

Похідні тетразоло[1,5-с]хіназолінів як нові інгібітори протеїнкази СК2

С.А. Старосила^{1*}, М.В. Протопопов¹, О.Ю. Воскобойнік³,
І.С. Носуленко³, Л.М. Антипенко³, О.М. Антипенко³, І.М. Фесун²,
С.І. Коваленко³, 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 Запорізький державний медичний університет
пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна

Резюме. Шляхом віртуального скринінгу і біохімічних тестів *in vitro* проведено пошук нових інгібіторів СК2. Виявлено 2 сполуки, які інгібують протеїнказу в мікромолярному діапазоні концентрацій. Найбільш активна сполука N-(6-метоксибензо[d]тіазол-2-іл)-2-(тетразоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)ацетамід мала IC₅₀ = 4,9 мкМ. Вивчено механізм зв'язування досліджуваних сполук з активним центром СК2.

Ключові слова: протеїнказа СК2, рецепторно-орієнтований докінг, інгібітор.

Вступ. Казеїнказа 2 (СК2) належить до родини серин-треонінових протеїнказ. Це одна з перших відкритих протеїнказ, проте остаточно її функції не досліджено. На сьогодні показано, що протеїнказа СК2 залучена до процесів реплікації ДНК, транскрипції генів, росту клітин та апоптозу [1, 2]. З-поміж більш ніж 300 субстратів є білки, що забезпечують функціонування нуклеїнових кислот і задіяні в процесі трансляції, фактори транскрипції, білки сигнальної трансдукції, білки цитоскелета, ферменти метаболізму [3]. Надекспресія СК2 зумовлює розвиток ряду патологій, серед яких онкологічні захворювання [4, 5], хвороба Альцгеймера [6], гломерулонефрит [7], запальні процеси [8], деякі вірусні інфекції,

діабет-асоційовані захворювання очей [9]. З огляду на це протеїнказа СК2 є важливою фармакологічною мішенню, а її інгібітори можуть стати основою для розроблення протипухлинних, протівірусних і протизапальних препаратів.

Метою роботи став пошук нових інгібіторів протеїнкази СК2 серед функціональних заміщених тетразоло[1,5-с]-, триазоло[1,5-с]- та триазино[2,3-с]хіназоліну з використанням методів комп'ютерного моделювання і біохімічних тестів.

Матеріали і методи.

Підготовка молекул лігандів та рецептора. Рецептор-орієнтований гнучкий докінг проводили пакетом програм «Autodock 4.2.6» [10]. Ліганди і макромолекула готували в програмних пакетах «Vega ZZ (command line)» [11] та «MGL Tools 1.5.6» [10].

Програма «Autodock» працює з молекулами лігандів і рецептора у форматі PDBQT, що містить координати атомів та часткові заряди.

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5260759

E-mail address: yarmolyuksm@gmail.com

© С.А. Старосила, М.В. Протопопов, О.Ю. Воскобойнік, І.С. Носуленко, Л.М. Антипенко, О.М. Антипенко, І.М. Фесун, С.І. Коваленко, С.М. Ярмолюк, 2014

Конвертація файлів лігандів із формату Mol2 у PDBQT здійснювалась програмою «Vega» із видаленням воднів у неполярних атомів та додаванням силового поля AUTODOCK. Переведення рецептора з формату PDB у PDBQT та формування карт для докінгу здійснювалось у програмах «MGL Tools» і «AutoGrid».

Гнучкий докінг. Мішенню для докінгу було обрано каталітичну субодиницю протеїнкінази СК2, яку кристалізували з АМРРПН (код кристалу PDB банку 3NSZ) [12]. З файлу PDB було видалено молекули води, іони та ліганд.

Встановлено такі параметри докінгу: крок поступального руху дорівнював 2 Å, кут кватерніону — 50°, торсійний кут — 50°. Ступінь торсійної свободи і коефіцієнт становили відповідно 2 і 0,274. Толерантність кластеру — 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 дорівнював 10 для кожного ліганду.

Візуальний аналіз. Візуальний аналіз взаємодії сполук з амінокислотними залишками АТР-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 проводили в програмі «Discovery Studio Visualizer 4.0» [13].

Тестування *in vitro*. Для тестів *in vitro* використовували кіназний домен СК2 людини, експресований у клітинах комах Sf21 (Upstate Millipore). Інгібувальну активність досліджуваних сполук відносно протеїнкінази СК2 визначали за включенням радіоактивного фосфору в пептидний субстрат при його фосфорилюванні кіназою в присутності γ -³²P-АТФ [14].

Загальний об'єм реакційної суміші становив 30 мкл. Спочатку до 3 мкл реакційного буферу (готується додаванням 200 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 500 мМ KCl, 100 мМ MgCl₂) додавали 0,5 мкл розчину пептидного субстрату (RRRD-DDSDDD (New England Biolabs), 135 μ M), 15,5 мкл води і 0,05 мкл розчину протеїнкінази

(0,01 відносної протеїнкіназної активності). Потім вносили 1 мкл інгібітора потрібної концентрації та через 3 хв запускали реакцію додаванням до 20 мкл об'єму реакційної суміші ще 10 мкл розчину 150 мкМ АТР, який також містив 1 мікрокюрі 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 перенесли 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 Tri-Carb 2800-TR». Пробу з 1 мкл ДМСО (кінцева концентрація становила 3,8 %) замість інгібітора використовували як негативний контроль. Ступінь інгібування протеїнкінази визначали за співвідношенням включення ³²P за додавання інгібітора і за його відсутності.

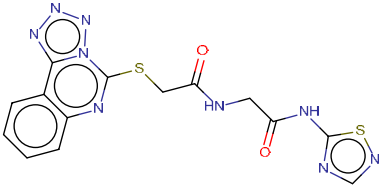
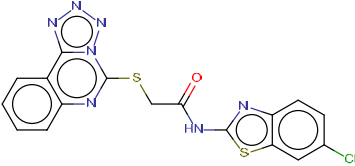
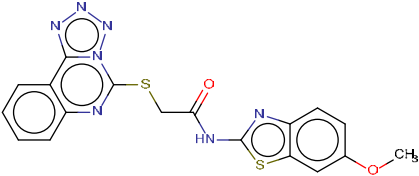
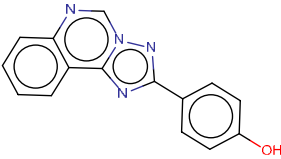
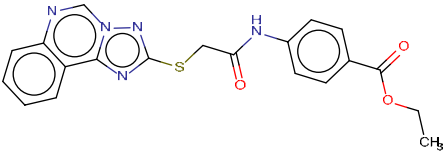
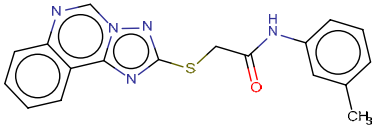
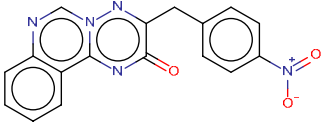
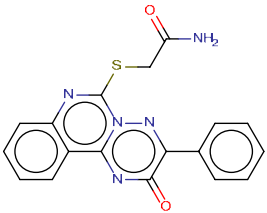
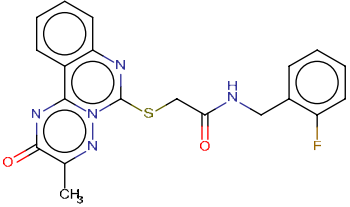
Для сполук, які за концентрації їх у реакційній суміші 33 мкМ зменшували активність кінази більш ніж на 80 % від контролю, будували титрувальні криві залежності активності ферменту від концентрації інгібітора. За цими кривими встановлювали значення IC₅₀.

Методики синтезу. Загальний метод синтезу *N*-заміщених 2-([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-ілтіо)ацетамідів (етиловий естер 4-(2-([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-ілтіо)-ацетамідо)бензойної кислоти — сполука **5**, 2-([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-ілтіо)-*N*-(*m*-толіл)ацетамід — сполука **6**) описано в [15].

До суспензії 5 ммоль (1,2 г) калій [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-тіолату, одержаного згідно з [16], у 10 мл пропанолу-2 додають 6 ммоль відповідного 2-хлорацетаміду. Суміш кип'ятять протягом 2 год, охолоджують та виливають у воду. Осад, що утворився, відфільтровують і сушать. За необхідності кристалізують із відповідного розчинника.

Загальний метод синтезу *N*-заміщених 2-(тетразоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)ацетамідів (*N*-(2-((1,3,4-тіадіазол-2-іл)аміно)-2-оксоетил)-2-(тетразоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)-ацетамід — сполука **1**, *N*-(6-хлорбензо[*d*]тіазол-2-іл)-2-(тетразоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)-ацетамід — сполука **2** і *N*-(6-метоксибензо[*d*]тіазол-2-іл)-2-(тетразоло[1,5-с]хіназолін-5-

Результати біохімічного тестування

Сполука	Хімічна формула	Залишкова активність протеїнкінази СК2 за концентрації інгібітора 33,3 мкМ, %	IC ₅₀ , мкМ
1		82	–
2		5	5,30
3		3	4,9
4		41	–
5		76	–
6		82	–
7		20	33,00
8		4	n/a
9		80	–

ілтіо)ацетамід — сполука **3**) подібний до методики [17].

До суспензії 5 ммоль калій тетраоло[1,5-с]хіназолін-5-тіолату, одержаного згідно з [18], у 20 мл пропанолу-2 додають 5 ммоль відповідного 2-хлорацетаміду. Суміш кип'ятять протягом 2 год, охолоджують і виливають у воду. Осад, що утворився, відфільтровують та висушують. За необхідності кристалізують із відповідного розчинника.

*Загальний метод синтезу 2-((3-*R*-2-оксо-2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)-тіо)ацетамідів* (2-((2-оксо-3-феніл-2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо)ацетамід — сполука **8** і N-(2-фторбензил)-2-((3-метил-2-оксо-2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)-тіо)ацетамід — сполука **9**) описано в [19].

До суспензії 5 ммоль калій 3-*R*-2-оксо-2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-тіолату, одержаного згідно з [20], у 20 мл пропанолу-2 додають 5,5 ммоль відповідного 2-хлорацетаміду. Суміш кип'ятять протягом 2 год, охолоджують. Осад, що утворився, відфільтровують і сушать. За необхідності кристалізують із відповідного розчинника.

*Метод синтезу 3-(4-нітробензил)-2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-ону* (сполука **7**) описано в [21].

До розчину 5 ммоль (0,8 г) 4-гідразінохіназоліну в оцтовій кислоті додають 5 ммоль (1,185 г) етилового естеру 3-(4-нітрофеніл)-2-оксопропанової кислоти. Суміш кип'ятять протягом 4 год, розчинник видаляють у вакуумі, додають 20 мл метанолу. Утворений осад фільтрують.

Метод синтезу 4-([1,2,4]триаоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)фенолу (сполука **4**) описано в [22].

До 5 ммоль 4-гідрокси N'-(хіназолін-4(3*H*)-іліден)бензогідразиду додають 10 мл оцтової кислоти та кип'ятять протягом 6 год. Розчинник видаляють за допомогою вакууму, додають 20 мл метанолу. Осад, що утворився, відфільтровують і сушать.

Результати й обговорення. Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецептор-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала 1520 сполук. За допомогою програми Autodock розраховували енергії

взаємодії з АТР-зв'язувальним сайтом протеїнкінази СК2. Для біохімічного тестування відібрали 9 сполук із найкращими показниками енергій зв'язування комплексів «рецептор—ліганд». Відібрані речовини відносилися до трьох хімічних класів — 2-([1,2,4]триаоло[1,5-с]хіназоліни, 2-(тетраоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)ацетаміди, 2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-они.

Ці сполуки було протестовано за їх концентрації в реакційній суміші в 33 мкМ. Активність проявили 2-(тетраоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)ацетаміди та 2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-они. При інгібуванні СК2 сполукою **2** залишкова активність кінази становила 5 %, сполукою **3** — 3 %, сполукою **7** — 20 %, сполукою **8** — 4 %. Для цих сполук побудовано титрувальні криві та встановлено значення ІС₅₀. 2*H*-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-они виявилися малоактивними — сполука **7** мала ІС₅₀=33 мкМ, а сполука **8** була неактивною. 2-(Тетраоло[1,5-с]хіназолін-5-ілтіо)ацетаміди були активними: сполука **2** мала ІС₅₀=5,3 мкМ, сполука **3** — ІС₅₀=4,9 мкМ (табл. 1).

Ці інгібітори є перспективними для розробки на їх основі більш активних і селективних інгібіторів. З цією метою ми ретельно вивчили комплекси АТФ-зв'язувального сайту СК2 та сполук **2** і **3**, отримані при молекулярному докінгу, та запропонували для них способи зв'язування «ліганд—рецептор».

Сполука **2** утворює зв'язки з ключовими амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту СК2. 6-Хлоро-1,3-бензотіазоловий замісник утворює гідрофобні зв'язки (π-алкіл, π-σ) з Leu45, Glu46, Val53. Тетраоло[1,5-с]хіназоліновий гетероцикл утворює гідрофобні зв'язки (π-алкіл, π-π) з Val66, Lys68, Phe113, Ile174, Ile95 і некласичний водневий зв'язок з Asp175 (між π-хмарою тетраололу й амідною групою амінокислотного залишку) (рис. 1).

Сполука **3** має подібний механізм зв'язування з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2, як у сполуки **2**. Інгібітор зміщений у сторону хінж-ділянки, з якою є водневий зв'язок між киснем метоксигрупи ліганду та аміногрупою Asn118. Зникли π-π-зв'язки між тетраоло[1,5-с]хіназоліновим гетероциклом і Phe113, з'явилися нові гідрофобні зв'язки з Lys68 та зв'язок між

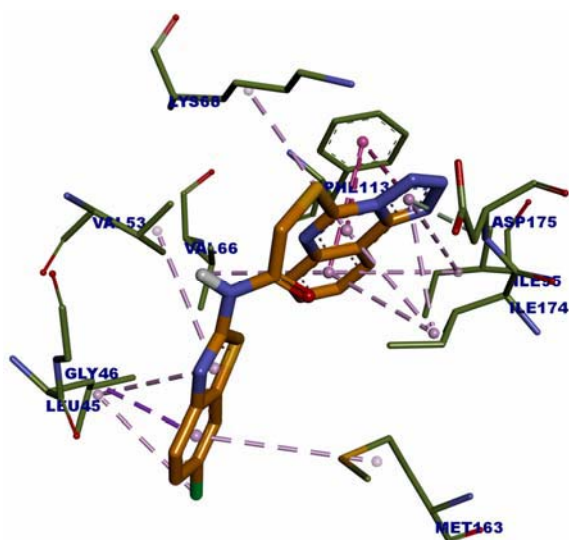


Рис. 1. Механізм зв'язування сполуки **2** з активним центром протеїнкінази CK2. Оливковими пунктирними лініями позначено некласичні водневі зв'язки, фіолетовими — гідрофобні π - σ -зв'язки, блідо-рожевими — гідрофобні π -алкіл-зв'язки, рожевими — гідрофобні π - π -зв'язки.

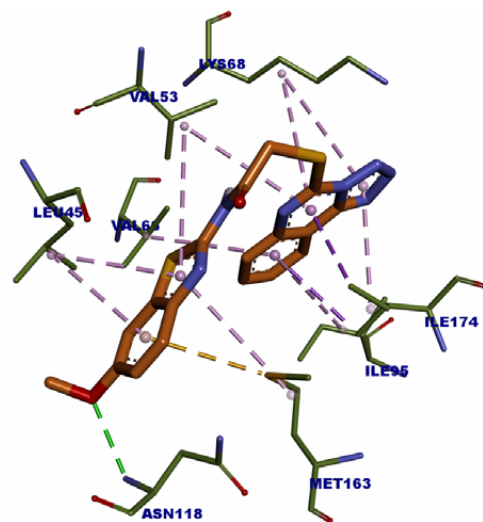


Рис. 2. Механізм зв'язування сполуки **3** з активним центром протеїнкінази CK2. Зеленими пунктирними лініями позначено класичні водневі зв'язки, фіолетовими — гідрофобні π - σ -зв'язки, блідо-рожевими — гідрофобні π -алкіл-зв'язки, жовтими — π -сульфур зв'язки.

π -хмарою 6-метокси-1,3-бензотіазолового замісника і сульфуром Met163. Ці зв'язки, зокрема водневий зв'язок із хінж-ділянкою, вплинули на поліпшення активності сполуки **3** (рис. 2).

Висновки. За допомогою віртуального рецептор-орієнтованого скринінгу та біохімічного тестування знайдено нові інгібітори проте-

їнкінази серед похідних 2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтіо)ацетамідів.

Найактивніша сполука — N-(6-метоксибензо[*d*]тіазол-2-іл)-2-(тетразоло[1,5-*c*]хіназолін-5-ілтіо)ацетамід — мала $IC_{50}=4,9$ мкМ. Ці інгібітори можуть слугувати основою для розробки більш активних та селективних інгібіторів протеїнкінази CK2.

Derivatives of tetrazolo[1,5-*c*]quinazolines as novel protein kinase CK2 inhibitors

S.A. Starosyla¹, M.V. Protopopov¹, O.Iu. Voskoboinik³, I.S. Nosulenko³,
L.M. Antypenko³, O.M. Antypenko³, I.M. Fesun², S.I. Kovalenko³, 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, Zabolotno Str., Kyiv, 03680, Ukraine

³ Zaporizhzhya State Medical University
26, Mayakovsky Ave., Zaporizhzhya, 69035, Ukraine

Summary. The search of CK2 inhibitors was performed by using virtual screening approach and *in vitro* kinase assay. We have found 2 compounds inhibiting protein kinase in micromolar range. The most active compound was N-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-(tetrazolo[1,5-*c*]quinazolin-5-ylthio)acetamide ($IC_{50}=4,9$ μ M). Binding mode for tested inhibitors with CK2 ATP-binding site has been proposed.

Keywords: protein kinase CK2, receptor-based docking, inhibitor.

Перелік літератури

1. Ghavidel A., Schultz M. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery // *Cell*. — 2001. — 106. — P. 575-584.
2. Ahmada K., Wanga G., Unger G., Slaton J., Ahmed K. Protein kinase CK2 — a key suppressor of apoptosis // *Adv Enzyme Regul.* — 2008. — 48. — P. 179-187.
3. Meggio F., Pinna L.A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2 // *FASEB J.* — 2003. — Vol. 3. — P. 349-68.
4. Trembley J.H., Wang G., Unger G., Slaton J., Ahmed K. Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2009. — 66. — P. 1858-67.
5. Tawfic S., Yu S., Wang H., Faust R., Davis A., Ahmed K. Protein kinase CK2 signal in neoplasia // *Histol. Histopathol.* — 2001. — 16. — P. 573-582.
6. Raftery M., Campbell R., Glaros E.N., Rye K.A., Halliday G.M., Jessup W., Garner B. Phosphorylation of apolipoproteinE at an atypical protein kinase CK2 PSD/E site in vitro // *Biochemistry.* — 2005. — 44, No. 19. — P. 7346-7353.
7. Yamada M., Katsuma S., Adachi T., Hirasawa A., Shirojima S., Kadowaki T., Okuno Y., Koshimizu T., Fujii S., Sekiya Y., Miyamoto Y., Tamura M., Yumura W., Nihei H., Kobayashi M., Tsujimoto G. Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2005. — 102, No. 21. — P. 7736-7741.
8. Singh N.N., Ramji D.P. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? // *J. Mol. Med. (Berl).* — 2008. — 86. — P. 887-897.
9. Ljubimov A.V., Caballero S., Aoki A.M., Pinna L.A., Grant M.B., Castellon R. Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2004. — 45. — P. 4583-4591.
10. 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.
11. 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.
12. Ferguson A.D., Sheth P.R., Basso A.D., Paliwal S., Gray K., Fischmann T.O., Le H.V. Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2 // *FEBS Letters.* — 2011. — 585. — P. 104-110.
13. <http://accelrys.com/>
14. 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.
15. Antipenko L.N., Karpenko A.V., Kovalenko S.I., Katsev A.M., Komarovska-Porokhnyavets E.Z., Novikov V.P. Synthesis, cytotoxicity by bioluminescence inhibition, antibacterial and antifungal activity of ([1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-2-ylthio)carboxylic acid amides // *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* — 2009, Vol. 342. — P. 651-662.
16. Karpenko A.V., Kovalenko S.I., Shishkina S.V., Shishkin O.V. An Efficient and convenient synthesis of 2-thio[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline and its derivatives // *Monatshefte fur Chemie / Chemical Monthly.* — 2006. — Vol. 137(12). — P. 1543-1549.
17. Antypenko O.M., Antypenko L.M., Kovalenko S.I., Katsev A.M., Achkasova O.M. Potential of N-aryl-(benzyl-,heteryl-)-2-(tetrazolo[1,5-c]quinazolin-5-ylthio)-acetamides as anticancer and antimicrobial agents // *Arabian Journal of Chemistry (in press).*
18. Antypenko L.M., Kovalenko S.I., Antypenko O.M., Katsev A.M., Achkasova O.M. Design and evaluation of novel antimicrobial and anticancer agents among tetrazolo[1,5-c]quinazoline-5-thione S-derivatives // *Sci Pharm.* — 2013. — Vol. 81(1). — P. 15-42.
19. Kovalenko S.I., Nosulenko I.S., Voskoboynik A.Yu., Berest G.G., Antipenko L.N., Antipenko A.N., Katsev A.M. Novel N-aryl(alkaryl)-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides: synthesis, cytotoxicity, anticancer activity, compare analysis and docking // *J. Med. Chem. Res.* — 2013. — Vol. 22(6). — P. 2610-2632.
20. Nosulenko I.S., Voskoboynik O.Yu., Berest G.G., Safronyuk S.L., Kovalenko S.I., Kamyshnyi O.M., Polishchuk N.M., Sinyak R.S., Katsev A.V. Synthesis 3-R-8-R¹-9-R²-10-R³-R-6-thioxo-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-2-ones, its antibacterial and antifungal activity // *Sci Pharm.* — 2014. — Vol. 82. — P. 483-500.
21. Voskoboynik O.Yu., Karpenko O.V., Sergeieva T.Yu., Kovalenko S.I., Okovytyy S.I. [5+1]-Heterocyclisation in synthesis of as-triazino[2,3-c]quinazoline systems // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* — 2013. — Т. 11(41). — С. 10-19.
22. Kovalenko S.I., Antypenko L.M., Bilyi A.K., Kholodnyak S.V., Karpenko O.V., Antypenko O.M., Mykhalova N.S., Los' T.I., Kolomoets O.S. Synthesis and anticancer activity of 2-alkyl(alkaryl-, aryl-, heteryl-)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines // *Sci Pharm.* — 2013. — Vol. 81(2). — P. 359-391.