Изучение биологической активности 4-замещённых-2-гидроксифенолов

Ракитина Т. В. , Юдкина О. В. , Смирнова Е. В. , Липкин А. В.

Институт биоорганической химии им. Акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институт Кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Российский Научный Центр «Курчатовский институт»

Одно из направлений таргетной терапии в онкологии связано с открытием фармакологического потенциала низкомолекулярных ингибиторов онкогенных тирозиновых киназ (ТК), предотвращающих связывание молекулы АТФ с активным центром фермента. Молекулярный механизм действия АТФ-конкурентных ингибиторов основан на образовании координированных водородных связей между ароматической аминогруппой и ароматическим азотом или кислородом карбонильной группы активного соединения и аминокислотами АТФ-связывающего участка ТК, которые имитируют водородные связи молекулы АТФ. Однако при ингибировании фосфоинозитид-3-киназы кверцитином и мирицетином в образовании водородных связей участвуют атомы кислорода гидроксифенильных групп данных флавоноидов.

С целью разработки новых ингибиторов терапевтически значимых ТК была изучена способность 4-замещённых-2-гидроксифенолов подавлять биологическую активность ТК в биохимическом тесте.

Исследуемые соединения: 1) 4-(2-метилциклогексил)-2-гидроксифенол, 2) 2-амино-4-(3,4-дигидроксифенил)-тиазол-1,3, 3) 4-фенил-2-гидроксифенол, 4) 2-(4-гидроксифенил)-4-(3,4-дигидроксифенил)-тиазол-1,3 - были предоставлены ООО Кембридж (http://chembridge.com/). Для оценки биологической активности химических соединений было отобрано 16 тирозиновых киназ, включающих 9 представителей 5 семейств рецепторных ТК и 6 представителей 5 семейств нерецепторных ТК. Для рецепторных и некоторых цитоплазматических ТК вместо полноразмерных белков были использованы фрагменты, содержащие киназные домены. Соответствующие кДНК были клонированы и экспрессированы в бакуловирусной системе экспрессии Bac-to-Bac (Инвитроген, США) в виде рекомбинантных белков, содержащих 6 гистидиновых остатков в N-концевых областях, что позволяло выделять все шестнадцать 6хГис-ТК в одну стадию с помощью металлохелатной аффинной хроматографии. Все белковые препараты были проанализированы с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и масс-спектрометрического анализа. Ферментативную активность 6хГис-ТК и способность исследуемых соединений ингибировать киназные мишени определяли путём прямого одностадийного измерения количества АТФ в киназной реакции с помощью люминесцентного реагента Kinase-Glo (Промега, США).

В результате проведённых исследований было показано, что все 4 соединения в концентрации 10 мкМ способны ингибировать активность 5-7 из 16 6хГис-ТК на 50% и более. Молекулярный докинг 4-замещённых-2-гидроксифенолов, проведённый на основе известных пространственных структур киназных доменов с помощью программы Lead Finder, показал высокую вероятность образования пары водородных связей между аминокислотами АТФ-связывающего участка ТК и атомами кислорода 2-гидроксифенильной группы. Следовательно, 4-замещённые-2-гидроксифенолы могут служить основой для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ.