

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 57.088.5

doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.543-556

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ CDK2 И CDK9 МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО СКРИНИНГА

Г.В. Андрианов, И.Г. Серебрянский

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия
Онкологический центр Фокс Чейз, г. Филадельфия, 19111, США*

Аннотация

Киназы являются важной частью многих сигнальных путей в клетках и благодаря этому они участвуют в регуляции множества процессов, таких как транскрипция, клеточный цикл, апоптоз, клеточная дифференциация, метаболизм и межклеточная коммуникация. Часто их повышенная активность связана с развитием разных онкологических, неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также с отклонениями в иммунной системе. Основной подход к лечению строится на антагонистическом подходе, когда соответствующее низкомолекулярное соединение ингибирует чрезмерную активность киназы. В работе при помощи различных методов виртуального скрининга были отобраны 22 возможных ингибитора киназной активности CDK2 и CDK9, которые затем были проверены экспериментально. В результате удалось обнаружить одно соединение, обладающее $IC_{50} < 2$ мкМ для обеих киназ.

Ключевые слова: виртуальный скрининг, структурное выравнивание, минимизация энергии комплекса лиганд – мишень, протеинкиназа, CDK2, CDK9

Введение

В человеческом геноме закодировано 518 киназ, которые катализируют перенос γ -фосфатного остатка аденозинтрифосфата (АТФ) на гидроксильную группу тирозина, серина или треонина белка-мишени [1, 2]. Этот процесс является фундаментальным для регуляции сигнальных путей, поскольку способствует формированию ответа на стимул, и благодаря этому киназы участвуют практически в каждом физиологическом процессе, протекающем в клетке, начиная с регуляции апоптоза, клеточного цикла, транскрипции, дифференциации и метаболизма и заканчивая регуляцией клеточной подвижности и развитием цитоскелета, а также межклеточной коммуникацией [3–5].

Множество типов онкологических, неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний, так же как и отклонений в иммунной системе, связано с чрезмерной активностью киназ, которая часто вызвана активирующими мутациями в их каталитическом домене [6, 7]. Было показано, например, что замена гидрофобной аминокислоты V600 (валин) на заряженную E600 (глутаминовая кислота) в каталитическом домене киназы B-Raf дестабилизирует контакты и способствует переходу в активную конформацию, что, в свою очередь, приводит к неконтрольной

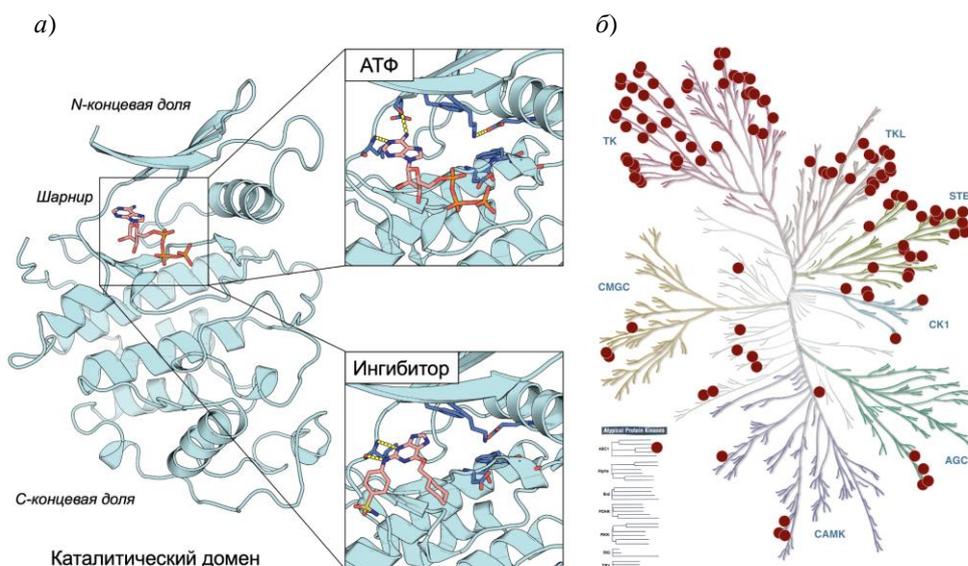


Рис. 1. *а)* структура каталитического домена CDK9 (PDB: 3BLQ) и детальное представление положения АТФ и ингибитора в АТФ-связывающем кармане; *б)* неселективное действие ингибитора дасатиниба (исходно отобранного как ингибитор киназы ABL) на кином человека. Киназы, чувствительные к действию дасатиниба, показаны темно-красными точками

пролиферации клеток [8–10]. По некоторым оценкам [11], бесконтрольная активность 85% всех киназ человека так или иначе связана с возникновением хотя бы одного заболевания.

Таким образом, киназы являются перспективными мишенями для разработки новых стратегий лечения заболеваний. Ингибирование их активности, как правило, основано на антагонистическом подходе, когда специально подобранные соединения конкурируют с АТФ за связывание с каталитическим доменом (рис. 1, *а*). В настоящее время одобрено к клинической практике 63 ингибитора, и их число растет с каждым годом [12]. Но из-за того, что АТФ-связывающий сайт является достаточно консервативным, селективность остается одной из главных проблем при разработке новых лекарственных средств (рис. 1, *б*) [13, 14].

Таким образом, поиск и разработка новых безопасных и эффективных ингибиторов является сложной задачей, поскольку требует всестороннего изучения их действия на кином человека. Экспериментальная проверка таких соединений является чрезвычайно дорогим процессом как по ресурсам, так и по времени, поэтому активно применяются различные методы виртуального скрининга, которые позволяют оценивать перспективность соединений с помощью вычислительных методов [15]. Благодаря этому оказалось возможным отсортировать значительное число неэффективных соединений уже на первоначальном этапе исследования, что, в свою очередь, положительно сказалось как на времени, необходимом для исследования, так и на трудозатратности при поиске новых ингибиторов.

1. Материалы и методы

1.1. Материалы. Четыре библиотеки для скрининга (Advanced, HTS, Premium, Functional), которые суммарно содержат около 2.8 млн соединений, были получены с сайта компании Enamine. Из библиотек были извлечены все соединения, обладающие аминотиазольным скаффолдом, общее количество которых составило 7809 соединений. В качестве шаблонов для структурного выравнивания были использованы 253 кристаллические структуры каталитического домена в активной конформации, связанные с низкомолекулярным ингибитором, обладающим аминотиазольным скаффолдом, и представленные в Protein Data Bank (PDB) [16]. Для определения эффективности взаимодействия исследуемых соединений были использованы кристаллические структуры каталитического домена CDK2 (PDB:3QHW) и CDK9 (PDB:3BLQ), из которых предварительно были удалены кофакторы, ионы буфера и АТФ.

1.2. Предварительная обработка библиотеки химических соединений. Физико-химические свойства каждого из соединений были вычислены при помощи программы OpenEye QUACPAC v2.1.2.1 (с параметром ионизации pH 7.4). Для нашего исследования при помощи скрипта molprotable.py (OpenEye OEChem v2021.1.1) были отобраны только такие соединения, которые подчинялись «правилу пяти» Липинского и были предсказаны как растворимые и не склонные к агрегации.

1.3. Генерация 3D конформеров. Все соединения в библиотеках представлены в текстовом двумерном формате SMILES, для них необходимо было создать всевозможные трехмерные конформеры (рис. 2). Для этого было использовано программное обеспечение OpenEye OMEGA v4.0.0.4 [17], которое генерирует наборы трехмерных конформаций соединений на основе заложенного в основу программы набора кристаллических структур отдельных малых фрагментов, использовавшихся для построения предварительной трехмерной структуры с последующей оптимизацией при помощи параметрического силового поля MMFF94s. В данном случае для каждого соединения было сгенерировано до 100 всевозможных трехмерных структур с отсевом дубликатов по среднеквадратичному отклонению (RMSD) $< 0.5 \text{ \AA}$.

1.4. Структурное выравнивание. Набор трехмерных конформеров был выровнен относительно каждой структуры из набора положений известных киназных ингибиторов с помощью программного обеспечения OpenEye ROCS v3.4.0.4 (рис. 2) [18]. Этот инструмент позволяет оптимизировать наложение исследуемой структуры на фармакофор или на набор трехмерных шаблонов и вычислить геометрическое сходство между ними через атом-центрированные гауссовы функции. В данном случае для определения геометрического подобия использовался индекс TanimotoCombo, состоящий из двух отдельных значений: ShapeTanimoto, которое отражает сходство относительно молекулярных объемов, и ColorTanimoto, которое определяет наложение различных типов атомов – donor, acceptor, anion, cation, hydrophobe и ring. Значение TanimotoCombo варьирует от 0 до 2, где “0” отражает совершенно непохожие соединения, а “2” –

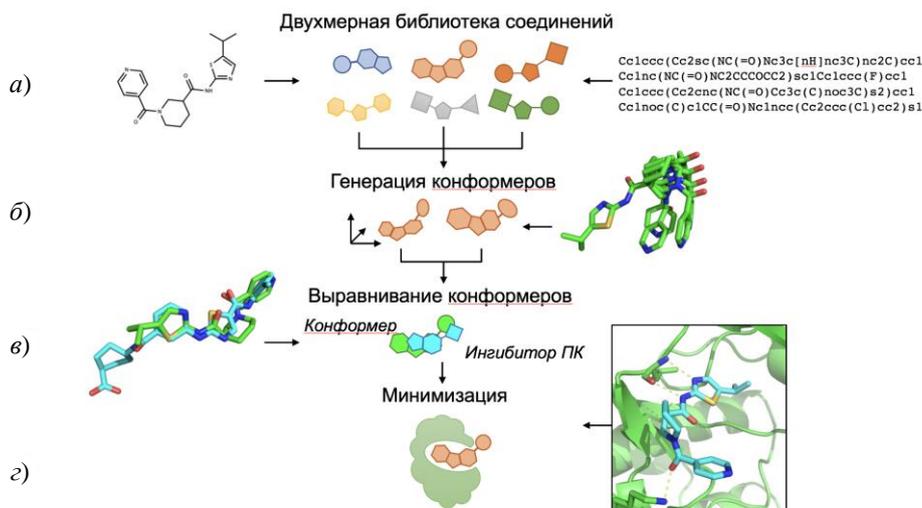


Рис. 2. Шаги виртуального скрининга для поиска новых ингибиторов киназной активности: а) двухмерная библиотека соединений, представленная в текстовом формате; б) генерация трехмерных конформеров для соединения; в) выравнивание полученных конформеров относительно набора известных ингибиторов киназ; г) минимизация энергии взаимодействия выровненных конформеров в комплексе со структурой каталитического домена киназы

идентичные. В ходе каждого выравнивания весь набор конформеров был выровнен относительно каждого шаблона, при этом было отобрано 20 лучших (по оценке TanimotoCombo) конформеров.

1.5. Минимизация энергии взаимодействия комплекса лиганд – мишень. Для всех атомов каждого выровненного конформера были вычислены парциальные заряды при помощи зарядовой схемы AM1BCC, реализованной в OpenEye QUACPAC v2.1.2.1. Затем каждый из них подвергался параметризации для создания файла с топологией данной трехмерной структуры. Параллельно с этим каждый такой конформер был помещен в АТФ-связывающий сайт CDK2 и CDK9, структуры которых были предварительно выровнены относительно каталитического домена киназы известного ингибитора. Далее все сгенерированные лиганд-белковые комплексы подвергались минимизации при помощи программного пакета для биомолекулярного моделирования PyRosetta 2020.50+release.1295438 [19] для того, чтобы оптимизировать положение лиганда относительно белка с энергетической точки зрения (рис. 2). На последнем этапе вычислялась энергия взаимодействия лиганда с белком, которая была определена как разность полных энергий связанного и несвязанного комплексов.

1.6. Определение эффективности ингибирования активности киназ *in vitro*. Проверка отобранных соединений *in vitro* проводилась в сотрудничестве с компанией Reaction Biology Corporation (США). Тестируемые соединения были инкубированы совместно с исследуемой киназой, субстратом, кофакторами и смесью меченой (^{33}P) и немеченой АТФ, затем было вычислено количество радиоизотопа на субстрате киназы относительно контроля.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Структурное сходство с известными ингибиторами киназ. В настоящем исследовании мы сосредоточились на поиске новых соединений, которые содержали бы аминотиазольное кольцо, которое присутствует во многих структурах высокоэффективных ингибиторов киназной активности [20–22]. Для этого были отобраны все соединения из четырех химических библиотек компании Enamine (Advanced, HTS, Premium, Functional), которые имели этот фрагмент в своей структуре (и удовлетворяли общепринятым требованиям к потенциальным лекарственным соединениям); в конечном итоге их количество составило 7809.

В ходе выравнивания трехмерных конформеров отобранного набора соединений относительно структур известных ингибиторов киназ из PDB, содержащих аминотиазольный остов, было выявлено, что большинство соединений имеет сходство с шаблонами в диапазоне 1.0–1.2 (рис. 3, *a*). Это указывает на то, что в большинстве структур встречаются определенные структурные мотивы, которые имеются у известных ингибиторов киназ и могут повысить шансы того, что соединение будет взаимодействовать с АТФ-связывающим доменом киназ, в то время как «несовпадающая» часть направлена на оптимизацию аффинности с мишенью. Минимальное сходство с шаблонами составило около 0.75, что указывает на то, что данное соединение не имеет аналогов в PDB, а максимальное – 1.65, что указывает на структурное сходство («объем») и совпадение различных типов атомов.

Однако распределение использованных для выравнивания шаблонов является неравномерным, и 51 шаблон имел лучшее значение структурного сходства для 50% всех соединений в отобранном наборе (рис. 3, *б*). В свою очередь, это говорит о том, что аминотиазол-содержащие соединения имеют ограниченное структурное разнообразие и являются аналогичными только 51 киназному ингибитору в PDB, имеющему аминотиазольный мотив в своем остове. При проверке мы смогли выяснить, что у большинства соединений этот фрагмент располагается в центре структуры, что, в свою очередь, позволяет предположить, что он может быть использован для взаимодействия с шарнирным регионом АТФ-связывающего домена киназ.

2.2. Энергия взаимодействия и селективность соединений между CDK2 и CDK9. В ходе минимизации выровненных соединений в комплексе с киназами CDK2 и CDK9 мы смогли выявить, что для этих мишеней распределения энергий взаимодействий схожи (рис. 3, *в*): от –5 до –42 REU (энергетические единицы Розетты) с медианой –23.78 REU для CDK2 и от –5 до –37 REU с медианой –24.18 REU для CDK9.

Многие эффективные АТФ-конкурентные ингибиторы киназ образуют несколько водородных связей с шарнирной петлей каталитического домена киназ подобно АТФ (рис. 1, *a*), поскольку это увеличивает шансы на то, что соединение свяжется с мишенью и будет правильно расположено относительно связывающего сайта. В ходе анализа библиотеки мы обнаружили, что классический мотив взаимодействия аминотиазольного каркаса с шарнирной петлей домена, обычно имеющий две водородных связи, был правильно воспроизведен только для 25% соединений в комплексе с CDK2, в то время как с CDK9 – для 38%.

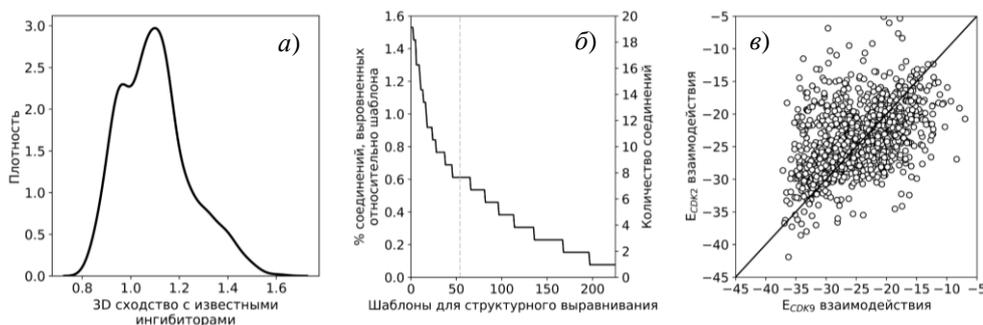


Рис. 3. Количественная характеристика аминотриазол-содержащих соединений в библиотеках Enamine: *a*) структурное сходство между исследуемыми соединениями и известными киназными ингибиторами; *б*) распределение использованных шаблонов для выравнивания, пунктирная линия показывает 50% соединений в библиотеке; *в*) энергия взаимодействия ингибиторов с CDK2 и CDK9

Кроме того, было выявлено, что «предпочитаемость» исследуемых соединений представлена неравномерно – около 43% соединений имело лучшую энергию взаимодействия с CDK2 и около 57% – с CDK9. Однако следует отметить, что максимально эффективное соединение было обнаружено для CDK2, его энергия взаимодействия составила -43 REU, в то время как в комплексе с CDK9 всего -36 REU.

В конечном итоге, после дополнительной проверки мы смогли отобрать 22 соединения с высокими значениями энергии взаимодействия и предполагаемой специфичностью относительно киназ CDK2 и CDK9, обладающие двумя и более водородными связями с шарнирной петлей киназного домена (табл. 1).

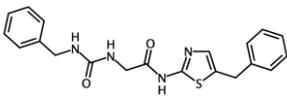
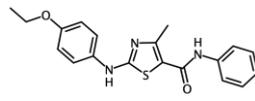
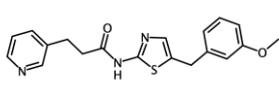
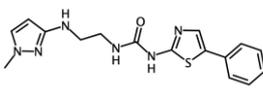
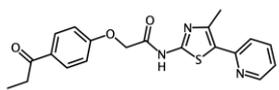
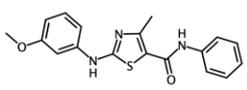
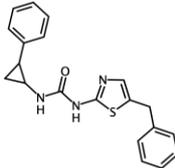
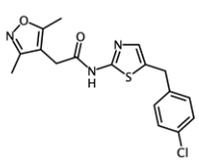
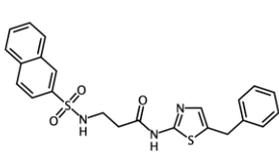
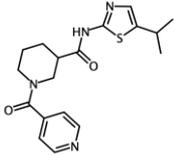
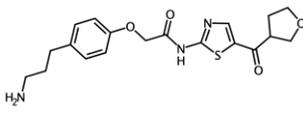
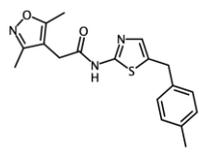
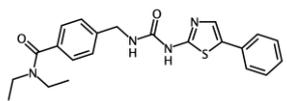
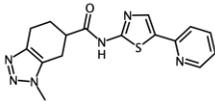
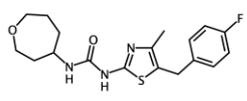
В ходе экспериментальной проверки активности соединений мы обнаружили, что только семь из них показали эффективность ингибирования ($IC_{50} < 20$ мкМ, и предсказанные различия в энергии взаимодействия между CDK2 и CDK9 были правильно определены только для двух соединений (рис. 4) – Z238156308, Z2177403824.

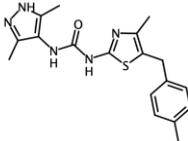
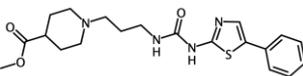
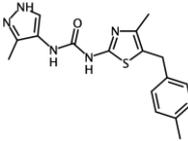
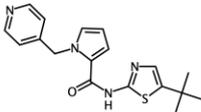
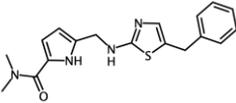
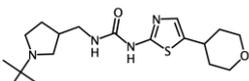
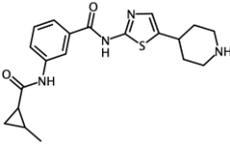
Наша работа позволила выявить как достоинства, так и ограничения использованного метода. С одной стороны, успешный отбор семи потенциальных кандидатов для подавления активности CDK2 или CDK9 (более 1/3 от виртуально идентифицированных соединений) свидетельствует об эффективности комбинирования методов виртуального скрининга с информацией об уже известных ингибиторах киназ. Такой подход является намного более результативным по сравнению не только с простым экспериментальным перебором, но и с применением скрининга с высокой пропускной способностью (HTS) [23].

С другой стороны, найденные вещества обладают сравнительно низкой активностью, поэтому потребуются значительные усилия по их доработке. Это является отчасти следствием относительно небольшого размера и структурного разнообразия использованной библиотеки. Для исследования всех возможных соединений только из компании Enamine (к настоящему времени их библиотека выросла уже до 19 млрд) примененным здесь методом потребовалось бы 882 года в параллельном исполнении на 2048 процессорах уровня i7-10700k, что значительно превышает возможности типичной научно-исследовательской

Табл. 1

Отобранные соединения для проверки *in vitro*

 <p>Z169536760 $E_{CDK2} = -31.08$ $E_{CDK9} = -33.38$</p>	 <p>Z48861625 $E_{CDK2} = -28.01$ $E_{CDK9} = -30.67$</p>	 <p>Z238156308 $E_{CDK2} = -32.62$ $E_{CDK9} = -33.66$</p>
 <p>Z1911365952 $E_{CDK2} = -28.79$ $E_{CDK9} = -32.05$</p>	 <p>Z238190978 $E_{CDK2} = -28.24$ $E_{CDK9} = -31.72$</p>	 <p>Z48853635 $E_{CDK2} = -31.93$ $E_{CDK9} = -35.85$</p>
 <p>Z826248620 $E_{CDK2} = -30.84$ $E_{CDK9} = -32.13$</p>	 <p>Z67764668 $E_{CDK2} = -35.44$ $E_{CDK9} = -35.12$</p>	 <p>Z212912350 $E_{CDK2} = -36.26$ $E_{CDK9} = -36.77$</p>
 <p>Z1265432563 $E_{CDK2} = -30.31$ $E_{CDK9} = -27.45$</p>	 <p>Z4452246830 $E_{CDK2} = -29.79$ $E_{CDK9} = -30.09$</p>	 <p>Z70864235 $E_{CDK2} = -36.74$ $E_{CDK9} = -36.89$</p>
 <p>Z411664372 $E_{CDK2} = -31.34$ $E_{CDK9} = -31.65$</p>	 <p>Z2177403824 $E_{CDK2} = -26.96$ $E_{CDK9} = -32.24$</p>	 <p>Z2294424157 $E_{CDK2} = -27.08$ $E_{CDK9} = -31.44$</p>

 <p>Z1995612474 $E_{CDK2} = -29.95$ $E_{CDK9} = -34.18$</p>	 <p>Z859023978 $E_{CDK2} = -27.31$ $E_{CDK9} = -32.30$</p>	 <p>Z1995613226 $E_{CDK2} = -27.10$ $E_{CDK9} = -34.32$</p>
 <p>Z1275191743 $E_{CDK2} = -32.73$ $E_{CDK9} = -32.91$</p>	 <p>Z1673531755 $E_{CDK2} = -33.12$ $E_{CDK9} = -32.48$</p>	 <p>Z2624229394 $E_{CDK2} = -30.78$ $E_{CDK9} = -30.04$</p>
 <p>Z2378678900 $E_{CDK2} = -25.37$ $E_{CDK9} = -35.24$</p>		

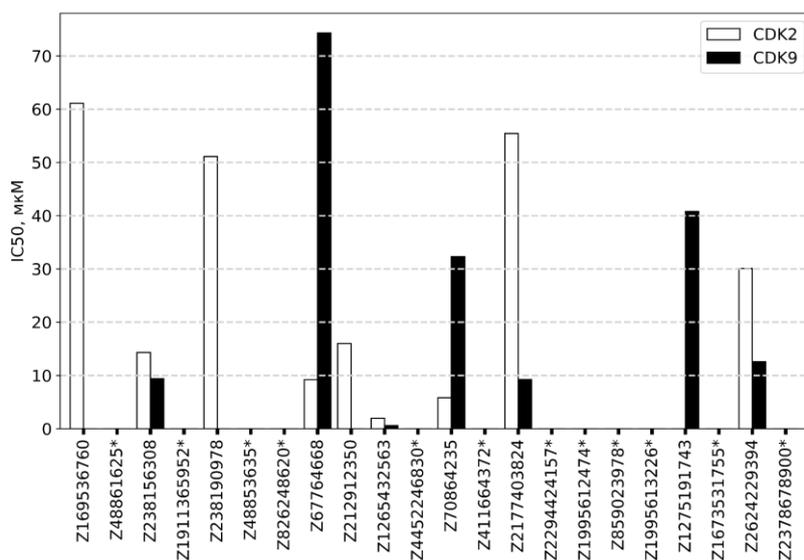


Рис. 4. Активность отобранных соединений *in vitro*. Соединения, отмеченные звездочкой, не показали какого-либо ингибирующего действия

группы. Становится очевидной необходимость разработки новых подходов, где наиболее перспективными являются методы машинного и глубокого обучения, а также стратегия фрагментно-ориентированной разработки новых лекарственных соединений (недавно примененная нами в [24]). Таким образом, полученные результаты позволяют создать научно-методическую базу для сравнения результативности новых разработанных подходов виртуального скрининга с традиционными.

Заключение

В работе представлены результаты поиска новых ингибиторов киназ CDK2 и CDK9. Сам поиск был проведен на химических библиотеках компании Enamine с использованием различных методов виртуального скрининга – структурного выравнивания исследуемых соединений относительно набора известных ингибиторов киназ из PDB, минимизации комплекса лиганд-белок для оценки сродства соединения к мишени.

Данный подход позволил нам отобрать 22 соединения, которые обладали как необходимым сходством с известными ингибиторами (TanimotoCombo = 1.0–1.2), так и достаточной энергией взаимодействия с исследуемыми киназами. Экспериментальная проверка показала, что только семь соединений имеют эффективность ингибирования меньше 20 мкМ: Z238156308 и Z1265432563 для обоих киназ, Z67764668, Z212912350, Z70864235 для CDK2 и Z2177403824, Z2624229394 для CDK9.

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору Онкологического центра Фокс Чейз Дж. Караниколасу за возможность проведения исследования и доценту кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, кандидату биологических наук Н.И. Акберовой за критические комментарии и советы при написании рукописи.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Литература

1. *Hanks S.K.* Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: A perspective // *Genome Biol.* – 2003. – V. 4, No 5. – Art. 111, P. 1–7. – doi: 10.1186/gb-2003-4-5-111.
2. *Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S.* The protein kinase complement of the human genome // *Science.* – 2002. – V. 298, No 5600. – P. 1912–1934. – doi: 10.1126/science.1075762.
3. *Davis R.J.* Transcriptional regulation by MAP kinases // *Mol. Reprod. Dev.* – 1995. – V. 42, No 4. – P. 459–467. – doi: 10.1002/mrd.1080420414.
4. *Rauch J., Volinsky N., Romano D., Kolch W.* The secret life of kinases: Functions beyond catalysis // *Cell Commun. Signaling.* – 2011. – V. 9, No 1. – Art. 23, P. 1–28. – doi: 10.1186/1478-811X-9-23.
5. *Lu Z., Hunter T.* Metabolic kinases moonlighting as protein kinases // *Trends Biochem. Sci.* – 2018. – V. 43, No 4. – P. 301–310. – doi: 10.1016/j.tibs.2018.01.006.

6. *Bhullar K.S., Lagarón N.O., McGowan E.M., Parmar I., Jha A., Hubbard B.P., Rupasinghe H.* Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions // *Mol. Cancer.* – 2018. – V. 17, No 1. – Art. 48, P. 1–20. – doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
7. *Lahiry P., Torkamani A., Schork N.J., Hegele R.A.* Kinase mutations in human disease: Interpreting genotype–phenotype relationships // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – V. 11, No 1. – P. 60–74. – doi: 10.1038/nrg2707.
8. *Zaman A., Wu W., Bivona T.G.* Targeting oncogenic BRAF: Past, present, and future // *Cancers.* – 2019. – V. 11, No 8. – Art. 1197, P. 1–19. – doi: 10.3390/cancers11081197.
9. *Chavda J., Bhatt H.* Systemic review on B-Raf^{V600E} mutation as potential therapeutic target for the treatment of cancer // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – V. 206. – Art. 112675, P. 1–30. – doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112675.
10. *Zhao K., Zhou X., Ding M.* Molecular insight into mutation-induced conformational change in metastatic bowel cancer BRAF kinase domain and its implications for selective inhibitor design // *J. Mol. Graphics Modell.* – 2018. – V. 79. – P. 59–64. – doi: 10.1016/j.jmgm.2017.11.005.
11. *Wilson L.J., Linley A., Hammond D.E., Hood F.E., Coulson J.M., MacEwan D.J., Ross S.J., Slupsky J.R., Smith P.D., Eysers P.A., Prior I.A.* New perspectives, opportunities, and challenges in exploring the human protein kinome // *Cancer Res.* – 2018. – V. 78, No 1. – P. 15–29. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2291.
12. *Roskoski R. Jr.* Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update // *Pharmacol. Res.* – 2021. – V. 165. – Art. 105463, P. 1–21. – doi: 10.1016/j.phrs.2021.105463.
13. *Gani O.A., Thakkar B., Narayanan D., Alam K.A., Kyomuhendo P., Rothweiler U., Tello-Franco V., Engh R.A.* Assessing protein kinase target similarity: Comparing sequence, structure, and cheminformatics approaches // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – V. 1854, No 10, Pt. B. – P. 1605–1616. – doi: 10.1016/j.bbapap.2015.05.004.
14. *Modi V., Dunbrack R.L.* Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – V. 116, No 14. – P. 6818–6827. – doi: 10.1073/pnas.1814279116.
15. *Gagic Z., Ruzic D., Djokovic N., Djikic T., Nikolic. K.* *In silico* methods for design of kinase inhibitors as anticancer drugs // *Front. Chem.* – 2019. – V. 7. – Art. 873, P. 1–25. – doi: 10.3389/fchem.2019.00873.
16. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28, No 1. – P. 235–242. – doi: 10.1093/nar/28.1.235.
17. *Hawkins P.C.D., Nicholls A.* Conformer generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures // *J. Chem. Inf. Model.* – 2012. – V. 52, No 11. – P. 2919–2936. – doi: 10.1021/ci300314k.
18. *Hawkins P.C.D., Skillman A.G., Nicholls A.* Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools // *J. Med. Chem.* – 2007. – V. 50, No 1. – P. 74–82. – doi: 10.1021/jm0603365.
19. *Alford R.F., Leaver-Fay A., Jeliazkov J.R., O’Meara M.J., DiMaio F.P., Park H., Shapovalov M.V., Renfrew P.D., Mulligan V.K., Kappel K., Labonte J.W., Pacella M.S., Bonneau R., Bradley Ph., Dunbrack R.L., Das Rh., Baker D., Kuhlman B., Kortemme T., Gray J.J.* The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design // *J. Chem. Theory Comput.* – 2017. – V. 13, No 6. – P. 3031–3048. – doi: 10.1021/acs.jctc.7b00125.
20. *Andersen C.B., Wan Y., Chang J.W., Riggs B., Lee C., Liu Y., Sessa F., Villa F., Kwiatkowski N., Suzuki M., Nallan L., Heald R., Musacchio A., Gray N.S.* Discovery of selec-

- tive aminothiazole aurora kinase inhibitors // ACS Chem. Biol. – 2008. – V. 3, No 3. – P. 180–192. – doi: 10.1021/cb700200w.
21. Zhang H., Pandey S., Travers M., Sun H., Morton G., Madzo J., Chung W., Khowsathit J., Perez-Leal O., Barrero C.A., Merali C., Okamoto Y., Sato T., Pan J., Garriga J., Bhanu N.V., Simithy J., Patel B., Huang J., Raynal N.J.-M., Garcia B.A., Jacobson M.A., Kadoch C., Merali S., Zhang Y., Childers W., Abou-Gharbia M., Karanicolas J., Baylin S.B., Zahnow C.A., Jelinek J., Graña X., Issa J.-P.J. Targeting CDK9 reactivates epigenetically silenced genes in cancer // Cell. – 2018. – V. 175, No 5. – P. 1244–1258. – doi: 10.1016/j.cell.2018.09.051.
22. Das J., Chen P., Norris D., Padmanabha R., Lin J., Moquin R.V., Shen Zh., Cook L.S., Doweiko A.M., Pitt S., Pang S., Shen D.R., Fang Q., de Fex H.F., McIntyre K.W., Shuster D.J., Gillooly K.M., Behnia K., Schieven G.L., Wityak J., Barrish J.C. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent *pan*-Src kinase inhibitor // J. Med. Chem. – 2006. – V. 49, No 23. – P. 6819–6832. – doi: 10.1021/jm060727j.
23. Doman T.N., McGovern S.L., Witherbee B.J., Kasten T.P., Kurumbail R., Stallings W.C., Connolly D.T., Shoichet B.K. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B // J. Med. Chem. – 2002. – V. 45, No 11. – P. 2213–2221. – doi: 10.1021/jm010548w.
24. Andrianov G.V., Ong W.J.G., Serebriiskii I., Karanicolas J. Efficient hit-to-lead searching of kinase inhibitor chemical space via computational fragment merging // J. Chem. Inf. Model. – 2021. – V. 61, No 12. – P. 5967–5987. – doi: 10.1021/acs.jcim.1c00630.

Поступила в редакцию
30.09.2021

Андрянов Григорий Васильевич, аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии; аспирант программы молекулярной терапии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Онкологический центр Фокс Чейз
Коттман авеню, д. 333, г. Филадельфия, 19111, США
E-mail: grigorii.andrianov@gmail.com

Серебрийский Илья Генрихович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии; доцент-исследователь программы молекулярной терапии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Онкологический центр Фокс Чейз
Коттман авеню, д. 333, г. Филадельфия, 19111, США
E-mail: ilya.serebriiskii@fccc.edu

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.543-556

**Identification of New Inhibitors of the Kinase Activity of CDK2 and CDK9
by Molecular Modeling and High-Efficiency Screening**

G.V. Andrianov*, I.G. Serebriiskii**

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, 19111 USA

E-mail: *grigorii.andrianov@gmail.com, **ilya.serebriiskii@fccc.edu

Received September 30, 2021

Abstract

Kinases are important components of many signaling pathways in a cell, and therefore they are involved in the regulation of such diverse processes as transcription, cell cycle progression, apoptosis, cell differentiation, metabolism, and intercellular communication. Their increased activity often results in the development of various oncological, neurological, and cardiovascular diseases, as well as of immune system disorders. Treatment is most frequently based on an antagonistic approach, when a small molecule compound inhibits excessive kinase activity. However, the ATP-binding site of kinases is highly conserved, which often causes these ATP-competitive inhibitors to cross-react with a variety of other kinases, resulting in low selectivity. Thus, the discovery and development of new safe and effective inhibitors is a challenging task because it requires a comprehensive study of their effects on the human kinome. The experimental validation of possible candidates is an extremely expensive procedure, and narrowing down selection of candidate targets *in silico* became an attractive approach in early drug discovery. Various approaches to virtual screening were developed, with the goal to increase the cost-effectiveness of drug development manifold by reducing the need for validation experiments. In this work, we applied a combination of different computational approaches to select 22 candidate inhibitors of the kinase activity of CDK2 and CDK9 and then tested them experimentally. Establishing a pipeline of virtual screening and subsequent validation made it possible to reveal the advantages and limitations of the methods used. About 1/3 of candidates were predicted correctly, including one compound with $IC_{50} < 2 \mu M$ for both kinases.

Keywords: virtual screening, structural alignment, energy minimization of ligand-target complex, protein kinase, CDK2, CDK9

Acknowledgements. We are grateful to J. Karanicolas, Professor at Fox Chase Cancer Center, for making this research possible and to N.I. Akberova, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Biotechnology at Kazan Federal University, PhD in Biology, for her critical reflections on the manuscript and valuable advice.

The study was supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program.

Figure Captions

Fig. 1. *a*) structure of the catalytic domain of CDK9 (PDB: 3BLQ) and a focused view of the binding mode of ATP and the inhibitor in the ATP-binding pocket; *b*) non-selective action of the kinase inhibitor dasatinib (initially developed as an ABL kinase inhibitor) on the human kinome. Dasatinib-responsive kinases are shown as dark red dots.

Fig. 2. Virtual screening strategy for the identification of new kinase inhibitors: *a*) 2D library of compounds in text format; *b*) generation of 3D conformers for each compound in the library; *c*) 3D alignment of the conformers relative to the position of known kinase inhibitors; *d*) minimization of the energy of interaction of the aligned conformers in complex with the catalytic domain of kinases.

Fig. 3. Quantitative characteristics of aminothiazole-containing compounds in the Enamine libraries: a) structural similarity between the compounds studied and known kinase inhibitors; b) distribution of templates used for alignment, the dotted line shows 50% of compounds in the library; c) energy of interaction of the inhibitors with CDK2 and CDK9.

Fig. 4. *In vitro* validation of the selected compounds. Compounds marked with an asterisk * showed no inhibitory effects.

References

- Hanks S.K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: A perspective. *Genome Biol.*, 2003, vol. 4, no. 5, art. 111, pp. 1–7. doi: 10.1186/gb-2003-4-5-111.
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934. doi: 10.1126/science.1075762.
- Davis R.J. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, vol. 42, no. 4, pp. 459–467. doi: 10.1002/mrd.1080420414.
- Rauch J., Volinsky N., Romano D., Kolch W. The secret life of kinases: Functions beyond catalysis. *Cell Commun. Signaling*, 2011, vol. 9, no. 1, art. 23, pp. 1–28. doi: 10.1186/1478-811X-9-23.
- Lu Z., Hunter T. Metabolic kinases moonlighting as protein kinases. *Trends Biochem. Sci.*, 2018, vol. 43, no. 4, pp. 301–310. doi: 10.1016/j.tibs.2018.01.006.
- Bhullar K.S., Lagarón N.O., McGowan E.M., Parmar I., Jha A., Hubbard B.P., Rupasinghe H. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer*, 2018, vol. 17, no. 1, art. 48, pp. 1–20. doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- Lahiry P., Torkamani A., Schork N.J., Hegele R.A. Kinase mutations in human disease: Interpreting genotype–phenotype relationships. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, vol. 11, no. 1, pp. 60–74. doi: 10.1038/nrg2707.
- Zaman A., Wu W., Bivona T.G. Targeting oncogenic BRAF: Past, present, and future. *Cancers*, 2019, vol. 11, no. 8, art. 1197, pp. 1–19. doi: 10.3390/cancers11081197.
- Chavda J., Bhatt H. Systemic review on B-Raf^{V600E} mutation as potential therapeutic target for the treatment of cancer. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, vol. 206, art. 112675, pp. 1–30. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112675.
- Zhao K., Zhou X., Ding M. Molecular insight into mutation-induced conformational change in metastatic bowel cancer BRAF kinase domain and its implications for selective inhibitor design. *J. Mol. Graphics Modell.*, 2018, vol. 79, pp. 59–64. doi: 10.1016/j.jmgm.2017.11.005.
- Wilson L.J., Linley A., Hammond D.E., Hood F.E., Coulson J.M., MacEwan D.J., Ross S.J., Slupsky J.R., Smith P.D., Evers P.A., Prior I.A. New Perspectives, Opportunities, and challenges in exploring the human protein kinome. *Cancer Res.*, 2018, vol. 78, no. 1, pp. 15–29. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2291.
- Roskoski R. Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol. Res.*, 2021, vol. 165, art. 105463, pp. 1–21. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105463.
- Gani O.A., Thakkar B., Narayanan D., Alam K.A., Kyomuhendo P., Rothweiler U., Tello-Franco V., Engh R.A. Assessing protein kinase target similarity: Comparing sequence, structure, and cheminformatics approaches. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, vol. 1854, no. 10, pt. B, pp. 1605–1616. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.05.004.
- Modi V., Dunbrack R.L. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, vol. 116, no. 14, pp. 6818–6827. doi: 10.1073/pnas.1814279116.
- Gagic Z., Ruzic D., Djokovic N., Djikic T., Nikolic K. *In silico* methods for design of kinase inhibitors as anticancer drugs. *Front. Chem.*, 2019, vol. 7, art. 873, pp. 1–25. doi: 10.3389/fchem.2019.00873.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- Hawkins P.C.D., Nicholls A. Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, vol. 52, no. 11, pp. 2919–2936. doi: 10.1021/ci300314k.

18. Hawkins P.C.D., Skillman A.G., Nicholls A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *J. Med. Chem.*, 2007, vol. 50, no. 1, pp. 74–82. doi: 10.1021/jm0603365.
19. Alford R.F., Leaver-Fay A., Jeliakov J.R., O'Meara M.J., DiMaio F.P., Park H., Shapovalov M.V., Renfrew P.D., Mulligan V.K., Kappel K., Labonte J.W., Pacella M.S., Bonneau R., Bradley Ph., Dunbrack R.L., Das Rh., Baker D., Kuhlman B., Kortemme T., Gray J.J. The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design. *J. Chem. Theory Comput.*, 2017, vol. 13, no. 6, pp. 3031–3048. doi: 10.1021/acs.jctc.7b00125.
20. Andersen C.B., Wan Y., Chang J.W., Riggs B., Lee C., Liu Y, Sessa F., Villa F., Kwiatkowski N., Suzuki M., Nallan L., Heald R., Musacchio A., Gray N.S. Discovery of selective aminothiazole aurora kinase inhibitors. *ACS Chem. Biol.*, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 180–192. doi: 10.1021/cb700200w.
21. Zhang H., Pandey S., Travers M., Sun H., Morton G., Madzo J., Chung W., Khowsathit J., Perez-Leal O., Barrero C.A., Merali C., Okamoto Y., Sato T., Pan J., Garriga J., Bhanu N.V., Simithy J., Patel B., Huang J., Raynal N.J.-M., Garcia B.A., Jacobson M.A., Kadoch C., Merali S., Zhang Y., Childers W., Abou-Gharbia M., Karanicolas J., Baylin S.B., Zahnow C.A., Jelinek J., Graña X., Issa J.-P.J. Targeting CDK9 reactivates epigenetically silenced genes in cancer. *Cell*, 2018, vol. 175, no. 5, pp. 1244–1258. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.051.
22. Das J., Chen P., Norris D., Padmanabha R., Lin J., Moquin R.V., Shen Zh., Cook L.S., Doweiko A.M., Pitt S., Pang S., Shen D.R., Fang Q., de Fex H.F., McIntyre K.W., Shuster D.J., Gillooly K.M., Behnia K., Schieven G.L., Wityak J., Barrish J.C. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent *pan*-Src kinase inhibitor. *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, no. 23, pp. 6819–6832. doi: 10.1021/jm060727j.
23. Doman T.N., McGovern S.L., Witherbee B.J., Kasten T.P., Kurumbail R., Stallings W.C., Connolly D.T., Shoichet B.K. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, no. 11, pp. 2213–2221. doi: 10.1021/jm010548w.
24. Andrianov G.V., Ong W.J.G., Serebriiskii I., Karanicolas J. Efficient hit-to-lead searching of kinase inhibitor chemical space via computational fragment merging. *J. Chem. Inf. Model.*, 2021, vol. 61, no. 12, pp. 5967–5987. doi: 10.1021/acs.jcim.1c00630.

Для цитирования: Андрианов Г.В., Серебрянский И.Г. Идентификация новых ингибиторов киназной активности CDK2 и CDK9 методами молекулярного моделирования и высокоэффективного скрининга // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2021. – Т. 163, кн. 4. – С. 543–556. – doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.543-556.

For citation: Andrianov G.V., Serebriiskii I.G. Identification of new inhibitors of the kinase activity of CDK2 and CDK9 by molecular modeling and high-efficiency screening. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2021, vol. 163, no. 4, pp. 543–556. doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.543-556. (In Russian)