

Інгібітори протеїнкінази FGFR1 із класу фенілгідразинів

А.А. Грищенко*, В.Г. Бджола, А.О. Баланда, С.С. Лукашов,
І.М. Фесун, С.М. Ярмолук

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

Резюме. Протеїнкіназа FGFR1 відіграє ключову роль у процесі пухлинної трансформації тканин та онко-васкулогенезу. Інгібітори цієї кінази можуть використовуватись як протипухлинні засоби. У цій роботі досліджено інгібітори протеїнкінази FGFR1 із класу фенілгідразинів, знайденого в ході пошуку інгібіторів FGFR1 за допомогою віртуального скринінгу. Найбільш активним виявився 2-метокси-4-[(5-трифлуорметил-піридин-2-іл)-гідразонметил]-фенол із IC₅₀ 2,5 мкМ. Визначено структурні особливості досліджених сполук, пов'язані з проявленням інгібіторної активності.

Ключові слова: протеїнкіназа FGFR1, фенілгідразини, докінг, інгібітор.

Вступ. Рецептор фактора росту фібробластів 1 (FGFR1) — трансмембранний білок, що відноситься до групи рецепторних тирозинових протеїнкіназ. Функція FGFR1 полягає в активації мітогенного, антиапоптичного й ангіогенного сигналів у клітинах. У різних типах клітин активація FGFR1 викликає міграцію клітин, диференціювання та проліферацію. Зміна рівня експресії або активності протеїнкінази FGFR1 спричиняє розвиток різних патологій (утворення пухлин, ревматоїдний артрит, діабетична ретинопатія та судинні проліферативні захворювання, зокрема атеросклероз) [1]. FGFR1 бере участь в утворенні та формуванні кровоносних судин, що робить її однією з перспективних мішеней для пригнічення пухлинного неоваскулярогенезу [2]. Показано пряму участь патологічної активації FGFR1 у розвитку ряду пухлин [3]. Отже, FGFR1 є перспективною мішенню для пошуку препаратів для лікування ряду хвороб, включаючи пухлини.

Перспективним підходом для пошуку нових інгібіторів є рецепторно-орієнтований вір-

туальний скринінг, який було використано для пошуку інгібіторів FGFR1 серед колекції хімічних сполук відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. У цій роботі описано інгібітори класу фенілгідразинів, знайдені в ході віртуального скринінгу й додатково досліджені на предмет перспективності подальшого їх розроблення та оптимізації.

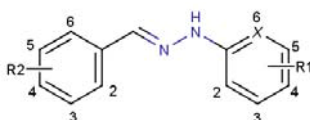
Матеріали і методи. Віртуальний скринінг сполук здійснювали за допомогою програми «AutoDock 4.2» [4]. Докінг виконували в АТФ-зв'язувальний сайт активної форми кінази. Підготовку лігандів і рецептора для докінгу, візуалізацію результатів докінгу було проведено за допомогою програми «MGL Tools». Як мішеней для докінгу використовували субодичицю А комплексу протеїнкінази FGFR1 зі стабільним аналогом АТФ (код PDB банку 3GQI) [5]. Отримані методом молекулярного докінгу комплекси оцінювали візуально і за величиною енергії зв'язування з кіназою. Перспективні сполуки відбирали для тестування *in vitro*. Для тестів використовували активованний кіназний домен людської FGFR1. Активність FGFR1 визначали за включенням радіоактивного фосфору в пептидний субстрат кінази при його фосфорилюванні кіназою у при-

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5263449

E-mail address: andrey.grisch@gmail.com

Структура й активність сполук 1-6



№ сполуки	R1	R2	X	Залишкова активність FGFR1, %	IC ₅₀ , мкМ
1	2,4-ОН	4-CF ₃	N	10	2,72
2	3-OCH ₃ , 4-ОН	4-CF ₃	N	9	2,5
3	2-ОН	4-CF ₃	N	15	20
4	4-COOSH ₃	2-COОН	C	100	–
5	2,4-ОН	4-COОН	C	64	–
6	3-OCH ₃ , 4-ОН	4-COОН	C	98	–

сутності γ -³²P-АТФ [6]. Концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. У негативний контроль замість розчину сполук додавали розчинник ДМСО. Концентрація сполук у реакційній суміші становила 33 мкМ. Залишкову активність кінази виражали у відсотках від активності кінази в негативному контролі (100 %). Для сполук, які зменшували активність кінази до 30 %, побудовано криві залежності активності ферменту від концентрації інгібітора і за ними визначено IC₅₀.

Результати й обговорення. Для пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було використано віртуальний скринінг методом молекулярного докінгу. Інгібітори визначали серед колекції хімічних сполук відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Колекція налічує близько 100 000 сполук. Серед інгібіторів було знайдено сполуку класу бензилідин-гідразинпіридинів із IC₅₀ 2,72 мкМ (сполука 1 в табл. 1). Сполуки цього класу відомі як малоактивні інгібітори тирозинової протеїнкінази LCK [7]. Ця кіназа належить до родини тирозинових протеїнкіназ, як і досліджувана FGFR1, проте сполуки мають IC₅₀ в межах сотень мкМ. Цей клас є перспективним для пошуку інгібіторів FGFR1, оскільки знайдена під час скринінгу сполука має IC₅₀ менше 10 мкМ, і за вдалої оптимізації можливе отримання більш активних інгібіторів цього класу. Для пошуку можливих шляхів оптимізації були досліджені близькі структурні аналоги цієї сполуки з бази хімічних сполук. Аналоги сполуки 6 вибирали з бази мето-

дом субструктурного пошуку і за схожістю за індексом Танімото, після чого їх перевіряли в тестах *in vitro*. При цьому було виявлено ще кілька сполук, що інгібували кіназу. Найбільш активним інгібітором FGFR1 виявилася сполука 2-метокси-4-[(5-трифлуорметил-піридин-2-іл)-гідразонметил]-фенол (4) із IC₅₀ 2,5 мкМ. Хімічні структури протестованих сполук та їх інгібіторну активність наведено в табл. 1.

Положення сполук цього класу в сайті зв'язування АТФ, знайдене методом молекулярного моделювання (рис. 1), має ознаки, що характерні для АТФ-конкурентних інгібіторів кіназ типу I [8].

Піридиновий фрагмент сполук 4-6 або фенільний сполук 1-3 знаходяться в аденінзв'язувальному підсайті, утворюючи гідروفобні зв'язки з амінокислотними залишками

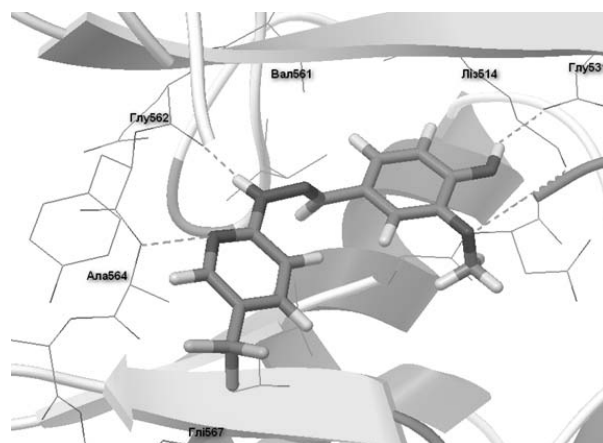


Рис. 1. Сполука 4 в АТФ-зв'язувальному сайті FGFR1 за даними молекулярного моделювання.

Лей630, Тир563 і Ала512. Атом Нітрогену піридину та аміногрупа гідразину формують два водневих зв'язки з амінокислотними залишками шарнірного регіону кінази Глу562 й Ала564. Наявність подібних водневих зв'язків із шарнірним регіоном є важливою умовою проявлення інгібіторних властивостей для АТФ-конкурентних інгібіторів кіназ.

Сполуки **1-3**, які містять феніл замість піридину і утворюють лише один водневий зв'язок між Оксигеном основного ланцюга Глу562 та аміногрупою гідразину, не були активними в тестах інгібування. Відсутність другого водневого зв'язку із шарнірним регіоном кінази веде до зменшення афінності інгібітора до сайту зв'язування і може призводити до падіння активності. Крім того, це може свідчити на користь правильності знайденого молекулярним моделюванням положення цього класу інгібіторів у сайті зв'язування кінази. Трифлуорметильна група направлена в бік оточуючого кіназу водного середовища й утворює водневий зв'язок з аміногрупою основного ланцюга Глі567. Фенільна група, протилежна піридину, направлена в гідروفобну задню кишеню АТФ-зв'язувального сайту, створює гідروفобні контакти з амінокислотними залишками Мет535, Вал561 та Іле545. Замісники

в цьому фенільному кільці утворюють водневі зв'язки з аміногрупою бічного ланцюга Ліз514 і карбонільною групою бічного ланцюга Глу531. Ці дві амінокислоти є консервативними залишками фосфатзв'язувального сайту кінази, водневі зв'язки з ними часто зустрічаються в активних інгібіторах кіназ. Комбінація пара-гідрокси- та мета-метоксигруп у сполуці **4** виявилася більш ефективною для інгібіторів FGFR1, ніж пара- та орто-гідроксильних груп у сполуці **6**. Наявність однієї орто-гідроксильної групи в сполуці **5** веде до значного зниження інгібування. Можна зробити висновок про необхідність пара-гідроксильної групи для проявлення активності цього класу інгібіторів, що може бути використано при оптимізації інших класів інгібіторів зі схожим положенням у сайті зв'язування.

Висновки. У роботі досліджено інгібітори протеїнкінази FGFR1 класу фенілгідразинів. IC₅₀ найбільш активної сполуки становить 2,5 мкМ. Припускається, що інгібіторні властивості забезпечують атом Нітрогену піридину та пара-гідроксильна група фенілу. Цей клас інгібіторів може бути застосований для подальшого розроблення інгібіторів FGFR1.

Надійшла в редакцію 22.06.2012 р.

Inhibitors of protein kinase FGFR1 from phenylhydrazine class

A.A. Gryshchenko, V.G. Bdzhola, A.O. Balanda, S.S. Lukashov, I.M. Fesun, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotno Str., Kyiv, 03680, Ukraine

Summary. Protein kinase FGFR1 plays a key role in oncogenic transformation and oncovasculogenesis. Inhibitors of this kinase can be used as anticancer drugs. In this work phenylhydrazines as inhibitors of protein kinase FGFR1 were investigated. Phenylhydrazines were found by virtual screening. The most active compound was 2-methoxy-4-[(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yl)-hydrazonomethyl]-phenol with IC₅₀ 2,5 μM. Structure features of investigated compounds related to inhibition activity were defined.

Keywords: protein kinase FGFR1, phenylhydrazine, docking, inhibitor.

Перелік літератури

1. *Coutou X.* Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases // *Birth Defects Res C Embryo Today.* — 2003. — Vol. 69, No. 4. — P. 286-304.
2. *Murakami M., Elfenbein A., Simons M.* Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis // *Cardiovasc Res.* — 2008. — Vol. 78, No. 2. — P. 223-231.
3. *Acevedo V.D., Ittmann M., Spencer D.M.* Paths of FGFR-driven tumorigenesis // *Cell Cycle.* — 2009. — Vol. 8, No. 4. — P. 580-588.
4. *Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *J. Comput. Chem.* — 1998. — Vol. 19. — P. 1639-1662.
5. *Bae J.H., Lew E.D., Yuzawa S., Tome F., Lax I., Schlessinger J.* The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site // *Cell.* — 2009. — Vol. 138, No. 3. — P. 514-524.
6. *Hastie C.J., McLauchlan H.J., Cohen P.* Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1, No. 2. — P. 968-971.
7. *Cushman M., Nagarathnam D., Gopal D., Geahlen R.L.* Synthesis and evaluation of new protein-tyrosine kinase inhibitors. Part 2. Phenylhydrazones // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 1991. — Vol. 1. — P. 215-218.
8. *Zhang J., Yang P.L., Gray N.S.* Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // *Nat. Rev. Cancer.* — 2009. — Vol. 1. — P. 28-39.