

В. В. Труш, В. Ю. Танчук, Л. А. Кононець, А. Б. Драпайло,
член-кореспондент НАН України В. І. Кальченко,
член-кореспондент НАН України А. І. Вовк,
академік НАН України В. П. Кухар

Інгібування протеїнтирозинфосфатаз фосфоновими кислотами на платформі калікс[4]арену й тіакалікс[4]арену

Вперше показано, що калікс[4]арен- й тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонові кислоти інгібують людську протеїнтирозинфосфатазу 1В з IC_{50} у низькомікромольному діапазоні значень. Фосфорильований тіакалікс[4]арен демонстрував сильніший ефект на фермент, ніж його калікс[4]ареновий аналог. Обидва макроциклічні інгібітори були селективними у порівнянні з РТР-LAR, однак не виявляли селективності або були мало селективними у порівнянні з РТР- β і Т-клітинною протеїнтирозинфосфатазою. Отримані результати вказують на перспективність фосфонатних похідних калікс[4]арену для пошуку нових інгібіторів РТР 1В.

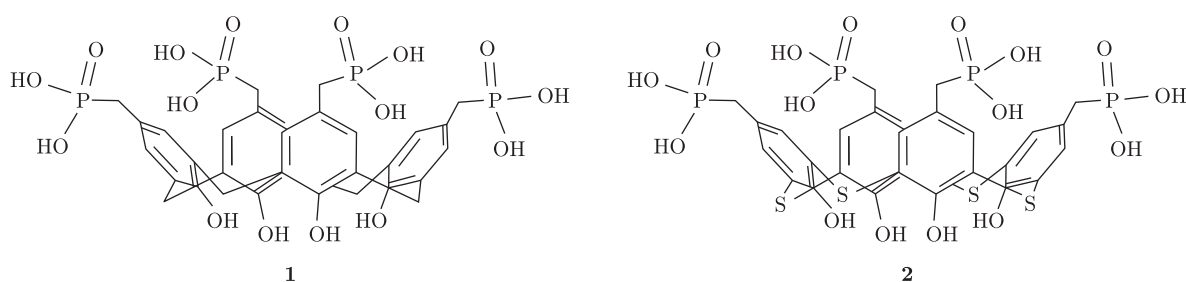
Фосфорилування і дефосфорилування тирозинових залишків білків є ключовою стадією сигнальних процесів, які регулюють ріст, проліферацію, диференціацію, метаболізм та міграцію клітин живих організмів. Порушення балансу між фосфорильованими і дефосфорильованими білками супроводжується виникненням багатьох захворювань. Тому протеїнтирозинфосфатази, так само як і протеїнтирозинкінази, можуть розглядатися як потенційні фармакологічні мішені [1]. Серед ряду протеїнтирозинфосфатаз (*in vivo* є селективними щодо субстратних білків) особливу увагу привертає протеїнтирозинфосфатаза 1В (РТР 1В), що каталізує дефосфорилування білкових рецепторів інсуліну і є негативним регулятором інсулінової сигналізації, а також контролює лептинзалежні процеси [2].

На сьогодні відзначається зростаючий інтерес до синтезу та подальших досліджень потенційних інгібіторів РТР 1В як можливих ліків нового покоління від діабету 2-го типу та ожиріння [3]. Ряд синтетичних похідних карбонових, фосфонових і сульфонових кислот, гетероциклічних та інших сполук було синтезовано, а також встановлено їх інгібуючі властивості щодо РТР 1В [1, 4–6]. Хоч це й привело до надзвичайно потужних інгібіторів, проте у впровадженні вони не вийшли за межі доклінічної стадії [1, 6]. Причини, які поки що стримують використання інгібіторів РТР 1В як лікарських засобів, пов'язані з таким: *по-перше*, сполуки, які ефективно пригнічують РТР 1В, як правило, містять негативно заряджені функціональні групи. Ця властивість часто обмежує проникність інгібіторів РТР 1В через біологічні мембрани і вимагає подальших змін у їх структурі для покращення потрапляння в клітину [7]. *По-друге*, вплив більшості інгібіторів РТР 1В не є специфічним, особливо щодо Т-клітинної протеїнтирозинфосфатази (ТС-РТР), блокування якої асоціюється з людськими запальними хворобами [8].

Раніше нами було запропоновано новий підхід до дизайну інгібіторів фосфатаз, що включав ковалентне закріплення біоізостерних залишків фосфонових кислот на молекулярній

платформі каліксаренів [9, 10]. Припускається, що подібні макроциклічні сполуки здатні проникати через біологічні мембрани [11]. Подальші результати наших досліджень показали, що фосфорильовані калікс[4]арени можуть бути потужними інгібіторами протеїн-тирозинфосфатази з Єрсинії (Yop51*) та РТР- β з IC₅₀ у низькомікромольному діапазоні значень. Серед них найактивніші: тіакалікс[4]арен-тетракіс- і калікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонові кислоти [12]. Але до цього часу ці сполуки не були досліджені як інгібітори протеїнтирозинфосфатази 1В.

Метою нашої роботи було вивчення впливу *in vitro* калікс[4]арен-тетракіс- і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонових кислот **1** й **2** на активність людської РТР 1В. Для порівняння можливих механізмів зв'язування інгібіторів в активному центрі РТР 1В було застосовано метод молекулярного докінгу. Оскільки РТР 1В характеризується високою гомологічністю з сімейством РТРа3, необхідно було оцінити селективність інгібуючого впливу фосфорильованих макроциклів **1** й **2** на активність РТР 1В у порівнянні з іншими протеїн-тирозинфосфатазами:



Матеріали та методи досліджень. Калікс[4]арен-тетракіс-метилфосфорова кислота **1** і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфорова кислота **2** були синтезовані у відповідності з раніше розробленим методом [13]. Ферментні препарати і реактиви придбано у фірмі “Sigma”. У роботі використовували препарати рекомбінантної РТР 1В, які були прототипами нетрансмембранних білків з масою 37,4 й 76 кДа, що отримані шляхом експресії в *E. coli* (1-332 й 1-436 амінокислотні залишки людської РТР 1В відповідно). Підготовлений до роботи розчин РТР 1В зберігався при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ у середовищі з 10 ммоль/л *біс-трис*-буфера (рН 7,2), 2 ммоль/л DTT, 100 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л EDTA. Для визначення інгібуючої здатності сполук **1** й **2** відносно РТР 1В використовували фосфорильований пептидний субстрат, TRDIPYETDYRК (pTyr¹¹⁴⁶) або штучний субстрат — *n*-нітрофенілфосфат. При використанні pTyr¹¹⁴⁶ як субстрату (0,075 ммоль/л) реакційна суміш містила 0,05 моль/л *біс-трис*-буфер (рН 7,2), 100 ммоль/л NaCl, 1,0 ммоль/л EDTA, 1,0 ммоль/л DTT та 40 нмоль/л РТР 1В (37,4 кДа). Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 0,2 мл. Активність ферменту розраховували за кількістю неорганічного фосфату, визначеного колориметричним методом з використанням спеціальної тестової системи. Кожну пробу витримували 20 хв при 37 $^{\circ}\text{C}$, потім додавали малахітовий зелений та витримували ще 10 хв. Об'єм розчину доводили до 0,5 мл і вимірювали оптичну густина при 620 нм. При використанні *n*-нітрофенілфосфату як субстрату (2 ммоль/л) реакційна суміш містила 0,05 моль/л *біс-трис*-буфер (рН 7,2), 100 ммоль/л NaCl, 2,0 ммоль/л EDTA, 3,0 ммоль/л DTT та 6 нмоль/л РТР 1В (76 кДа). Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 0,5 мл. Кожну пробу витримували 10 хв при 30 $^{\circ}\text{C}$. Реакцію розпочинали додаванням ферменту. В обох випадках інгібітор був попередньо розчинений в системі вода — диметилсульфоксид, об'ємний вміст якого в реакційній суміші становив 1%.

Для з'ясування селективності інгібування РТР 1В використовували інші протеїнтирозинфосфатази — ТС-РТР, РТР- β , LAR-РТР, а також лужну фосфатазу з плаценти людини. При дослідженні інгібування ТС-РТР реакційна суміш містила 0,05 моль/л *бис-трис*-буфер (рН 7,0), 100 ммоль/л NaCl, 1,0 ммоль/л EDTA, 1,0 ммоль/л DTT, 0,8% DMSO та 1,0 ммоль/л *n*-нітрофенілфосфат як субстрат. При дослідженні інгібування РТР- β реакційна суміш містила 0,05 моль/л *бис-трис*-буфер (рН 7,2), 100 ммоль/л NaCl, 2,0 ммоль/л DETA, 3,0 ммоль/л DTT, 1% DMSO та 2,0 ммоль/л *n*-нітрофенілфосфат як штучний субстрат. Вплив інгібітора на активність LAR-РТР досліджували в 0,05 моль/л *бис-трис*-буфері (рН 7,2) у присутності 100 ммоль/л NaCl, 1,0 ммоль/л EDTA, 1,0 ммоль/л DTT, 0,8% DMSO та 2,0 ммоль/л *n*-нітрофенілфосфату як субстрату. Реакція проходила при 30 °С. При дослідженні інгібування лужної фосфатази з плаценти людини (25 °С) реакційна суміш містила 0,1 моль/л *трис*-HCl-буфер (рН 9,0), 0,25% DMSO та 0,75 ммоль/л *n*-нітрофенілфосфат. Утворення *n*-нітрофенолу внаслідок ферментативного гідролізу субстрату вимірювали за зростанням оптичної густини реакційної суміші при 410 нм (молярний коефіцієнт абсорбції *n*-нітрофенолу 18 300 моль/л⁻¹ · см⁻¹).

Результати та їх обговорення. Нами вперше як інгібітори РТР 1В було вивчено фосфорильовані похідні калікс[4]арену й тіакалікс[4]арену, що містять на верхньому ободі макроциклу чотири залишки метилфосфонової кислоти (сполуки **1** і **2** відповідно). При дослідженні РТР 1В *in vitro* використовували пептидний субстрат (pTyr¹¹⁴⁶), що моделює структуру фрагменту інсуліну в межах амінокислотних залишків від 1142 до 1153 [14]. Кількість неорганічного фосфату, що за певний проміжок часу нагромаджувався в результаті ферментативного гідролізу фосфорильованого залишку тирозину, зіставляли з даними контрольних дослідів у відсутності ферменту, а також у відсутності інгібітора. Значення IC₅₀ відповідало концентрації інгібітора, яка спричинила зниження виходу неорганічного фосфату на 50% порівняно з даними контрольних дослідів. Ці значення становили (1,8 ± 0,2) мкмоль/л для сполуки **1** та (0,24 ± 0,04) мкмоль/л для сполуки **2**. Значення *K_m* для РТР 1В при використанні pTyr¹¹⁴⁶-фрагмента інсулінового рецептора становить 0,17 ммоль/л [14].

У присутності 2 ммоль/л *n*-нітрофенілфосфату як субстрату значення IC₅₀ для сполуки **1** становило (1,3 ± 0,6) мкмоль/л (*K_m* для цього субстрату за умов дослідів дорівнює 2,6 ммоль/л). Використання тетракіс-метилфосфонатного похідного тіакалікс[4]арену **2** як інгібітора РТР 1В свідчило про більший вплив цієї сполуки у порівнянні з її структурним калікс[4]ареновим аналогом **1** (рис. 1), що узгоджується з визначеними раніше константами інгібування цими сполуками бактеріальної протеїнтирозинфосфатази з Єрсинії [12]. Середнє значення IC₅₀ для сполуки **2** як інгібітора РТР 1В (0,17 ± 0,04) мкмоль/л, що приблизно на порядок менше, ніж для сполуки **1**.

Для оцінки селективності інгібування РТР 1В макроциклічними фосфоновими кислотами сполук **1** й **2** порівнювали їх вплив на цей фермент, а також ТС-РТР, РТР- β , LAR-РТР та лужну фосфатазу з плаценти людини, використовуючи штучний субстрат — *n*-нітрофенілфосфат. За цих умов величина IC₅₀ відповідала концентрації інгібітора, яка спричинила зниження нагромадження *n*-нітрофенолу на 50% порівняно з його кількістю у відсутності інгібітора. Отримані значення IC₅₀ інгібування РТР 1В та ряду інших ферментів свідчать про те, що вплив інгібіторів на РТР 1В є селективним у порівнянні з впливом на активність РТР-LAR та плацентарною лужною фосфатазою, що можна було очікувати, оскільки ці ферменти значно відрізняються від РТР 1В. Однак інгібування РТР 1В сполуками **1** й **2** було мало селективним або не селективним щодо їх впливу на ТС-РТР й РТР- β (табл. 1).

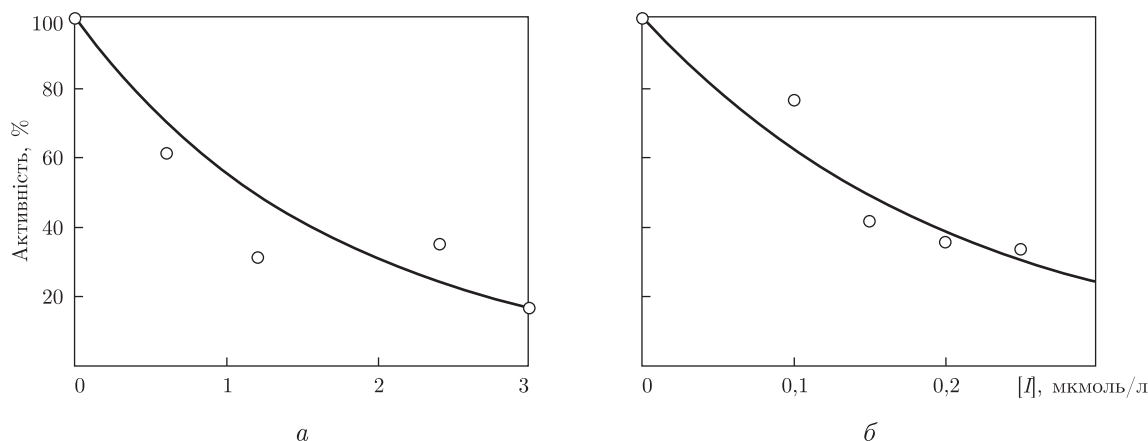


Рис. 1. Концентраційні залежності інгібування РТР 1В калікс[4]арен-тетракіс- і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфоновими кислотами **1** (а) й **2** (б)

Для аналізу способів зв'язування інгібіторів було застосовано метод молекулярного докінгу за допомогою програми AutoDock 4.2. Моделі зв'язування конструювалися на основі ряду кристалічних структур РТР 1В (дані Protein Data Bank; PDB коди: 1NL9, 1PHO, 1Q6M, 2CM8 й 2CNF). Слід зазначити, що дані рентгеноструктурного аналізу комплексів РТР 1В з різними лігандами свідчать про можливість конформації ферменту як з відкритою, так і з закритою WPD-петлею [15]. Обрані нами для докінгу кристалічні структури 1NL9 й 1PHO з відкритою WPD-петлею відрізняються передусім конформацією бічного ланцюга Arg47, що належить до так званої YRD-петлі (Tyr46–Asp48), відповідальної за зв'язування фосфотирозинового субстрату (рис. 2). Відмінності між 1Q6M й 2CM8 (конформації з закритою WPD-петлею) стосуються рухливого залишку Lys120, що локалізується на певній віддалі від активного центру і може забезпечувати вибірковість інгібування. Процедура докінгу тетрафосфонатних похідних включала аналіз чотирьох варіантів розміщення кожного ліганду (за числом біоізомерних груп) та визначення однієї енергетично найвищої структури ймовірного комплексу. Структури, що використовувались для докінгу, мали моноаніонні форми фосфорильних залишків.

Найнижчі енергії докінгу макроциклічних лігандів **1** й **2** в активний центр РТР 1В отримано при використанні кристалічної структури, представленої конформацією з закритою WPD-петлею (2CNF) (табл. 2). При цьому абсолютне значення ΔE_{doc} є більшим для сполуки **2**, що узгоджується з експериментальними даними.

Таблиця 1. Значення IC_{50} калікс[4]арен-тетракіс- і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонових кислот **1** й **2** як інгібіторів РТР 1В та інших РТРаЗ*

Фермент	IC_{50} , мкмоль/л (сполука 1)	IC_{50} , мкмоль/л (сполука 2)
РТР 1В	$1,3 \pm 0,6$	$0,17 \pm 0,04$
ТС-РТР	$2,8 \pm 0,4$	$0,32 \pm 0,02$
РТР- β	$3,8 \pm 0,6$	$0,13 \pm 0,02$
РТР-LAR	> 1000	13 ± 1
Лужна фосфатаза (плацентарна)	> 1000	120 ± 23

* Наведено середнє значення IC_{50} та стандартну похибку.

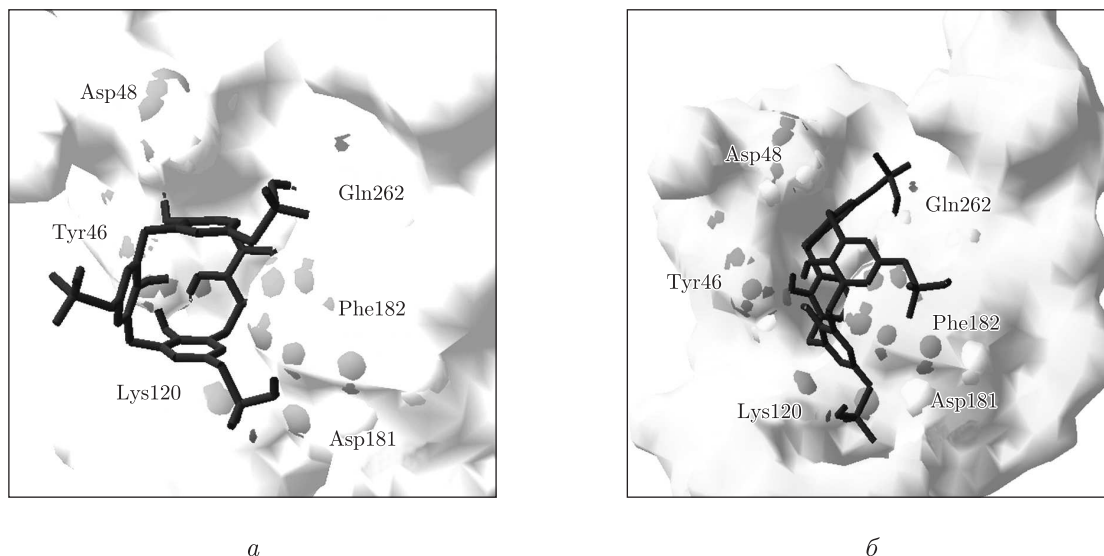


Рис. 2. Можливі способи зв'язування калікс[4]арен-тетракіс- і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонових кислот **1** (а) й **2** (б) в активному центрі РТР 1В

Аналіз конформацій макроциклів **1** й **2** в активному центрі ферменту свідчить, що вона є подібною і може бути описана як „площинний конус”. Два протилежні бензолні кільця розташовані майже паралельно, тоді як два інші ароматичні фрагменти наближені до площини макроциклу, орієнтуючись один до одного під значно більшим кутом. Фосфонатна група кожного з інгібіторів розташовується поряд з залишком Cys215, що знаходиться на дні каталітичної кишені. Однак у випадку сполуки **1** у напрямі Cys215 орієнтується фосфонатний залишок одного з паралельних бензолних кілець, а у випадку сполуки **2** — одного з площинних. При цьому верхній обід макроциклу **1** орієнтований назовні, тоді як верхній обід макроциклу **2** накриває залишок Phe182. Лише фрагмент сполуки **1** контактує з Phe182, при цьому гідрофобні взаємодії відбуваються також за участю Lys120 й Val49. До водневих зв'язків за участю атома кисню фосфорильної групи сполуки **1** залучений залишок Gln262, а дві гідроксильні групи на нижньому ободі макроциклу утворюють водневі зв'язки з Tyr46 й Asp48. Тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфорова кислота **2** у тісному контакті з Phe182 може утворювати водневий зв'язок з Asp181 й Gln262. Гідрофобні взаємодії забезпечують також Lys120 й Tyr46.

Таким чином, результати цього дослідження демонструють, що калікс[4]арен-тетракіс і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонові кислоти **1** й **2** здатні інгібувати РТР 1В з IC₅₀ у низькомікромолярному діапазоні значень. Інгібуюча здатність сполуки **2** є значно біль-

Таблиця 2. Значення енергії докінгу калікс[4]арен-тетракіс- і тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфонових кислот **1** й **2** в активний центр РТР 1В*

Інгібітор	Енергія докінгу, ккал/моль				
	1NL9	1PHO	1Q6M	2CM8	2CNF
1	-7,95	-12,04	-7,54	-10,75	-12,13
2	-9,06	-13,70	-6,52	-9,25	-15,15

*Кристалічні структури ферменту, згідно з даними RSCB Protein Data Bank (PDB коди: 1NL9, 1PHO, 1Q6M, 2CM8, 2CNF).

шою, ніж вплив сполуки **1**. При цьому обидва інгібітори значною мірою впливають також на TC-PTP, яка близька до PTP 1B за структурою і локалізацією в живій клітині, та селективні у порівнянні з впливом на LAR-PTP. Ці дослідження фосфорильованих каліксаренів як інгібіторів PTP 1B вказують на перспективність застосування калікс[4]арену й тіакалікс[4]арену як молекулярної платформи в процесі подальшого дизайну фосфороорганічних сполук. Очевидно, подібні макроцикли можуть мати різні біоізостерні відносно фосфотирозину замісники, а їх кількість і положення визначатимуть ефективність та селективність інгібування ферменту. Тому хімічний синтез нових похідних калікс[4]аренів, комп'ютерне моделювання та дослідження *in vitro* можуть бути складовими подальшого пошуку інгібіторів PTP 1B як потенційних лікарських засобів.

Дослідження виконано за підтримки фонду УНТЦ (проект № 5215).

1. *Blaskovich M. A.* Drug discovery and protein tyrosine phosphatases // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – **16**. – P. 2095. – 2176.
2. *Yip S.-C., Saha S., Chernoff J.* PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis // *Trends in Biochem. Sci.* – 2010. – **35**. – P. 442–449.
3. *Zhang S., Zhang Z. Y.* PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery // *Drug Discovery Today*. – 2007. – **12**. – P. 373–381.
4. *Tautz L., Mustelin T.* Strategies for developing protein tyrosine phosphatase inhibitors // *Methods*. – 2007. – **42**. – P. 250–260.
5. *Zhang S., Zhang Z.-Y.* PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery // *Drug Discovery Today*. – 2007. – **12**, No 9./10. – P. 373–381.
6. *Vintonyak V. V., Antonchick A. P., Rauh D., Waldmann H.* The therapeutic potential of phosphatase inhibitors // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2009. – **13**. – P. 272–283.
7. *Erbe D. V., Klaman L. D., Wilson D. P. et al.* Prodrug delivery of novel PTP1B inhibitors to enhance insulin signalling // *Diabetes Obes. Metab.* – 2009. – **11**. – P. 579–588.
8. *Stuible M., Doody K. M., Tremblay M. L.* PTP1B and TC-PTP: regulators of transformation and tumorigenesis // *Cancer Metastasis Rev.* – 2008. – **27**. – P. 215–230.
9. *Vovk A., Kalchenko V., Cherenok S. et al.* Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – **2**, No 21. – P. 3162–3166.
10. *Cherenok S., Vovk A., Muravyova I. et al.* Calix[4]arene α -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatase // *Org. Lett.* – 2006. – **8**, No 4. – P. 549–552.
11. *Lalor R., Baillie-Johnson H., Redshaw C. et al.* Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – **130**, No 10. – P. 2892–2893.
12. *Vovk A. I., Kononets L. A., Tanchuk V. Yu. et al.* Inhibition of Yersinia protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes // *Bio. Med. Chem. Lett.* – 2010. – **20**. – P. 483–487.
13. *Vovk A. I., Kononets L. A., Tanchuk V. Yu. et al.* Thiacalix[4]arene as molecular platform for design of alkaline phosphatase inhibitors // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2010. – **66**. – P. 271–277.
14. *Maccari R., Paoli P., Ottana R. et al.* 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – **15**. – P. 5137–5149.
15. *Liu S., Zeng L.-F., Wu L. et al.* Targeting inactive enzyme conformation: aryl diketoacid derivatives as a new class of PTP1B inhibitors // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – **130**. – P. 17075–17084.

*Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України, Київ
Інститут органічної хімії НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 01.11.2011

В. В. Труш, В. Ю. Танчук, Л. А. Кононец, А. Б. Драпайло,
член-корреспондент НАН Украины **В. И. Кальченко,**
член-корреспондент НАН Украины **А. И. Вовк,**
академик НАН Украины **В. П. Кухарь**

Ингибирование протеинтирозинфосфатаз фосфоновыми кислотами на платформе каликс[4]арена и тиакаликс[4]арена

Впервые показано, что каликс[4]арен- и тиакаликс[4]арен-тетракис-метилфосфоновые кислоты ингибируют человеческую протеинтирозинфосфатазу 1B с IC_{50} в низкомикромолярном диапазоне значений. Фосфорилированный тиакаликс[4]арен демонстрировал более сильное влияние на фермент, чем его каликс[4]ареновый аналог. Оба макроциклические ингибиторы были селективными по сравнению с PTP-LAR, однако не проявляли селективность или же были мало селективными по сравнению с T-клеточной протеинтирозинфосфатазой и PTP- β . Полученные результаты свидетельствуют о перспективности фосфонатных производных каликс[4]арена для поиска новых ингибиторов PTP 1B.

V. V. Trush, V. Yu. Tanchuk, L. A. Kononets, A. B. Drapailo,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. I. Kalchenko,**
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Vovk,**
Academician of the NAS of Ukraine **V. P. Kukhar**

Inhibition of protein tyrosine phosphatases by phosphonic acids on calix[4]arene and thiacalix[4]arene platform

It is shown for the first time that calix[4]arene and thiacalix[4]arene-tetrakis-methylphosphonic acids inhibit the activity of human protein tyrosine phosphatase 1B with IC_{50} values in the low micromolar range. The phosphorylated thiacalix[4]arene displayed a stronger effect on the enzyme than its calix[4]arene analogue. Both macrocyclic compounds are selective over PTP-LAR, but show no selectivity or low selectivity over T-cell PTP and PTP- β . The results indicate that (thia)calix[4]arene phosphonate derivatives can be considered as promising candidates in the search for new PTP1B inhibitors.