

Похідні піридин-3-карбонітрилів як нові інгібітори протеїнкінази FGFR1

С.А. Старосила^{1*}, М.В. Протопопов¹, І.В. Дяченко³, А.О. Баланда²,
В.Д. Дяченко³, С.М. Ярмолюк²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

³ Луганський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Оборонна, 2, Луганськ, 91011, Україна

Резюме. Протеїнкіназа FGFR1 відіграє одну з ключових ролей у регуляції диференціації та проліферації клітин. Інгібітори цієї кінази є перспективними для ефективного лікування солідних пухлин і ряду проліферативних захворювань. У роботі проведено пошук інгібіторів FGFR1 шляхом віртуального скринінгу та біохімічних тестів *in vitro*. Виявлено 3 сполуки, які інгібують протеїнкіназу в мікромолярному діапазоні концентрацій. IC₅₀ найбільш активної сполуки 2-((2-(4-хлорофеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(4-гідроксифеніл)-6,7-дигідро-5H-циклопента[b]піридин-3-карбонітрил становить 1,58 мкМ. Досліджено механізм зв'язування знайдених сполук з активним центром FGFR1.

Ключові слова: протеїнкіназа FGFR1, рецепторно-орієнтований докінг, інгібітор.

Вступ. Кіназа рецептора фактора росту фібробластів 1 (FGFR1) належить до родини рецепторних тирозинових протеїнкіназ (РТК). Активність протеїнкінази FGFR1 є ключовою для ряду процесів, таких як міграція, диференціація та проліферація клітин. Порушення експресії генів або зміна активності цієї протеїнкінази викликає ряд патологій: ревматоїдний артрит, утворення пухлин, діабетичну ретинопатію і судинні проліферативні захворювання, зокрема атеросклероз [1].

Підвищення активності FGFR1 разом з іншими кіназами РТК (VEGFR і EGFR) забезпечує процес неоваскуляризації пухлинної тканини, що зумовлює ріст солідних пухлин. Бло-

кування онкоангіогенезу веде до зупинки росту пухлини та некрозу. Таким чином, одним із підходів у лікуванні солідних пухлин є пригнічення онкогенного неоваскулогенезу шляхом інгібування активності РТК, зокрема FGFR1. З огляду на це останнім часом ведеться інтенсивний пошук інгібіторів РТК для застосування їх як протипухлинних препаратів [2].

На сьогодні відомо небагато інгібіторів FGFR1 [3]. Деякі з них перебувають на стадії клінічних випробувань, проте вони є активними відносно всіх протеїнкіназ FGFR, які між собою є висококонсервативними. Найбільш селективний клас інгібіторів FGFR1 — піридопіримідини, проте вони не пройшли клінічних випробувань через високу токсичність і використовуються лише з дослідницькою метою [3]. Тому пошук нових хімічних класів сполук, що виявлятимуть інгібіторну активність

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5260759

E-mail address: starosila@gmail.com

© С.А. Старосила, М.В. Протопопов, І.В. Дяченко, А.О. Баланда, В.Д. Дяченко, С.М. Ярмолюк, 2013

до цієї кінази, є перспективним та актуальним [4].

Метою цієї роботи був дизайн інгібіторів протеїнкінази FGFR1 за допомогою сучасних методів комп'ютерного моделювання і біохімічних тестів.

Матеріали та методи

Підготовка молекул лігандів і рецептора.

Для рецепторно-орієнтованого гнучкого докінгу використовували пакет програм «Autodock 4.2.6» [5]. Підготовку лігандів проводили за допомогою програм «Vega ZZ (command line)» [6] та «MGL Tools 1.5.6» [5].

Для проведення розрахунків у програмі «Autodock» вхідні формати даних рецептора і лігандів конвертували в спеціальний формат PDBQT, який містив координати атомів та часткові заряди. Формування файлів PDBQT для лігандів проводили програмою «Vega» з додаванням силового поля AUTODOCK і видаленням воднів у неполярних атомів. Карти рецептора готували в програмах «MGL Tools» та «AutoGrid».

Гнучкий докінг. Як мішень для докінгу використовували субодиночку А комплексу протеїнкінази FGFR1 із стабільним аналогом АТФ (код PDB банку 3GQI) [7]. З PDB-файлу було видалено молекули води, ліганд і незадіяну в докінгу субодиночку.

Встановлено такі параметри докінгу: крок поступального руху дорівнював 2 Å, кут кватерніону — 50°, торсійний кут — 50°. Ступінь торсійної свободи та коефіцієнт становили відповідно 2 і 0,274. Толерантність кластера — 2 Å. Зовнішня енергія решітки — 1000, максимальна початкова енергія — 0, максимальне число спроб — 10 000. Число структур у популяції — 300, максимальне число етапів оцінки енергії — 1 000 000, максимальне число генерацій — 27 000, кількість структур, які переходять до наступної генерації, — 1, рівень генної мутації — 0,02, рівень кросовера — 0,8, спосіб кросовера — арифметичний. α -Параметр розподілу Гауса дорівнював 0, β -параметр розподілу Гауса — 1. Кількість ітерацій генетичного алгоритму-пошуку Ламарка становила 10 для кожного ліганду.

Візуальний аналіз. Візуальний аналіз взаємодії сполук з амінокислотними залишками АТР-зв'язувальної кишені протеїнкінази

FGFR1 проводили в програмі «Discovery Studio Visualizer 4.0» [8].

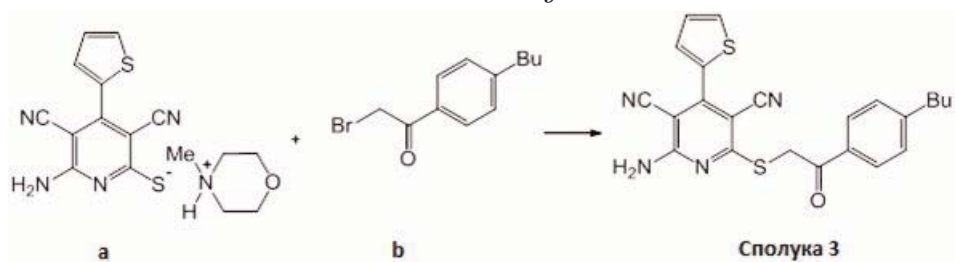
Тестування *in vitro*. Для тестів *in vitro* використовували кіназний домен FGFR1 людини, експресований у клітинах комах Sf21 (Upstate Millipore, cat. 14582). Інгібувальну активність досліджуваних сполук відносно FGFR1 визначали за включенням радіоактивного фосфору в пептидний субстрат при його фосфорилуванні протеїнкіназою в присутності γ -³²P-АТФ [9].

Загальний об'єм реакційної суміші становив 30 мкл. Спочатку до 6 мкл реакційного буфера (готується додаванням 10 мМ MOPS (pH 7,2), 0,1 мМ NaVO₄, 0,2 мМ EDTA, 0,002 % Brij 35, 0,2 мг/мл БСА і 0,02 % β -меркаптоетанолу) додавали 10,5 мкл стерильної дистильованої води та фермент в кількості 10,5 мU одиниць кіназної активності (7,35 нг білка) на пробу. Як субстрат використовували синтетичний пептид (послідовність субстрату I рецептора IGF, IGFIRtide) у кількості 4 мкг на пробу (2,5 μ l). Потім вносили 1 мкл інгібітора потрібної концентрації та через 3 хв. запускали реакцію, додаючи до 20 мкл об'єму реакційної суміші ще 10 мкл розчину: 150 мкМ АТФ; 30 мМ магній ацетату; 1,5 мМ HEPES, який також містив 1 мікрокурі γ -³²P-АТФ. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Реакційну суміш інкубували 30 хв. при 30 °С. Реакцію зупиняли додаванням 8 мкл 5 % фосфорної кислоти.

Увесь об'єм проби повністю переносили на фосфоцелюлозні фільтри «Whatman P81», які тричі по 5 хв. промивали 0,75% фосфорною кислотою. Фільтри висушували, їх радіоактивність вимірювали на сцинтиляційному лічильнику «Perkin Elmer», модель «Tri-Carb 2800-TR». Як негативний контроль використовували пробу з 1 мкл ДМСО (кінцева концентрація становила 3,8 %) замість інгібітора. Ступінь інгібування протеїнкінази визначали за співвідношенням включення ³²P за додавання інгібітора та за його відсутності.

Для сполук, які за концентрації їх у реакційній суміші 33 мкМ зменшували активність кінази більш ніж на 85 % від контролю, одразу будували титрувальні криві залежності активності ферменту від концентрації інгібітора. За цими кривими визначали значення IC₅₀.

Синтез сполуки 3



Сполуки, які зменшували активність кінази в межах 75-85 % від контролю, додатково перевіряли за їх концентрації в реакційній суміші 10 мкМ. IC_{50} визначали для сполук, які за такої концентрації зменшували активність кінази більш ніж на 55 % від контролю.

Методики синтезу.

2-((2-(4-Хлорофеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(4-гідроксифеніл)-6,7-дигідро-5H-циклопента[b]піридин-3-карбонітрил (сполука 1) було синтезовано згідно з [10].

2,2'-(Етан-1,2-діілбіс(сульфандііл)біс(5-ацетил-6-метилнікотинонітрил) (сполука 2) було синтезовано згідно з [11].

2-Аміно-6-((2-(4-бутилфеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(тіофен-2-іл)піридин-3,5-карбонітрил (сполука 3) було синтезовано за схемою 1.

До перемішуваної в 15 мл ДМФА 3,6 г

(10 ммоль) солі (a), отриманої за методом [12], додають 2,6 г (10 ммоль) 4-бутилфенацилброміду (b), перемішують 4 год. і розводять рівним об'ємом води. Утворений осад відфільтровують, промивають водою, етанолом та гексаном. Вихід 3,3 г (76 %), $T_{пл}$ 195-196 °С (AcOH). ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3174, 3292 (NH_2), 2225 (CN), 1706 (C=O), 1648 (δNH_2). Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч. (J, Гц): 0,91 т (3H, Me, $J=7,2$); 1,14-1,82 м (4H, $2CH_2$); 2,71 т (2H, $ArCH_2$, $J=7,7$); 4,99 с (2H, SCH_2); 7,28 дд (1H, H-4 тіофену, $J=6,3$ і 1,8); 7,32 д (2H, Ar, $J=7,1$); 7,61 д (1H, H-3 тіофену, $J=7,4$); 7,93-8,12 м (5H, м, $2H_{аром}$, NH_2 і H-5 тіофену). Мас-спектр, m/z ($I_{відн.}$, %): 433 $[M+1]^+$ (100). Знайдено, %: C 63,72; H 4,58; N 12,86. $C_{23}H_{20}N_4OS_2$. Розраховано, %: C 63,86; H 4,66; N 12,95.

ІЧ-спектр записано на приладі «FIR-spec-

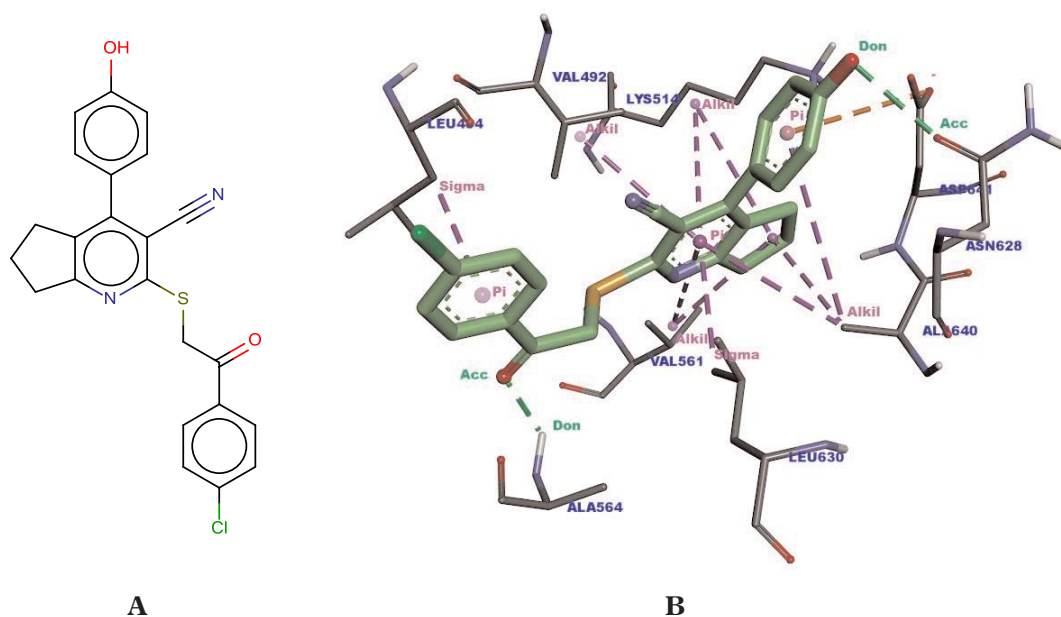


Рис. 1. А — сполука 1, В — механізм зв'язування сполуки 1 з активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими — гідрофобні, оранжевими — електростатичні; Pi — π -електронна хмара, Sigma — електронна пара типу σ , Alkil — алкіл

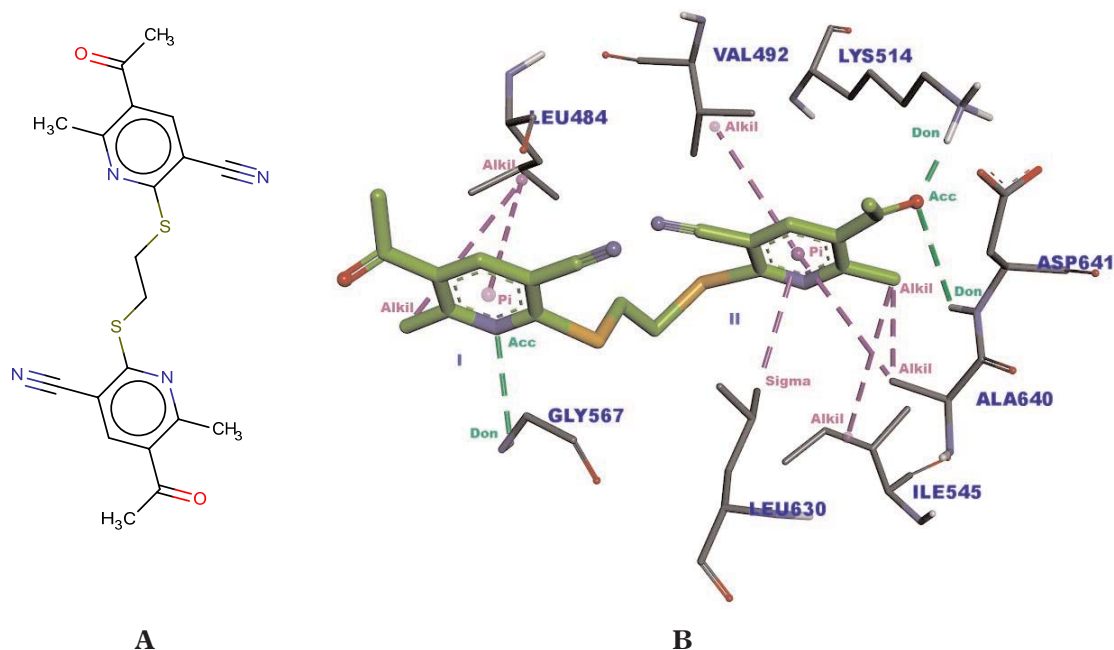


Рис. 2. А — сполука **2**, В — механізм зв'язування сполуки **2** з активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими — гідрофобні; Pi — π -електронна хмара, Sigma — електронна пара типу σ , Alkil — алкіл

trometer Spectrum One» (Perkin Elmer) у KBr. Спектр ЯМР ^1H реєстрували на приладі «Bruker Avance II 400» (399,95 МГц) у розчині ДМСО- d_6 , внутрішній стандарт — ТМС. Мас-спектр знімали на приладі «Crommas GC/MS-Hewlett-Packard 5890/5972», колонка HP-5 MS (70 eВ) у розчині CH_2Cl_2 . Температуру плавлення визначали на блоці Кофлера. Контроль за ходом реакції і чистотою отриманої сполуки здійснювали методом ТШХ на пластинках «Silufol UV-254», елюент — суміш ацетон-гексан, 3:5, проявники — пари йоду та УФ-випромінювання.

Результати й обговорення. Для пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено рецептор-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала 1 257 речовин. За допомогою програми «Autodock» розрахували енергії взаємодії з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази FGFR1. Для біохімічного тестування було відібрано 12 сполук із найкращими показниками енергій зв'язування комплексів «рецептор — ліганд».

Відібрані сполуки було протестовано за їх концентрації в реакційній суміші в 33 мкМ. При інгібуванні FGFR1 сполукою **1** залишкова активність кінази становила 11 %. Для цієї спо-

луки було побудовано титрувальну криву і визначено IC_{50} — 1,58 мкМ. Ще три менш активні сполуки додатково перевірили за концентрації 10 мкМ. Залишкова активність протеїнкінази при інгібуванні сполуками **2** і **3** за такої концентрації становила відповідно 33 і 28 %. Для них було визначено IC_{50} : 6,9 мкМ (для сполуки **2**), 4 мкМ (для сполуки **3**).

Ці інгібітори є перспективними для розробки на їх основі більш активних і селективних інгібіторів. З цією метою нами було вивчено комплекси АТФ-зв'язувального сайту FGFR1 та сполук **1-3**, отримані при молекулярному докінгу, і запропоновано для них способи зв'язування «ліганд — рецептор».

Сполука **1** розміщується в основних ділянках АТФ-зв'язувального сайту FGFR1 та взаємодіє з його ключовими амінокислотними залишками. Кетогрупа інгібітора утворює водневий зв'язок з амідною групою Ala564, що знаходиться в шарнірній ділянці кінази. 6,7-Дигідро-5Н-циклопента[*b*]піридиновий гетероцикл глибоко розташовується під фосфат-зв'язувальною ділянкою та утворює гідрофобні взаємодії типу π - σ , π -алкіл і алкіл-алкіл з амінокислотними залишками Val492, Lys514, Ala640, Leu630, Val561.

Фенольний залишок утворює гідрофобні

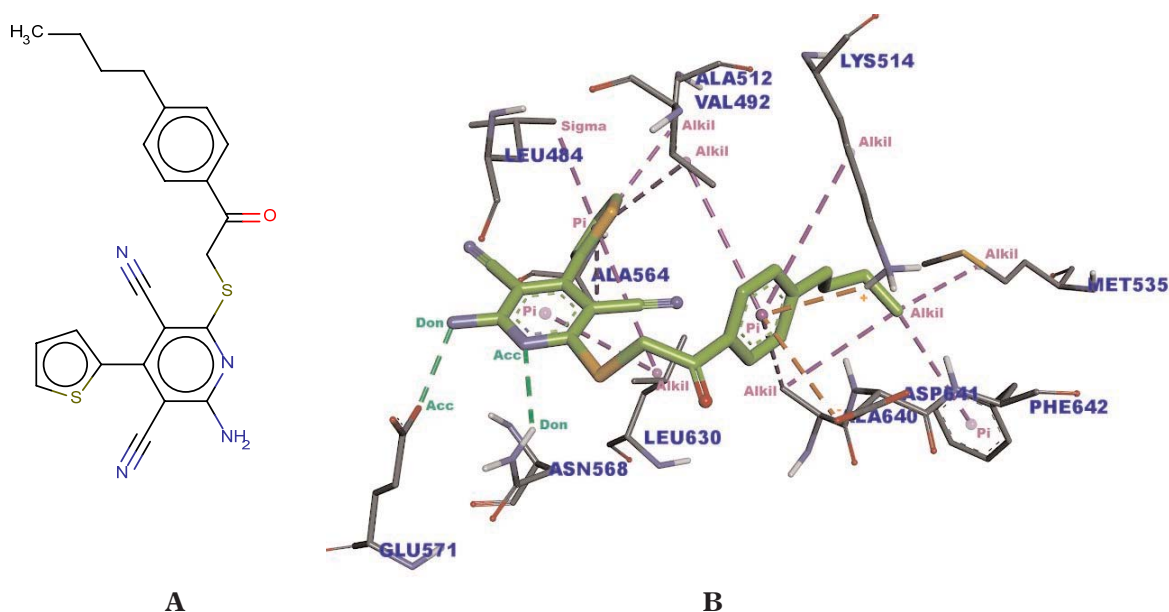


Рис. 3. А — сполука **3**, В — механізм зв'язування сполуки **3** з активним центром протеїнкінази FGFR1. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими — гідрофобні, оранжевими — електростатичні; Pi — π -електронна хмара, Sigma — електронна пара типу σ , Alkil — алкіл

взаємодії (π -алкіл) з Ala640 та електростатичний зв'язок типу π -аніон з Asp641, а також водневий зв'язок між фенольною групою інгібітора і кетогрупою Asn628. Гідрофобні взаємодії типу π - σ з Leu484 утворює залишок 4-хлорбензену (рис. 1).

Сполука **2** має подібний спосіб зв'язування з АТФ-зв'язувальним сайтом FGFR1, як і в сполуки **1**. Сполука симетрична, тому, щоб уникнути неоднозначностей, ми пронумерували однакові частини (рис. 2). Частина молекули I розташована в аденінзв'язувальній ділянці. Піридиновий цикл та метильний замісник утворюють гідрофобні взаємодії типу π -алкіл з амінокислотним залишком Leu484, нітроген піридинового циклу утворює водневий зв'язок з амідною групою Glu567, який знаходиться в шарнірній ділянці кінази. Частина молекули II займає гідрофобну ділянку під фосфатзв'язувальним сайтом та утворює гідрофобні взаємодії типу π -алкіл і π - σ з гідрофобними амінокислотними залишками Leu630, Ile545, Ala640, Val492, ацетильний замісник піридинового циклу утворює два водневі зв'язки з консервативними амінокислотними залишками Lys514 та Asp641 (рис. 2).

Сполука **3** має подібний спосіб зв'язування з АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази FGFR1, як у сполук **1** та **2**, за винятком відсут-

ності водневих зв'язків із шарнірною ділянкою кінази. Натомість інгібітор утворює водневі зв'язки між нітрогеном піридинового циклу та амідною групою Asn568 і аміногрупою 2-амінопіридинового залишку та карбоксильною групою Glu571. Також піридиновий цикл утворює гідрофобні взаємодії π -алкіл з Leu630. Тіофенове кільце розміщене в аденінзв'язувальній ділянці активного центру FGFR1 і утворює гідрофобні взаємодії, зокрема π -алкіл та π - σ з Leu484, Leu630, Ala564, Ala512, Val492. 4-Бутилбензеновий залишок розташовується у фосфатзв'язувальній ділянці і також утворює гідрофобні взаємодії (π -алкіл) з Val492, Lys 514 і Ala640 та електростатичні взаємодії з консервативними амінокислотними залишками Lys514 і Asp641 (рис. 3).

Висновки. За допомогою віртуального рецептор-орієнтованого скринінгу та біохімічного тестування знайдено нові інгібітори протеїнкінази FGFR1 — 2-((2-(4-хлорофеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(4-гідроксифеніл)-6,7-дигідро-5H-циклопента[b]піридин-3-карбонітрил, 2,2'-(етан-1,2-діілбіс(сульфандііл))біс(5-ацетил-6-метилнікотинонітрил) і 2-аміно-6-((2-(4-бутилфеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(тіофен-2-іл)піридин-3,5-карбонітрил. IC₅₀ активних сполук становить відповідно 1,58 мкМ, 4 мкМ, 6,9 мкМ.

Усі три сполуки мають подібний механізм зв'язування з активним центром кінази: утворюють водневі зв'язки з шарнірною ділянкою, гідрофобні взаємодії в аденінзв'язувальній ділянці та водневі, електростатичні і гідрофобні

взаємодії з ключовими амінокислотними залишками фосфатзв'язувального регіону. Ці інгібітори можуть стати основою для розробки більш активних та селективних інгібіторів протеїнкінази FGFR1.

Pyridine-3-carbonitrile derivatives as new FGFR1 protein kinase inhibitors

S.A. Starosyla¹, M.V. Protopopov¹, I.V. Dyachenko³, A.O. Balanda², V.D. Dyachenko³, S.M. Yarmoluk²

¹ Taras Shevchenko Kyiv National University
60, Volodymirska Str., Kyiv, 01601, Ukraine

² Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine

³ Taras Shevchenko Lugansk National University
2, Oboronna Str., Lugansk, 91011, Ukraine

Summary. Protein kinase FGFR1 plays a key role in the regulation of cell differentiation and proliferation. Inhibitors of this kinase can be used for effective treatment of solid tumors and proliferative diseases. The search of FGFR1 inhibitors was performed by using virtual screening approach and in vitro kinase assay. We have found 3 compounds inhibiting protein kinase in micromolar range. The most active compound was 2-((2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)thio)-4-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]pyridine-3-carbonitrile (IC₅₀=1,58 μM). Binding mode for tested inhibitors with FGFR1 ATP-binding site has been proposed.

Keywords: protein kinase FGFR1, receptor-based docking, inhibitor.

Перелік літератури

1. *Coutmoul 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. *Cohen P.* The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 1999. — Vol. 3. — P. 459-465.
3. *Greulich H., Pollock P.M.* Targeting mutant fibroblast growth factor receptors in cancer // *Trends Mol. Med.* — 2011. — 17, No. 5. — P. 283-292.
4. *Yarmoluk S.M., Nyporko A.Yu., Bdzholo V.G.* Rational design of protein kinase inhibitors // *Biopolymers and Cell*. — 2013. — Vol. 29, No. 4. — P. 339-347.
5. *Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility // *J. Computational Chemistry*. — 2009. — 16. — P. 2785-91.
6. *Pedretti A., Villa L., Vistoli G.* VEGA — An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script» programming // *J.C.A.M.D.* — 2004. — Vol. 18. — P. 167-173.
7. *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.
8. <http://accelrys.com/>
9. *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.
10. *Дяченко В.Д.* Синтез і алкилювання 4-[4-гідрокси(метокси)феніл]-3-ціано-6,7-дигідро-5Н-[1]-піридин-2(1Н)-тіонов // *Укр. хім. журн.* — 2006. — Т. 72, № 2. — С. 116-120.
11. *Якунин Я.Ю., Дяченко В.Д., Литвинов В.П.* Новый метод синтеза 5-ацетил-6-метил-3-цианопиридин-2(1Н)-тиона и его свойства // *ХГС*. — 2001. — № 5. — С. 633-639.
12. *Матросова С.В., Завьялова В.К., Литвинов В.П., Шаранин Ю.А.* Реакции циклизации нитрилов. Сообщение 51. Синтез и свойства 6-амино-3,5-дициано-4-(2-тиенил)-2(1Н)-пиридинтиона // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* — 1991. — № 7. — С. 1643-1646.