEBS Lett.* — 1983. — 162, N 2. — P. 235—238.
10. Tellez R., Gatica M., Allende C.C., Allende J.E. Copolymers of glutamic acid and tyrosine are potent

- inhibitors of oocyte casein kinase II // *FEBS Lett.* — 1990. — 265, N 1—2. — P. 113—116.
11. Hathaway G.M., Lubben T.H., Traugh J.A. Inhibition of casein kinase II by heparin // *J. Biol. Chem.* — 1980. — 255, N 17. — P. 8038—8041.
 12. Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M., Davies S.P., Donella-Deana A., Shugar D., Pinna L. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 («casein kinase») // *FEBS Lett.* — 2001. — 496. — P. 44—48.
 13. Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L. A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetrabromo-benzotriazole // *Protein Sci.* — 2001. — 10. — P. 2200—2206.
 14. Szyszka R., Boguszevska A., Shugar D., Grankowski N. Halogenated benzimidazole inhibitors of phosphorylation, in vitro and in vivo, of the surface acidic proteins of the yeast ribosomal 60S subunit by endogenous protein kinases CK-II and PK60S // *Acta Biochim. Pol.* — 1996. — 43, N 2. — P. 389—396.
 15. Szyszka R., Grankowski N., Felczak K., Shugar D. Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK1 and CK2 from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* — 1995. — 208. — P. 418—424.
 16. Zien P., Bretner M., Zastapilo K., Szyszka R., Shugar D. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzoimidazole (TBBZ) as an ATP-competitive potent inhibitor of protein kinase CK2 from various sources // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2003. — 8, N 2A. — P. 613.
 17. Meggio F., Shugar D., Pinna L. A. Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1 // *Eur. J. Biochem.* — 1990. — 187, N 1. — P. 89—94.
 18. Dobrowolska G., Muszynska G., Shugar D. Benzimidazole nucleoside analogues as inhibitors of plant (maize seedling) casein kinases // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — 1080, N 3. — P. 221—226.
 19. Meggio F., Pagano M.A., Andrzejewska M., Cesaro L., Kazimierzczuk Z., Pinna L.A. Improving the efficiency of halogenated benzimidazole inhibitors of protein kinase CK2 // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2003. — 8, N 2A. — P. 594.
 20. Critchfield J.W., Coligan J.E., Folks T.M., Butera S.T. Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors // *Biochemistry.* — 1997. — 94. — P. 6110—6115.
 21. De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV-1) infection // *Med. Res. Rev.* — 2000. — 20, N 5. — P. 323—349.
 22. Zou R., Kawashima E., Freeman G.A., Koszalka G.W., Drach J.C., Townsend L.B. Design, synthesis, and antiviral evaluation of 2-deoxy-D-ribosides of substituted benzimidazoles as potential agents for human cytomegalovirus infections // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids.* — 2000. — 19, NN 1—2. — P. 125—153.
 23. PCT Int. Appl. WO 96 07,646 (Cl. C07D235/20). Preparation of benzimidazolylcyclopentanes as antiviral nucleoside analogs / Townsend L. B., Daluge S. M. (Wellcome Foundation Limited; University of Michigan, UK), 14 March 1996, US Appl. 304,006, 9 Sep 1994; 99 pp.
 24. PCT Int. Appl. WO 96 01,833 (Cl. C07H19/052). Preparation of benzimidazole-containing nucleoside analogs as virucides / Chamberlain S. D., Koszalka G. W. (Wellcome Foundation Limited, UK), 25 Jan 1996, GB Appl. 94/13,724, 7 Jul 1994; 67 pp.
 25. PCT Int. Appl. WO 98 56,761 (Cl. C07D). Preparation of benzimidazole nucleosides as antivirals / Drach J. C., Townsend L. B., Boyd F. L., Chamberlain S. D., Daluge S. M., Deaton D. N., Andersen M. W., Freeman G. A. (Glaxo Group Limited; The Regents of the University of Michigan, UK), 17 Dec 1998, GB Appl. 97/14,552, 11 Jul 1997; 125 pp.
 26. U. S. US 5,840,743 (Cl. 514-395; A61K31/415). Preparation of benzimidazole nucleosides as antiviral agents / Townsend L. B., Drach J. C., Freeman G. A. (The reagents of the University of Michigan; Glaxo Wellcome Inc.), 24 Nov 1998, Appl. 786,696, 22 Jan 1997; 188 pp.
 27. PCT Int. Appl. WO 97 27,204 (Cl. C07H19/052). Modified benzimidazole nucleosides as antiviral agents / Townsend L. B., Drach J. C., Freeman G. A. (Regents of the University of Michigan; Glaxo Group Ltd), 31 Jul 1997, US Appl. 10,463, 23 Jan 1996; 49 pp.
 28. Novelli F., Tasso B., Sparatore F., Sparatore A. Synthesis and biological investigations of 2-(tetrahydrofuran-2'-yl) and 2-(tetrahydropyran-2'-yl)benzimidazoles // *Farmaco.* — 1997. — 52, NN 8—9. — P. 499—507.
 29. Yim H., Lee Yh., Lee SK. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as competitive inhibitor // *Planta Med.* — 1999. — 65, N 1. — P. 9—13.
 30. Gazit A., Chen J., App H., McMahon G., Hirth P., Chen I. et al. Tyrphostins IV—highly potent inhibitors of EGF receptor kinase. Structure-activity relationship study of 4-anilido-quinazolines // *Bioorg. Med. Chem.* — 1996. — N 4. — P. 1203—1207.
 31. Liu XG., Liang NC. Inhibitory effect and its kinetic analysis of tyrphostin AG1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme // *Acta Pharmacol Sin.* — 2002. — 23, N 6. — P. 556—561.
 32. Yakovenko A.O., Golub A.G., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M. Topbuilder — molecular topology building and chemical database processing software // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2003. — 8, N 2A. — P. 610.
 33. Ryabchenko N.M., Kukhareenko O.G., Sapelkin V.M., Dubinina G.G., Dmitrieva S.Y., Yarmoluk S.M. Studies on CK2 inhibition capacity of 4-aminoquinolines and 4-aminoquinazolines // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2003. — 8, N 2A. — P. 606.
 34. Vangrevelinghe E., Zimmermann K., Schoepfer J., Portmann R., Fabbro D., Furet P. Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking // *J. Med. Chem.* — 2003. — 46, N13. — P. 2656—2662.
 35. Chijiwa T., Hagiwara M., Hidaka H. A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis // *J. Biol. Chem.* — 1989. — 264(9). — P. 4924—4927.