

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

**Труш В'ячеслав Володимирович**

**УДК 577.152.313:547.639**

**ІНГІБУВАННЯ ПРОТЕЇНТИРОЗИНФОСФАТАЗИ ІВ  
ФОСФОНАТНИМИ ПОХІДНИМИ КАЛІКС[4]АРЕНІВ**

**02.00.10 – біоорганічна хімія**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук**

**Київ -2015**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі механізмів біоорганічних реакцій  
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

**Науковий керівник:** член-кореспондент НАН України,  
доктор хімічних наук, професор  
**Вовк Андрій Іванович**,  
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,  
завідувач відділу механізмів біоорганічних реакцій

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, старший науковий співробітник  
**Дубей Ігор Ярославович**,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач відділу синтетичних біорегуляторів

кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник  
**Родік Роман Васильович**,  
Інститут органічної хімії НАН України,  
завідувач лабораторії медико-біологічних досліджень

Захист відбудеться 23 жовтня 2015 р. о 10-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, 02094, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, 02094, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

Автореферат розісланий 22 вересня 2015 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

В.О. Євдокименко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Відомо, що рівень фосфорильованості білкових молекул контролюється протеїнтирозинкіназами і протеїнтирозинфосфатазами. В людському організмі знайдено більше сотні протеїнтирозинфосфатаз (РТРаз), що гідролізують фосфотирозинові залишки білків і виступають як модулятори сигнальної трансдукції. Зміни в активності таких фосфатаз можуть сприяти розвитку патологій, включаючи рак, метаболічні та автоімунні хвороби. Впливаючи на функціонування живих клітин, РТРази можуть бути біомішенями для розробки нових лікарських препаратів.

Останнім часом значні зусилля спрямовано на вивчення людської протеїнтирозинфосфатази 1В (РТР1В), висока експресія якої спостерігається в інсулін-чутливих тканинах. Встановлено, що надлишкова активність цього ензиму приводить до зниження рівня фосфорильованості амінокислотних залишків тирозину в структурі інсулінового та лептинового рецепторів, що спричиняє зменшення їх спорідненості до відповідних гормонів. Доведено, що миші з нокаутованим геном РТР1В мають підвищену чутливість до інсуліну та не схильні до надлишкової ваги, тобто, інгібітори РТР1В можуть бути застосовані для лікування діабету 2 типу та ожиріння. Синтетичні і природні інгібітори РТР1В інтенсивно вивчаються, однак, на даний час ефективних препаратів для лікування діабету 2 типу або ожиріння, дія яких полягала б у блокуванні активності РТР1В, ще не впроваджено. Тому пошук і вивчення нових інгібіторів цього ензиму залишається актуальним завданням біоорганічної хімії.

Серед значної кількості відомих структур різних класів, які здатні пригнічувати активність РТРаз, значний інтерес викликають сполуки з залишками фосфонових кислот. Такі похідні з моно- чи діаніонними залишками фосфонових кислот (фосфонати) як біоізостерні аналоги моноалкілфосфатів здатні зв'язуватись в активному центрі фосфатаз та поряд з ним, імітуючи приєднання білкового субстрату. Раніше було показано, що фосфонові кислоти на молекулярній платформі каліксаренів ефективно інгібують лужні фосфатази [Vovk A.I. et al., 2004] та бактеріальну протеїнтирозинфосфатазу з Єрсинії [Vovk A.I. et al., 2010]. Однак, інгібувальна здатність таких сполук щодо РТР1В та інших людських РТРаз не була вивчена.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота була складовою частиною науково-дослідних робіт Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (тема 2.1.10.13-10 "Пошук і модельні дослідження потенційно біоактивних сполук", № держреєстрації 0110U000375; тема 5.18.2.8 "Дослідження фізико-хімічних властивостей і біоактивності синтетичних нанорозмірних макроциклічних об'єктів та їх функціоналізованих похідних щодо терапевтично важливих білкових мішеней *in vitro*", № держреєстрації 0112U004108; тема 2/03-13 "Молекулярний дизайн, синтез і дослідження інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз як потенційних лікарських

засобів проти цукрового діабету та інших захворювань", № держреєстрації 0113U005097).

**Мета і задачі дослідження.** Метою дисертаційної роботи було встановлення закономірностей і механізмів інгібування РТР1В фосфонатними похідними калікс[4]арену та тіакалікс[4]арену, виявлення сполук з селективною дією на активність РТР1В у порівнянні з іншими РТРазами та з'ясування властивостей потенційно біоактивних фосфонатів в модельному оточенні за наявності сироваткового альбуміну.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- вивчення кінетичних особливостей і механізмів інгібування РТР1В калікс[4]аренметиленбісфосфоновими кислотами;
- з'ясування закономірностей інгібувального впливу  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонових та  $\alpha$ -кетифосфонових кислот на платформі калікс[4]аренів на активність РТР1В;
- вивчення селективності дії похідних калікс[4]аренфосфонових кислот на активність РТР1В у порівнянні з іншими цитоплазматичними та трансмембранними РТРазами людини;
- експериментальне обґрунтування нових напрямів пошуку і створення ефективних і селективних інгібіторів РТР1В на молекулярній платформі тіакалікс[4]арену;
- встановлення закономірностей зв'язування фосфорильованих похідних тіакалікс[4]аренів з людським сироватковим альбуміном.

*Об'єкт дослідження* – похідні калікс[4]арен- і тіакалікс[4]аренфосфонових кислот як інгібітори РТР1В.

*Предмет дослідження* – зв'язок між структурою і активністю фосфорильованих похідних калікс[4]аренів і тіакалікс[4]аренів як інгібіторів РТР1В та інших РТРаз, а також їх взаємодія з людським сироватковим альбуміном.

*Методи дослідження* – ензиматична кінетика, спектрофотометрія та спектрофлуориметричний аналіз, молекулярний докінг.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлено інгібувальну здатність та закономірності впливу метиленбісфосфонатних,  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонатних і  $\alpha$ -кетифосфонатних похідних калікс[4]аренів на ряд людських протеїнтирозинфосфатаз. Серед калікс[4]аренфосфонових кислот знайдено нові ефективні інгібітори РТР1В, що можуть виявляютьи селективність у порівнянні з іншими протеїнтирозинфосфатазами, такими як TC-РТР, CD45, SHP2, MEG2, MEG1 та LAR-РТР. З'ясовано кінетичні особливості та механізми інгібування РТР1В фосфонатними інгібіторами на калікс[4]ареновій платформі. Виявлено, що процес облаштування інгібітора в активному центрі РТР1В узгоджується з одно- або двостадійним механізмом повільного зв'язування. На основі експериментальних даних та молекулярного докінгу продемонстровано роль біоізостерних замісників та макроциклічної платформи в механізмах утворення ензим-інгібіторного комплексу. Показано, що метилфосфонатні

похідні на платформі тіакалікс[4]арену виявляють сильнішу інгібувальну здатність стосовно РТР1В у порівнянні з калікс[4]ареновими аналогами. Вперше встановлено, що похідні тіакалікс[4]аренів з ковалентно зв'язаними моноестерними залишками фосфонових кислот здатні ефективно і селективно пригнічувати РТР1В зі значеннями констант інгібування в низькомікромолярному діапазоні. За допомогою спектрофлуориметричного методу вперше показано здатність калікс[4]арен- та тіакалікс[4]аренфосфонових кислот взаємодіяти з людським сироватковим альбуміном. На основі аналізу термодинамічних активаційних параметрів показано, що моноестерні похідні тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонові кислоти можуть зв'язуватись з альбуміном краще, ніж відповідна фосфорова кислота.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дисертаційної роботи створюють наукове підґрунтя для подальшого дизайну ефективних, селективних і біодоступних інгібіторів РТР1В. Одержані результати можуть бути використані для конструювання нових інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз для вивчення біохімічних механізмів функціонування живих клітин, а також для розробки нових лікарських засобів, зокрема, для лікування діабету 2 типу, ожиріння та раку.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом виконано експериментальну частину дисертаційної роботи, проведено обчислення констант і аналіз результатів кінетичних досліджень та результатів комп'ютерного моделювання. Формулювання окремих завдань і висновків, обговорення механізмів та даних молекулярного докінгу відбувалося спільно з науковим керівником – чл. кор. НАН України А.І. Вовком та к.х.н. В.Ю. Танчуком. Комп'ютерні розрахунки було проведено к.х.н. В.Ю. Танчуком. Автор висловлює подяку всім співавторам робіт, які брали участь у підготовці статей і тез доповідей.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи були представлені на наукових конференціях ІБОНХ НАН України (Київ, 2011 р., 2012 р., 2014 р.); III міжнародному симпозиумі "Intracellular Signalling and Bioactive Molecules Design" (Львів, 2012 р.), XXIII Українській конференції з органічної хімії (Чернівці, 2013 р.), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014 р.) та інших наукових зібраннях.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах 1 статтю в науковому збірнику і тези 6 доповідей. Отримано 2 патенти на винахід.

**Структура та об'єм роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальної частини (розділ 2), викладу отриманих результатів та їх обговорення (розділи 3, 4, 5 та 6), заключної частини, висновків, і списку використаних джерел (149 найменувань). Дисертаційна робота налічує 125 сторінок друкованого тексту, проілюстрована 13 таблицями, 39 рисунками та 4 схемами.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали і методи досліджень

В роботі було використано рекомбінантні препарати РТРаз людини (отримані шляхом експресії в *E. Coli*): РТР1В з молекулярною масою 76 кДа та 37,4 кДа, (1-436 та 1-332 амінокислотні залишки людської РТР1В); ТС-РТР, РТР-MEG2, РТР-MEG1, SHP2, CD45, РТР $\beta$  та РТР-LAR. Для визначення ензиматичної активності РТРаз *in vitro* використовували штучні субстрати: *n*-нітрофенілфосфат і специфічний до РТР1В фосфорильований пептидний субстрат, TRDIpYETDYRK (pTyr<sup>1146</sup>). Всі препарати були поставлені фірмою “Sigma”. Фосфорильовані похідні калікс[4]арену та тіакалікс[4]арену були синтезовані кандидатом хімічних наук С. О. Черенком та аспірантом С. Г. Харченком під керівництвом чл.-кор. НАН України, доктора хім. наук, проф. В.І. Кальченка (ІОХ НАН України).

Кінетику ензиматичного гідролізу *n*-нітрофенілфосфату реєстрували за зміною оптичної густини реакційної суміші при 410 нм (для *n*-нітрофенолу  $\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Реакцію проводили в термостатованій кюветі спектрофотометра Specord-250. Температура реакційної суміші становила 37°C (РТР1В), 25°C (РТР $\beta$ ), 30°C (ТС-РТР, РТР-MEG2, РТР-MEG1, SHP2, CD45, РТР-LAR). При використанні як субстрату pTyr<sup>1146</sup> активність РТР1В розраховували за кількістю неорганічного фосфату, визначеного колориметричним методом з використанням малахітового зеленого (молібдату), вимірюючи оптичну густину відібраних проб при 620 нм.

Зв'язування фосфонатних похідних тіакалікс[4]арену з людським сироватковим альбуміном вивчали, порівнюючи інтенсивність флуоресценції за відсутності та за наявності лігандів при різній концентрації, збуджуючи молекулу білка хвилею світла при 280 нм.

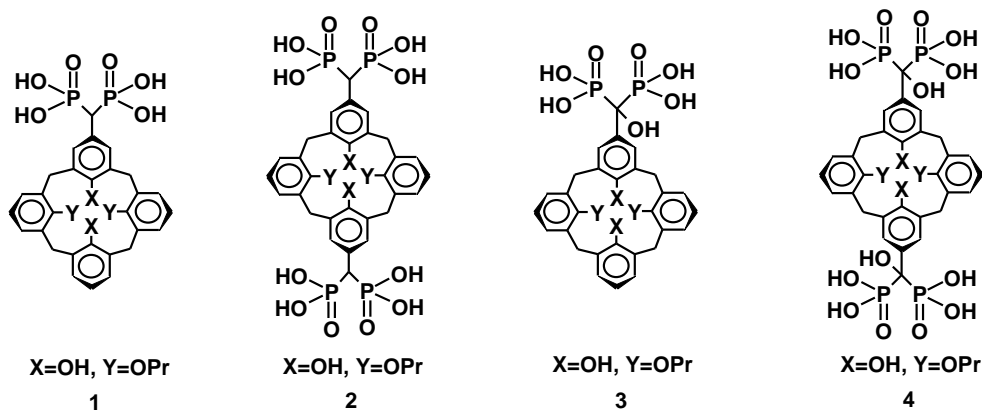
Експериментальні дані оброблено загальноприйнятими статистичними методами. Кількість експериментів в серіях дослідів з визначення констант інгібування та значень IC<sub>50</sub> складала 3-5.

Розрахунки методом молекулярного докінгу було проведено за допомогою програми AutoDock 4.2 на основі ряду структур ензиму згідно даних RSCB Protein Data Bank. Всі наявні кристалічні структури були попередньо згруповані в залежності від конформації, враховуючи положення WPD-петлі [Tanchuk V.Yu. et al., 2012]. В результаті розрахунків та їх аналізу були відібрані моделі комплексів ензим-інгібітор для структур РТР1В певного PDB-коду, що найкраще узгоджувались з результатами експериментальних досліджень інгібувальної активності. Ці моделі були використані для подальшого вивчення способів зв'язування інгібітора за допомогою програм Swiss-PdbViewer 4.1. та Accelrys Discovery Studio 3.5.

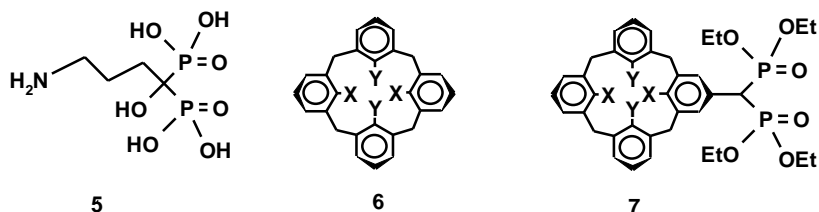
## Результати та обговорення

### Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В калікс[4]аренметиленбісфосфоновими кислотами

Похідні  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонової та метиленбісфосфонової кислот використовуються в терапевтичній практиці та досліджуються в модельних системах. Нами вперше обґрунтовано доцільність пошуку і дизайну інгібіторів людських РТРаз серед калікс[4]аренметиленбісфосфонових кислот. Результати тестувань *in vitro* показали, що похідні калікс[4]арену **1** і **3** з одним фрагментом метиленбісфосфонової або  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонової кислоти на верхньому вінці макроциклу виявляють найкращу спорідненість до РТР1В зі значеннями  $IC_{50}$  1,2 мкМ та 1,9 мкМ, відповідно. Бісфункціоналізовані макроцикли **2** і **4** характеризуються дещо нижчою інгібувальною активністю (табл. 1). У досліді з декапептидним субстратом рТур<sup>1146</sup> вплив інгібіторів **1-4** на активність РТР1В описувався значеннями  $IC_{50}$ , що становили 3,7 мкМ, 3,9 мкМ, 4,1 мкМ та 7,3 мкМ, відповідно.



При цьому структурно простіша  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфорова кислота **5** (алендронат) та незаміщений на верхньому вінці калікс[4]арен **6**, як і естер **7**, не впливали на активність РТР1В при концентрації 20 мкМ. Це свідчить про те, що здатність фосфорильованих похідних калікс[4]арену **1-4** інгібувати активність РТР1В може бути обумовлена синергічним впливом фосфонатних груп та калікс[4]аренової платформи.



Незважаючи на те, що активні центри протеїнтирозинфосфатаз з тканин ссавців характеризуються високим ступенем консервативності, вплив інгібіторів **1-4** на деякі з інших ензимів (ТС-РТР, CD45, РТР-LAR) був помітно

або значно нижчим у порівнянні з РТР1В. Разом з тим, вплив похідних **1-4** на SHP2 був співмірний з інгібуванням РТР1В (табл. 1).

Таблиця 1.

Інгібування протеїнтирозинфосфатаз людини  
похідними калікс[4]арену **1-4** ( $IC_{50}$ , мкМ)

Інгібітор	РТР1В	ТС-РТР	CD45	SHP2	LAR
<b>1</b>	$1,2 \pm 0,2$	$9,3 \pm 1,9$	$5,7 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,5$	$>100$
<b>2</b>	$2,5 \pm 0,2$	$4,9 \pm 1,5$	$22 \pm 6$	$2,6 \pm 0,6$	$>100$
<b>3</b>	$1,9 \pm 0,2$	$27 \pm 6$	$8,4 \pm 2,1$	$3,4 \pm 0,3$	$>100$
<b>4</b>	$8,3 \pm 1,1$	$22 \pm 2$	$59 \pm 10$	$9,2 \pm 0,4$	$>100$

Варто відзначити, що за наявності калікс[4]аренметиленбісфосфонатів процес гідролізу  $pNPP$ , що його каталізує РТР1В, не є лінійним (рис. 1, *a*). Додаткові експерименти з розведенням реакційної суміші свідчили про оборотність і повільне зв'язування макроциклічних інгібіторів. При цьому початкова швидкість гідролізу субстрату не залежала від наявності інгібітора, а значення уявної константи швидкості, що спостерігається для облаштування макроциклу ( $k_{app}$ ), зростало лінійно зі збільшенням його концентрації (рис. 1, *б*). Це вказує на те, що повільне утворення ензим-інгібіторного комплексу відбувається за одностадійним механізмом (схема 1).

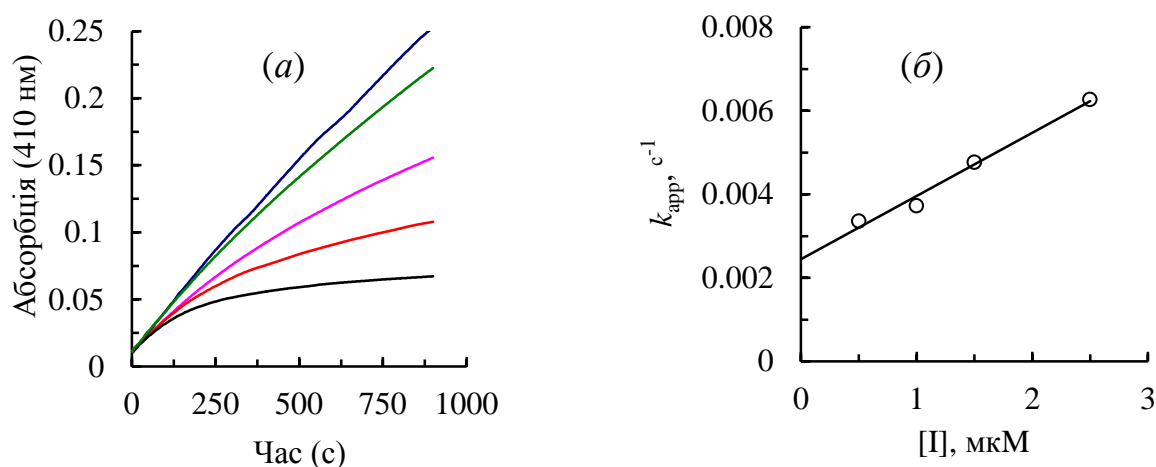
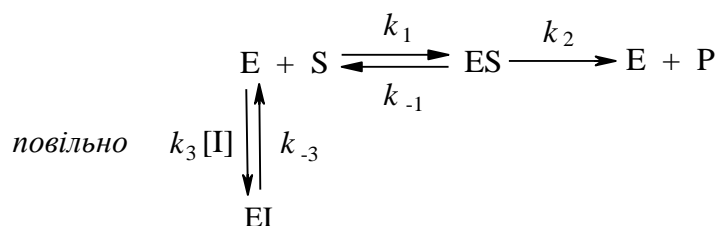


Рис. 1. (*a*) Кінетика гідролізу  $pNPP$  (2 мМ), що його каталізує РТР1В за відсутності та наявності 0,5 мкМ, 1,0 мкМ, 1,5 мкМ та 2,5 мкМ інгібітора **1**. (*б*) Залежність константи швидкості псевдопершого порядку ( $k_{app}$ ) від концентрації інгібітора **1**.

Схема 1.





Відповідно до цього уявну константу швидкості повільного облаштування  $k_{app}$  можна описати рівнянням:  $k_{app}=k_{-3}+k_3[I]/(1+[S]/K_m)$ , де  $k_3$  і  $k_{-3}$  є константами швидкості прямої та зворотної реакції утворення ензим-інгібіторного комплексу, а константа Міхаеліса  $K_m$  визначається як  $(k_{-1}+k_2)/k_1$ . Розраховані значення  $k_3$  і  $k_{-3}$  для інгібітора **1** становили  $3,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$  і  $0,0024 \text{ c}^{-1}$ , відповідно, а константа інгібування  $K_i$  була  $0,74 \text{ мкМ}$ . Для інгібітора **3**  $k_3 = 2,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ,  $k_{-3} = 0,0020 \text{ c}^{-1}$ ,  $K_i = 0,68 \text{ мкМ}$ .

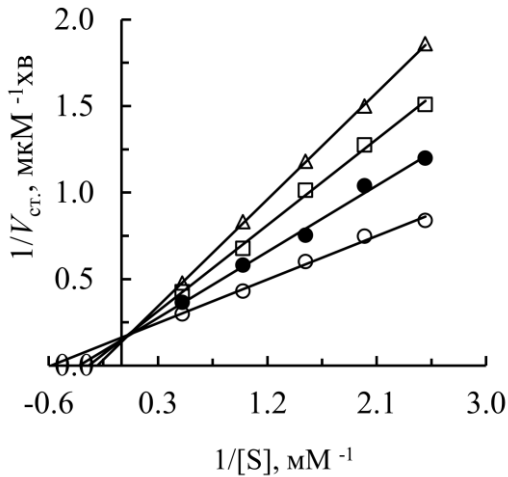


Рис. 2. Інгібування РТР1В калікс[4]аренметиленбісфосфоновою кислотою **1**. Концентрації інгібітора: (○) 0, (●) 0,6 мкМ, (□) 1,2 мкМ, (Δ) 1,8 мкМ.

Використовуючи значення стаціонарної швидкості гідролізу  $p\text{NPP}$ , кінетику інгібування РТР1В можна подати в координатах Лайнуівера-Берка (рис. 2). Характер отриманих залежностей свідчить про конкурентний тип інгібування, тобто, макроциклічний інгібітор **1** зв'язується в активному центрі ензиму, конкуруючи з субстратом. Розраховане значення константи інгібування дорівнює  $0,98 \text{ мкМ}$ . Аналіз можливих моделей зв'язування, які були отримані методом молекулярного докінгу з використанням ряду кристалічних структур РТР1В (PDB коди: 1NL9, 1PHO, 1Q6M, 2CM8 і 2CNF), що відрізнялися положенням WPD-петлі, показав найбільшу кореляцію між експериментальними даними та розрахованими значеннями вільної енергії ( $\Delta G_{\text{doc}}$ ) у випадку ензиму з закритою WPD-петлею (PDB код 2CNF). Метиленбісфосфонатний фрагмент може розташовуватись поряд з залишком Cys215 (рис. 3), а наявна макроциклічна платформа інгібіторів забезпечує гідрофобні взаємодії з Phe182 WPD-петлі, а також залишками Lys120, Tyr46, Arg47 та Asp48. Фосфорильні групи інгібіторів здатні утворювати водневі зв'язки з Asp181, Arg221, Ser216, Ala217, а також Gly220. У випадку біс-заміщених сполук **2** і **4** інший метиленбісфосфонатний залишок орієнтований назовні і не бере участі у зв'язуванні інгібітора з ензимом.

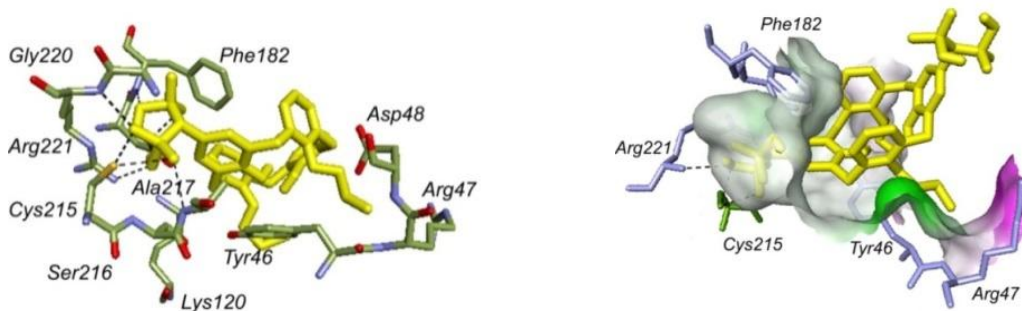
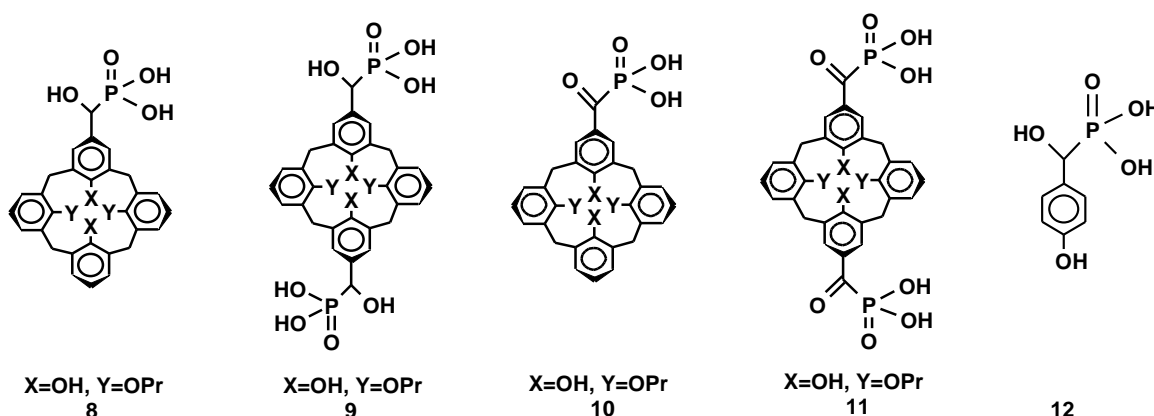


Рис. 3. Моделі зв'язування моно- та біс-метиленбісфосфонатів **1** і **2** в активному центрі РТР1В

## Калікс[4]арен- $\alpha$ -гідроксиметил- та калікс[4]арен- $\alpha$ -кето-фосфонові кислоти як інгібітори РТР1В

Як викладено вище, метиленбісфосфонові та  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонові кислоти на молекулярній макроциклічній платформі як міметики природних фосфатів виявляють значну інгібувальну здатність щодо РТРаз. Очевидно, природа та кількість фосфонатних груп може впливати на біодоступність інгібітора, а також змінювати селективність дії у порівнянні з іншими спорідненими фосфатазами. З огляду на це, як інгібітори РТР1В нами вперше було вивчено  $\alpha$ -гідроксиметил- та  $\alpha$ -кетофосфонові кислоти, ковалентно приєднані до верхнього вінця калікс[4]арену (сполуки **8-11**).



З'ясувалося, що монозаміщений калікс[4]арен- $\alpha$ -гідроксиметилфосфонат **8** (у рацемічній формі) найкраще інгібує CD45 ( $IC_{50} = 0,64$  мкМ), виявляючи приблизно 2-15-кратну селективність у порівнянні з РТР1В, SHP2 та РТР $\beta$  (табл. 2). У випадку  $\alpha$ -кетофосфонові кислоти **10** найкращим було інгібування РТР1В зі значенням  $IC_{50}$ , приблизно в 3 рази меншим ніж для CD45 та щонайменше на порядок меншим, якщо порівнювати з SHP2 та іншими РТРазами. Таким чином, заміна  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонатного замісника  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонатним забезпечила більшу спорідненість до CD45, ніж до РТР1В, а введення  $\alpha$ -кетофосфонатного фрагмента значно покращило селективність інгібування РТР1В у порівнянні з SHP2.

Таблиця 2.

Інгібувальна здатність  $\alpha$ -гідроксиметил- та  $\alpha$ -кетофосфонових кислот **8-11** щодо протеїнтирозинфосфатаз ( $IC_{50}$ , мкМ)

Інгібітор	РТР1В	ТС-РТР	РТР $\beta$	SHP2	CD45	MEG2	MEG1	LAR
<b>8</b>	1,6 $\pm$ 0,2	11 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,1	0,64 $\pm$ 0,1	-	-	-
<b>9</b>	8,4 $\pm$ 1,6	59 $\pm$ 1,7	45 $\pm$ 2	17 $\pm$ 4	7,6 $\pm$ 1,8	-	-	-
<b>10</b>	3,2 $\pm$ 0,1	27 $\pm$ 3	32 $\pm$ 4	40 $\pm$ 6	11 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1	60 $\pm$ 10	72 $\pm$ 5
<b>11</b>	6,3 $\pm$ 0,2	51 $\pm$ 10	30 $\pm$ 10	53 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3	46 $\pm$ 6	>100	56 $\pm$ 3

Модельна сполука - 4-гідроксифеніл- $\alpha$ -гідроксиметилфосфонова кислота **12** - інгібувала активність РТР1В на порядок гірше, ніж похідні калікс[4]арену **8-11**, що свідчить про участь як макроциклічної платформи, так і фосфорильної групи у зв'язуванні з ензимом. Біс-заміщені сполуки **9** (*мезо*-форма) та **11** демонстрували дещо вищі значення  $IC_{50}$  (табл. 2). За допомогою графічної залежності  $1/V_{ст.}$  від  $1/[S]$  було охарактеризовано механізм інгібування РТР1В моно- та біс- $\alpha$ -кетофосфонатними похідними калікс[4]арену **10** і **11** (рис. 5). Обидві сполуки здатні конкурувати з субстратом за місце зв'язування в активному центрі ензиму з уявними константами інгібування 2,2 мкМ та 3,4 мкМ, відповідно.

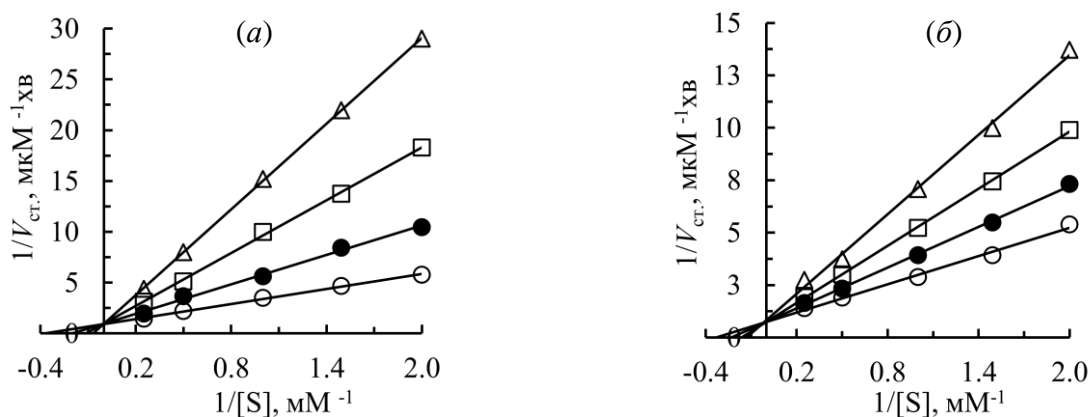


Рис. 5. Інгібування РТР1В похідними калікс[4]арену **10** (а) і **11** (б). Концентрації інгібіторів: (○) 0, (●) 2 мкМ, (□) 4 мкМ, (Δ) 6 мкМ.

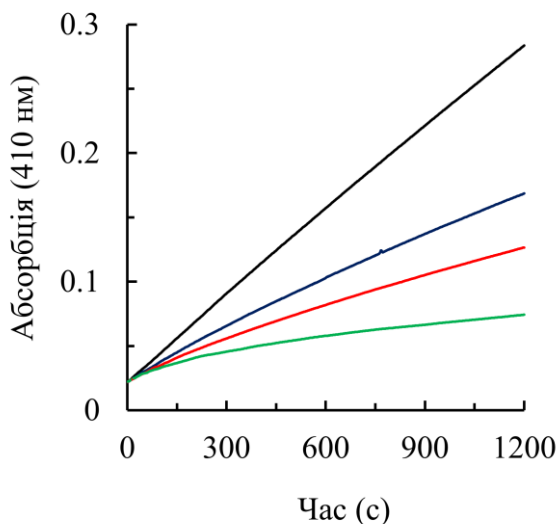
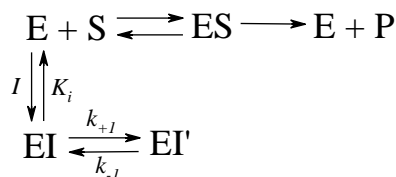


Рис. 6. Кінетичні криві інгібування РТР1В за відсутності та наявності 6 мкМ, 12 мкМ, і 24 мкМ інгібітора **11**.

Кінетичні криві інгібування РТР1В сполуками **10** і **11** показали, що максимальний вплив інгібіторів на ензим досягається з часом. При цьому початкова швидкість  $V_0$  гідролізу штучного субстрату, що його каталізує РТР1В, залежить від концентрації інгібітора (рис. 6). Цей факт узгоджується зі щонайменше двостадійним механізмом встановлення рівноваги. Спочатку відбувається швидке утворення проміжного комплексу EI, який потім повільно трансформується в комплекс EI' (схема 2).



Згідно схеми 2 уявна константа інгібування  $K_i'$  може бути представлена рівнянням:  $K_i' = K_i k_{-1}/(k_{-1} + k_{+1})$ , де  $K_i$  – константа рівноваги на стадії розкладу комплексу EI. Константа швидкості  $k_{-1}$  була розрахована за допомогою співвідношення  $k_{-1} = (V_{\text{ст.}}/V_o)k_{\text{app}}$ , де  $k_{\text{app}}$  – константа швидкості псевдопершого порядку, а  $V_o$  та  $V_{\text{ст.}}$  – початкова і стаціонарна швидкості реакції гідролізу субстрату, відповідно. Із залежності  $1/(k_{\text{app}} - k_{-1})$  від  $1/[I]$  було розраховано значення  $k_{+1}$  ( $0,0042 \text{ c}^{-1}$ ) та  $K_i'$  ( $3,6 \text{ мкМ}$ ). Значення  $K_i$  та  $k_{-1}$  становили  $12,3 \text{ мкМ}$  і  $0,0017 \text{ c}^{-1}$ , відповідно.

Структури інгібіторів, що використовувались для докінгу, вміщували моноаніонні форми фосфорильних залишків. Аналіз конформацій макроциклів в активному центрі РТР1В свідчить, що вони можуть бути описані як „сплющений конус”. Значення енергії докінгу виявились приблизно однаковими для енантіомерів  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонатів при їх зв'язуванні в активному центрі РТР1В. При цьому монозаміщені похідні калікс[4]арену **8** і **10** характеризуються нижчими  $\Delta G_{\text{doc}}$ , ніж біс-заміщені інгібітори **9** і **11**. Отримані експериментальним методом дані показали найкращу кореляцію з обрахованими значеннями  $\Delta G_{\text{doc}}$  у випадку закритого положення WPD-петлі. Фосфонатна група кожного з інгібіторів здатна розміщуватись в каталітичній кишені РТР1В (PDB код 2CNF) поряд з залишком Cys215 (рис. 7). Виявлено, що сполука **11** на відміну від сполуки **9** здатна взаємодіяти з РТР1В за допомогою двох фосфорильних груп, проте лише у випадку з відкритою WPD-петлею (рис. 7, б). Закріплення інгібіторів в активному центрі РТР1В здійснюється за рахунок водневих зв'язків, гідрофобних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій.

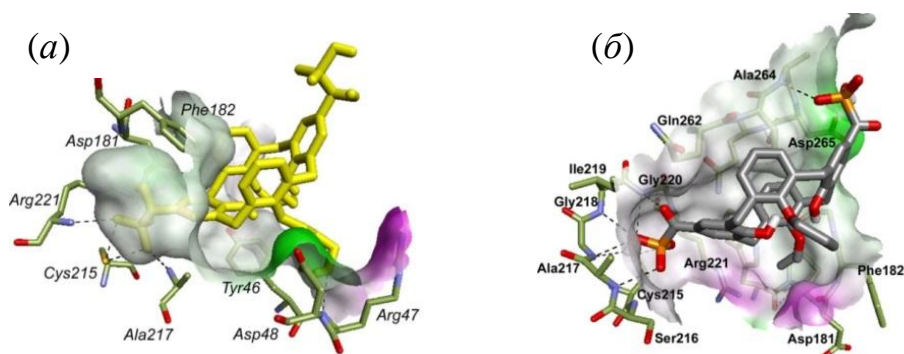
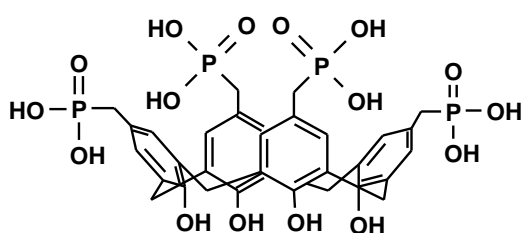


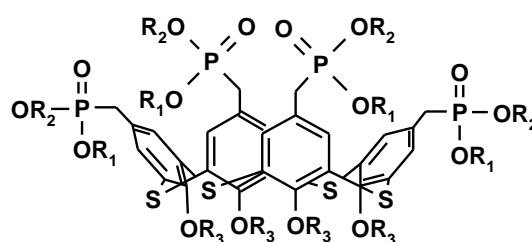
Рис. 7. Способи розташування  $\alpha$ -гідроксиметил- та  $\alpha$ -кетофосфонатних похідних калікс[4]арену в активному центрі РТР1В на основі даних молекулярного докінгу: (а) сполука **9** (2CNF); (б) сполука **11** (1NL9).

## Тіакалікс[4]арен як молекулярна платформа для конструювання інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз

Тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонова кислота була описана раніше як ефективний інгібітор лужних фосфатаз та протеїнтирозинфосфатази з Єрсинії [Vovk A.I. et al., 2010]. Вивчаючи закономірності інгібування РТР1В похідними тіакалікс[4]арену, ми запропонували нові підходи до дизайну макроциклічних фосфонатних інгібіторів, що розширюють уявлення про природу біоізостерного фрагменту. У відповідності з цим, активність РТР1В ефективно інгібують не тільки фосфонові кислоти **13** та **14**, але й моноестерні похідні тіакалікс[4]арену **16**, **17**, причому останні можуть мати переваги щодо селективності і біологічного транспорту.



13



$R_1, R_2, R_3 = H$  (**14**);  $R_1, R_2 = Et, R_3 = H$  (**15**);  
 $R_1, R_3 = H, R_2 = Et$  (**16**);  $R_1, R_3 = H, R_2 = n-Bu$  (**17**);  
 $R_1, R_2 = H, R_3 = Me$  (**18**)

Результати досліджень показали, що сполуки **13** і **14** мають високу спорідненість до РТР1В зі значеннями  $IC_{50}$   $1,3 \pm 0,6$  мкМ і  $0,17 \pm 0,04$  мкМ, відповідно (*pNPP* як субстрат). При використанні декапептидного субстрату рТур<sup>1146</sup>  $IC_{50}$  складало  $1,8 \pm 0,2$  мкМ та  $0,24 \pm 0,04$  мкМ, відповідно. Однак, селективність інгібування РТР1В була низькою в порівнянні з ТС-РТР (рис. 8), активність якої, як відомо, є незамінною в процесі розвитку клітин.

$IC_{50}$ , мкМ

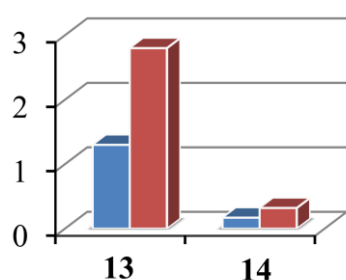


Рис. 8. Вплив сполук **13** і **14** на активність РТР1В (перша колонка) та ТС-РТР (друга колонка).

Таблиця 3.  
Інгібування РТРаз сполуками **16** і **17** ( $IC_{50}$ , мкМ)

Ензим	<b>16</b>	<b>17</b>
РТР1В	$0,34 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,03$
ТС-РТР	$5,2 \pm 1,4$	$2,8 \pm 0,5$
MEG2	$2,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$
MEG1	$3,9 \pm 1,5$	$3,8 \pm 0,9$
SHP2	$3,6 \pm 0,85$	$3,4 \pm 0,84$
CD45	$1,2 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,02$

Моноестери тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонової кислоти **16** і **17** характеризуються значеннями  $IC_{50}$  в низькомікромолярному діапазоні, виявляючи при цьому більшу селективність інгібування РТР1В у порівнянні з іншими РТРазами (табл. 3). Важливо, що інгібування РТР1В є значно кращим у порівнянні з ТС-РТР. В той же час октаалкільний

естер **15**, а також сполука **18** з метокси-групами на нижньому вінці мало впливали на активність РТР1В, що вказує на важливу роль замісників як на верхньому, так і нижньому ободі при закріпленні сполук **14**, **16** і **17** на поверхні ензиму.

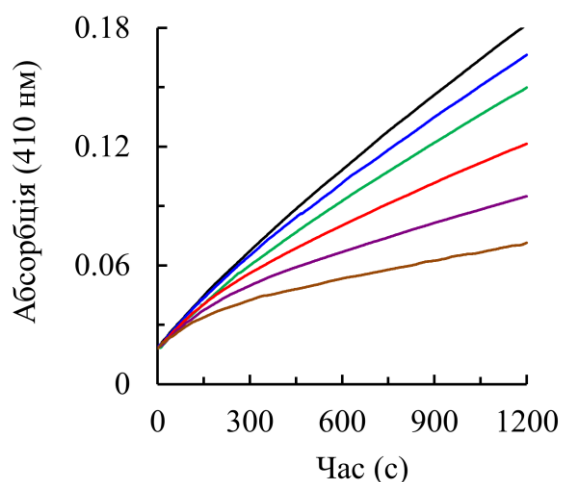


Рис. 9. Кінетичні криві інгібування РТР1В сполукою **16** (концентрація, мкМ: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8).

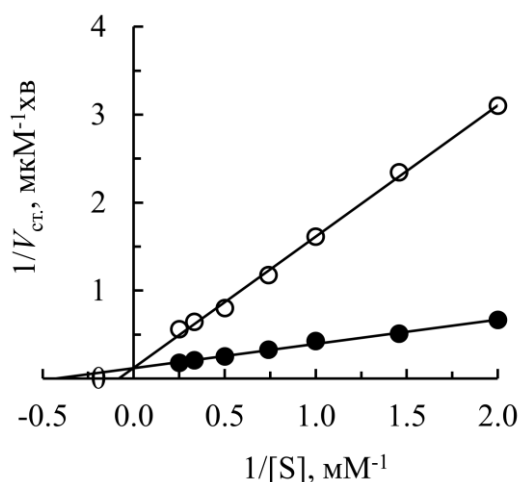


Рис. 10. Інгібування РТР1В сполукою **16** при концентрації 0,5 мкМ (○) та досліди за відсутності інгібітора (●).

Подібно до макроциклічних інгібіторів на платформі калікс[4]арену, кінетика ензиматичного гідролізу *p*NPP за наявності РТР1В та тетраалкільних естерів **16** або **17** свідчить про уповільнене формування ензим-інгібіторного комплексу (рис. 9). Беручи до уваги, що початкова швидкість  $V_0$  гідролізу при різних концентраціях інгібітора була приблизно однаковою, ймовірним є одностадійний механізм утворення комплексу EI (схема 1). У випадку сполуки **16** константи швидкості дисоціації  $k_{-3}$  та утворення комплексу  $k_3$  між ензимом та інгібітором, одержані з лінійної залежності  $k_{app}$  від  $[I]$ , дорівнюють  $0,0029 \text{ c}^{-1}$  та  $19 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , відповідно (розраховане значення  $K_i$  дорівнює  $0,15 \text{ мкМ}$ ).

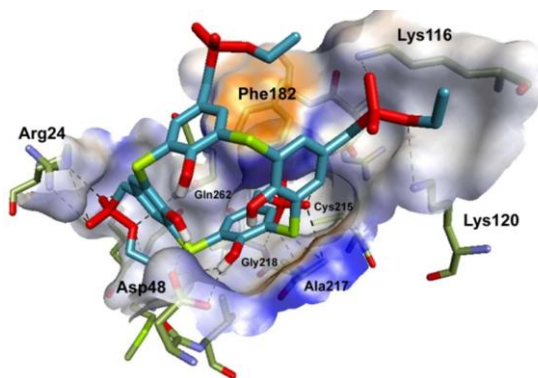


Рис. 11. Можливий спосіб розташування сполуки **16** в активному центрі РТР1В.

Залежність  $1/V_{ст.}$  від  $1/[S]$  (рис. 10) узгоджується з конкурентним типом інгібування з  $K_i$   $0,12 \pm 0,02 \text{ мкМ}$ . Комп'ютерне моделювання показало, що конформація РТР1В з закритою WPD-петлею є найсприятливішою для закріплення інгібіторів в активному центрі. При цьому інгібітор **16** наближений до Cys215 і утворює водневі зв'язки між атомами кисню трьох фосфонатних груп та залишками Lys120, Lys116, Arg24, Ala217 і Gly218. Крім того, одна з гідроксильних груп на нижньому

вінці макроциклу утворює водневий зв'язок з Asp48, а фрагменти макроциклічного каркасу залучені до гідрофобної взаємодії з Phe182 WPD-петлі.

### Взаємодія тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонової кислоти та її тетракіс-моноестерних похідних з сироватковим альбуміном

Сироватковий альбумін людини (ЛСА), як найпоширеніший білок крові, забезпечує транспортування багатьох ендогенних та екзогенних речовин, в тому числі ліків. Нами вперше показано здатність фосфонатних похідних тіакалікс[4]арену зв'язуватись з ЛСА. В результаті аналізу зміни інтенсивності флуоресценції альбуміну при додаванні гасника видно, що інтенсивність емісії негативно залежить від концентрації доданої речовини (рис. 12).

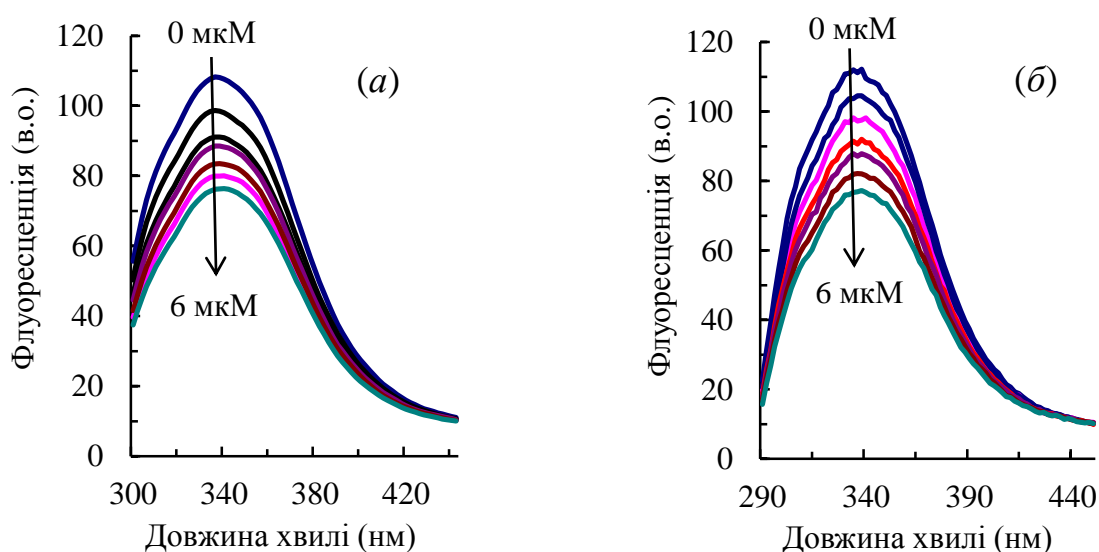


Рис. 12. Спектри флуоресценції ЛСА при додаванні тіакалікс[4]-аренфосфонової кислоти **14** (а) та її моноестерної похідної **16** (б). Концентрація ЛСА складала 2 мкМ; концентрації сполук дорівнювала 0, 1, 2, 3, 4, 5, та 6 мкМ ( $T = 298$  К,  $pH = 7,40$ ,  $\lambda_{ex} = 280$  nm).

Процес гасіння флуоресценції можна описати рівнянням Штерна-Фольмера:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

де  $F_0$  і  $F$  - інтенсивності флуоресценції за відсутності та за наявності гасителя, відповідно,  $k_q$  - бімолекулярна константа гасіння,  $\tau_0$  - час життя флуорофора у збудженому стані (для біополімерів становить приблизно  $10^{-8}$  с),  $K_{SV}$  - константа гасіння Штерна-Фольмера та  $[Q]$  - концентрація гасителя.

Щоб визначити механізм гасіння флуоресценції (статичний або динамічний), було проаналізовано вплив температури на ефективність гасіння. Встановлено, що константа Штерна-Фольмера зменшується зі зростанням температури, тобто гасіння флуоресценції відбувається за рахунок утворення нефлуоресцентного комплексу між флуорофором в основному електронному

стані та гасником. Значення  $k_q$ , отримані з рівняння Штерна-Фольмера, становлять приблизно  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , що значно перевищує максимальне значення цієї константи для динамічного типу гасіння ( $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) і також підтверджує утворення комплексу білка з лігандом.

З лінійної залежності  $\log(F_0-F)/F$  від  $\log[Q]$  було розраховано константу зв'язування, що спостерігається ( $K_b$ ), та кількість лігандів ( $n$ ), що приєднуються до однієї молекули ЛСА (рис. 13, табл. 4).

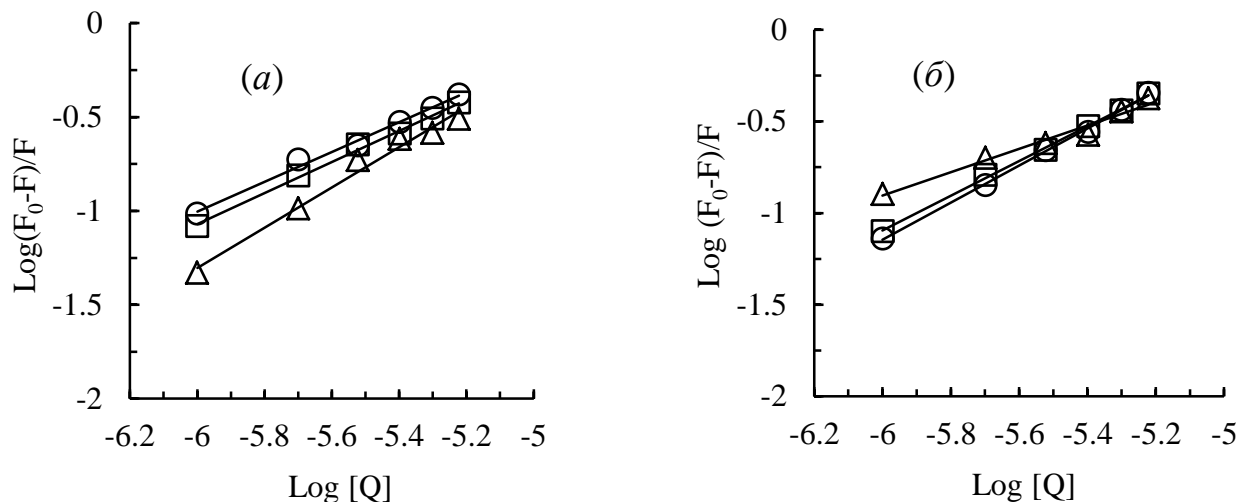


Рис. 13. Графіки залежностей  $\log(F_0-F)/F$  від  $\log[Q]$  для взаємодії ЛСА зі сполукою **14** (а) і **16** (б).

Таблиця 4.

Константи Штерна-Фольмера ( $K_{sv}$ ), константи зв'язування, що спостерігаються ( $K_b$ ), та кількість молекул ліганду, що взаємодіють з однією молекулою ЛСА ( $n$ )

Сполука	T (K)	$K_{sv} (\times 10^5)$ л мол <sup>-1</sup>	R	$K_b (\times 10^5)$ л моль <sup>-1</sup>	n	R
<b>14</b>	298	0,62	0,992	0,056	0,79	0,991
	308	0,56	0,989	0,076	0,82	0,994
	318	0,52	0,967	1,330	1,10	0,981
<b>16</b>	298	0,75	0,992	0,830	1,00	0,998
	308	0,72	0,998	0,390	0,95	0,998
	318	0,59	0,967	0,008	0,64	0,972

У випадку зв'язування тіакалікс[4]аренфосфонові кислоти **14** константа  $K_b$  зростає зі збільшенням температури, тобто процес утворення комплексу з білком є ендотермічним. Значення  $n$  приблизно дорівнює 1, що свідчить про наявність щонайменше одного центру зв'язування. При взаємодії альбуміну з тетраалкільним естером **16** з підвищенням температури спостерігається зниження  $K_b$  та  $n$ , що вказує на зменшення стабільності комплексу білок-ліганд.



Аналіз термодинамічних параметрів реакції (рис. 14 і табл. 5) показав, що головну роль при утворенні комплексу між сполукою **14** та ЛСА відіграють гідрофобні зв'язки, згідно до обрахованих позитивних значень зміни ентальпії ( $\Delta H > 0$ ) та ентропії активації ( $\Delta S > 0$ ), а водневі та Ван-дер-Ваальсові сили не є домінантними [Ross P. D. Et al. 1981]. При утворенні комплексу між сполукою **16** та ЛСА головний вклад вносять водневі зв'язки і сили Ван-дер-Ваальса, що впливає зі значень  $\Delta H$  та  $\Delta S$ . Розрахована з рівняння Гіббса зміна вільної енергії зв'язування сполук **14** і **16** з альбуміном свідчить про спонтанність цього процесу.

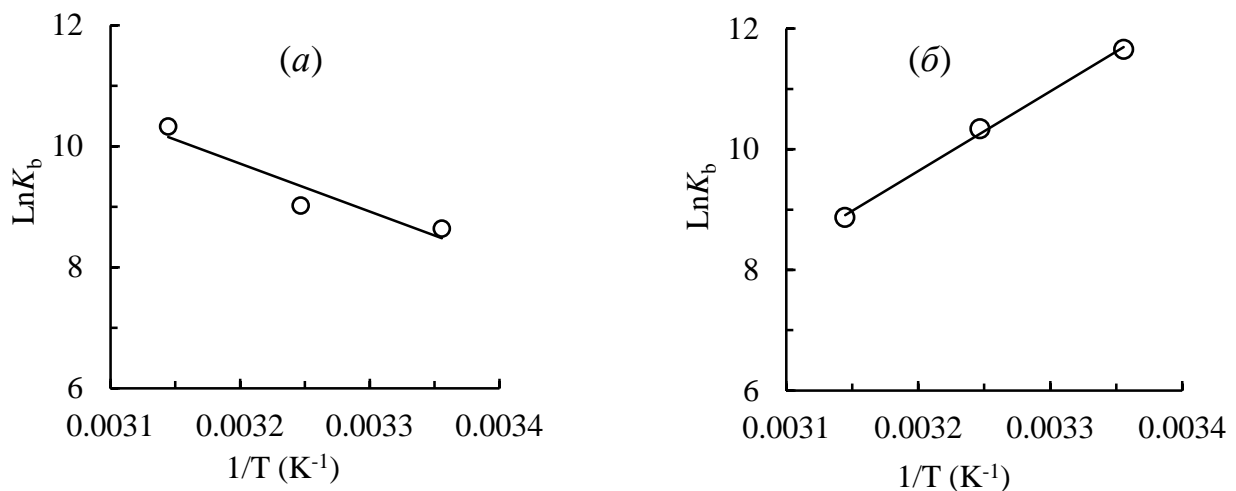


Рис. 14. Залежність логарифму константи зв'язування сполук **14** (а) та **16** (б) людським сироватковим альбуміном від температури в координатах Ареніуса.

Таблиця 5.

Термодинамічні параметри зв'язування похідних тіакалікс[4]арену **14** та **16** з людським сироватковим альбуміном

Сполука	$T$ (К)	$\Delta H$ (кДж моль <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (кДж моль <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (Дж моль <sup>-1</sup> К <sup>-1</sup> )
<b>14</b>	298	66	-21	292
	308		-24	
	318		-27	
<b>16</b>	298	-109	-29	-271
	308		-26	
	318		-24	

Отримані результати вказують на один з можливих механізмів біологічного транспорту тіакалікс[4]аренфосфонових кислот та їх моноестерних похідних, що включає зв'язування цих макроциклічних інгібіторів РТР1В з сироватковим альбуміном людини.

## Висновки

В дисертаційній роботі вперше вивчено інгібування протеїнтирозинфосфатаз людини похідними фосфонових кислот, ковалентно закріплених на молекулярній платформі калікс[4]арену або тіакалікс[4]арену. В результаті експериментальних досліджень *in vitro* та молекулярного докінгу знайдено нові ефективні і селективні інгібітори протеїнтирозинфосфатази 1В і встановлено особливості зв'язування тіакалікс[4]аренфосфонатів сироватковим альбуміном людини.

1. Обґрунтовано доцільність пошуку і конструювання інгібіторів людських РТРаз серед моно- та біс-заміщених калікс[4]аренметиленбісфосфонових, калікс[4]арен- $\alpha$ -гідроксиметилфосфонових та калікс[4]арен- $\alpha$ -кетифосфонових кислот. Ефективність інгібування забезпечується синергічними ефектами біозостерних фосфонатних замісників і макроциклічної платформи. Біс-заміщені похідні не мають переваг у порівнянні з монозаміщеними калікс[4]аренфосфоновими кислотами. Селективність інгібування РТР1В у порівнянні з ТС-РТР, CD45, SHP2, MEG1, MEG2 залежить від природи фосфонатного замісника.

2. Заміна фрагментів фосфонової кислоти макроциклічного інгібітора моноестерними фосфонатними залишками приводить до збільшення селективності інгібування РТР1В відносно інших цитозольних РТРаз. Встановлено, що тетракіс-моноестерні фосфонатні похідні тіакалікс[4]арену пригнічують активність РТР1В з низькомікромолярними значеннями констант інгібування та селективністю у порівнянні з ТС-РТР та іншими РТРазами.

3. Перебіг ензиматичної реакції за наявності фосфонатного інгібітора на платформі калікс[4]арену або тіакалікс[4]арену характеризується його уповільненим облаштуванням в активному центрі РТР1В. Кінетичні дані узгоджуються з одностадійним процесом утворення ензим-інгібіторного комплексу при використанні метиленбісфосфонатних похідних калікс[4]арену, а також метилфосфонатних похідних тіакалікс[4]арену. У разі  $\alpha$ -кетифосфонатних похідних калікс[4]арену процес інгібування може включати дві стадії повільного зв'язування макроциклічного інгібітора.

4. Механізми інгібування РТРаз похідними калікс[4]арен- і тіакалікс[4]аренфосфонових кислот включають закріплення інгібітора в області активного центру з закритою WPD-петлею, запобігаючи приєднанню субстрату. Комп'ютерні розрахунки ензим-інгібіторних комплексів свідчать про утворення водневих та гідрофобних зв'язків між інгібітором та ензимом.

5. Продемонстровано здатність фосфонатних похідних тіакалікс[4]арену утворювати комплекси з людським сироватковим альбуміном. Результати вказують на наявність щонайменше одного центру на поверхні білка для зв'язування фосфорильованого макроциклу. Аналіз значень ентальпії, ентропії та вільної енергії зв'язування свідчить про те, що утворення комплексу ліганд-

білок є спонтанним процесом, який стабілізується переважно за рахунок гідрофобних взаємодій або водневих зв'язків і Ван-дер-Ваальсових сил.

### Список публікацій за темою дисертації

1. Труш В.В. Інгібування протеїнтирозинфосфатаз фосфоновими кислотами на платформі калікс[4]арену і тіакалікс[4]арену / В. В. Труш, В. Ю. Танчук, Л. А. Кононець, А. Б. Драпайло, В. І. Кальченко, А. І. Вовк, В. П. Кухар // Доповіді НАН України. – 2012. – № 3. – С. 145-150.

2. Trush V. V. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / V. V. Trush, S. O. Cherenok, V. Yu. Tanchuk, V. P. Kukhar, V. I. Kalchenko, A. I. Vovk // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 23, № 20. – P. 5619-5623.

3. Trush V. V. Calix[4]arene  $\alpha$ -hydroxymethylphosphonic acids as potential inhibitors of protein tyrosine phosphatases / V. V. Trush, V. Y. Tanchuk, S. O. Cherenok, V. I. Kalchenko, A. I. Vovk // J. Org. Pharm. Chem. – 2014. – Vol. 12, № 1 (45). – P. 39-42.

4. Trush V. V. Phosphonate monoesters on a thiacalix[4]arene framework as potential inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / V. V. Trush, S. G. Kharchenko, V. Yu. Tanchuk, V. I. Kalchenko, A. I. Vovk // Org. Biomol. Chem. – 2015. – Vol. 13, № 33. – P. 8803-8806.

5. Trush V. V. Evaluation of inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by calixarene-based  $\alpha$ -ketophosphonic acids / V. V. Trush, V. Y. Tanchuk, S. O. Cherenok, V. I. Kalchenko, A. I. Vovk // Chem. Biol. Lett. – 2015. – Vol. 2, № 1. – P. 1-5.

6. Труш В. В. Інгібітори протеїнтирозинфосфатаз як потенційні лікарські засоби / В. В. Труш, Л. А. Кононець, В. Ю. Танчук, С. О. Черенок, В. П. Кухар, В. І. Кальченко, А. І. Вовк // Научные основы создания лекарственных средств. – 2011. – С. 12-17.

7. Патент на винахід № 102153. Калікс[4]арен- $\alpha$ -кетофосфонові кислоти як інгібітори протеїнтирозинфосфатази 1B / В. В. Труш, С. О. Черенок, В. Ю. Танчук, В. І. Кальченко, А. І. Вовк, В. П. Кухар. Заявл. 31.10.2011. Опубл. 10.06.2013, Бюл. № 11.

8. Патент на винахід № 100640. Каліксарен-1-гідроксиметилен-1,1-бісфосфонові кислоти як інгібітори протеїнтирозинфосфатази 1B / С. О. Черенок, В. В. Труш, В. Ю. Танчук, В. І. Кальченко, А. І. Вовк, В. П. Кухар. Заявл. 02.11.2011. Опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1.

9. Trush V.V. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors based on a calixarene scaffold / V. V. Trush, S. O. Cherenok, V. Yu. Tanchuk, V. I. Kalchenko, V. P. Kukhar, A. I. Vovk // 3rd International Symposium "Intracellular signalling and bioactive molecules design". – Lviv. – 2012. – P. 100.

10. Труш В. В. РТР1В як біологічна мішень і механізми дії інгібіторів / В.В. Труш, В. Ю. Танчук, А. І. Вовк // V Всеукраїнська наукова конференція «Домбровські хімічні читання». – Ніжин. – 2012. – С. 79.

11. Труш В. В. Каліксарен- $\alpha$ -гідроксифосфонові кислоти як інгібітори протеїнтирозинфосфатази 1В / В. В. Труш, С. О. Черенок, В. Ю. Танчук, В. І. Кальченко, В. П. Кухар, А. І. Вовк // Матеріали XXIII Української конференції з органічної хімії. – Чернівці. – 2013. – С. 258.

12. Trush V.V.  $\alpha$ -Ketophosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / V. V. Trush, S. O. Cherenok, V. Yu. Tanchuk, V. I. Kalchenko, V. P. Kukhar, A. I. Vovk // Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. – Новый Світ. - 2013. – Т. 1. - С. 131.

13. Труш В. В. Кінетика повільного облаштування калікс[4]аренфосфонових кислот в активному центрі РТР1В // В. В. Труш, С. О. Черенок, В. Ю. Танчук, В. І. Кальченко, В. П. Кухар, А. І. Вовк // «Координаційні сполуки: синтез і властивості». – Ніжин. – 2013. – С. 101.

14. Труш В.В. Естери тіа- та сульфонілкалікс[4]аренметилфосфонових кислот як інгібітори протеїнтирозинфосфатази / В. В. Труш, С. Г. Харченко, А. Л. Борецький, В. Ю. Танчук, В. І. Кальченко, А. І. Вовк // Ukr. Biochim. J. – 2014. – Vol. 86, № 5(1). – P. 83-84.

## АНОТАЦІЯ

**Труш В.В. Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В фосфонатними похідними калікс[4]аренів.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, 2015.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню закономірностей інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В похідними фосфонових кислот, ковалентно закріплених на макроциклічній платформі. В системах *in vitro* вперше з'ясовано вплив ряду моно- та біс-заміщених метиленбісфосфонатних,  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонатних,  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонатних та  $\alpha$ -кетофосфонатних похідних калікс[4]арену і метилфосфонатних похідних тіакалікс[4]арену на активність РТР1В та інших людських протеїнтирозинфосфатаз – SHP2, CD45, MEG2, MEG1, TC-PTP. Знайдено ефективні та селективні інгібітори РТР1В серед тетракіс-заміщених моноестерних фосфонатних похідних тіакалікс[4]арену. Результати кінетичних досліджень показали, що інгібітори РТР1В можуть конкурувати з субстратом за місце зв'язування в активному центрі ензиму. На основі кінетичних досліджень описано одно- та двостадійний механізм утворення ензим-інгібіторного комплексу. За допомогою молекулярного докінгу з використанням кристалів РТР1В з відкритою та закритою WPD-петлею проаналізовано способи

утворення комплексів інгібіторів з ензимом. Методом флуоресцентної спектроскопії продемонстровано здатність фосфонатних похідних тіакалікс[4]-арену утворювати комплекси з людським сироватковим альбуміном. Отримані результати розширюють знання про біологічну активність фосфонатних похідних каліксарену і можуть бути підґрунтям для створення нових макроциклічних інгібіторів РТР1В.

*Ключові слова:* протеїнтирозинфосфатаза 1В, інгібування, калікс[4]арен, фосфонові кислоти, людський сироватковий альбумін, докінг.

## АННОТАЦІЯ

**Труш В.В. Ингибирование протеинтирозинфосфатазы 1В фосфонатными производными каликс[4]аренов.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия. – Институт биорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертационная работа посвящена исследованию закономерностей ингибирования протеинтирозинфосфатазы 1В фосфонатными производными на макроциклической платформе каликс[4]аренов. В работе впервые установлено влияние ряда моно- и бис-замещенных метиленбисфосфонатных,  $\alpha$ -гидрокси-метилфосфонатных и  $\alpha$ -кетофосфонатных производных каликс[4]арена, а также метилфосфонатных производных тиакаликс[4]арена на активность РТР1В и других человеческих протеинтирозинфосфатаз – SHP2, CD45, MEG2, MEG1, TCSPTP. Найдены эффективные и селективные ингибиторы РТР1В среди тетракис-замещенных фосфонатных производных тиакаликс[4]арена. Результаты кинетических исследований показали, что ингибиторы РТР1В могут конкурировать с субстратом за место связывания в активном центре. Описано одно- и двухстадийные механизмы формирования фермент-ингибиторного комплекса. С помощью молекулярного докинга проведен анализ возможных способов комплексообразования ингибиторов с ферментом. Методом флуоресцентной спектроскопии продемонстрировано способность фосфонатных производных тиакаликсарена взаимодействовать с сывороточным альбумином человека.

*Ключевые слова:* протеинтирозинфосфатаза 1В, ингибирование, каликс[4]арен, фосфонаты, докинг, сывороточный альбумин человека.

## SUMMARY

**Trush V.V. – Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by phosphonate derivatives of calix[4]arenes.** – A manuscript.

Dissertation for the candidate of chemical sciences degree in speciality 02.00.10 – bioorganic chemistry. – Institute of bioorganic chemistry and petrochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, 2015.

The dissertation is devoted to researches of the regularities of PTP1B inhibition by calix[4]arene phosphonate derivatives. For the first time, mono- and bis-

substituted methylenebisphosphonic, *α*-hydroxymethylphosphonic, *α*-ketophosphonic acid derivatives of calix[4]arene and tetrakis-substituted methylphosphonic acid derivatives of thiacalix[4]arene were studied as inhibitors of PTP1B and other human protein tyrosine phosphatases including SHP2, CD45, MEG2, MEG1, TC-PTP. The selectivity aspects of PTP1B inhibition by the calix[4]arene and thiacalix[4]arene phosphonate derivatives were elucidated.

Calix[4]arenes bearing one methylenebisphosphonate or *α*-hydroxymethylenebisphosphonate fragment at the wide rim of the macrocycle showed the high affinities for the enzyme with IC<sub>50</sub> of 1.2 and 1.9 μM, respectively. These compounds were found to be also potent inhibitors of SHP2 showing good selectivity over TC-PTP, PTPβ and modest selectivity over CD45. Calix[4]arene *α*-hydroxymethylphosphonic acids was more potent inhibitor of CD45 than TC-PTP, PTPβ, SHP2 and PTP1B. The inhibiting capacity for calix[4]arene *α*-ketophosphonic acids toward PTP1B was higher than that for other protein tyrosine phosphatases such as TC-PTP, LAR, MEG1, MEG2, and SHP2. To the best of our knowledge, tetrakis-substituted monoesters of thiacalix[4]arene were capable of inhibiting PTP1B with the inhibition constant in the low micromolar range being in an approximately 11-fold more potent inhibitors of PTP1B as compared to TC-PTP, Meg1, SHP2, and 8-fold less active towards Meg2.

Kinetic studies of PTP1B inhibition showed a time-dependent decrease in the reaction rate during the first minutes of product accumulation. Thus these effects of the macrocyclic inhibitors were explained by reversible slow-binding inhibition. The mechanism was identified to be a single-step one in case of methylenebisphosphonate and thiacalix[4]arene tetrakis-substituted monoesters. In case of calix[4]arene *α*-ketophosphonates inhibition may be considered as possible two-step process with rapid formation of the first enzyme-inhibitor complex and its slow isomerization to the more stable complex. The apparent rate constants of the complexes formation were calculated.

To analyze the binding modes of macrocyclic inhibitors in the active site of PTP1B, computer-simulated docking studies were performed using AutoDock 4.2. It was found that PTP1B with closed conformation of WPD-loop is more favorable for the inhibitor binding as compared with open WPD-loop conformation of the enzyme. In case of bis-substituted inhibitors the second phosphonate group do not participate in the complex formation.

In addition, using fluorescence quenching method, albumin-binding properties of thiacalix[4]arene phosphonic acid and its tetrakis-monoesters were studied. The data revealed that the fluorescence quenching of HSA by the thiacalix[4]arene derivatives was initiated by complex formation rather than by dynamic collision.

The obtained results provide new insight into properties of the calix[4]arene phosphonate derivatives creating the basis for further development of potent macrocyclic inhibitors of PTP1B.

*Key words:* calix[4]arene; phosphonic acids; protein tyrosine phosphatase; inhibition; molecular docking; fluorescence; albumin.