

УДК 547.831.7

## Хімічна оптимізація амідів 3-карбоксихіноліну як інгібіторів протеїнкінази СК2

О.В. Остринська, А.Р. Синюгін, М.О. Чеканов, М.В. Протопопов,  
О.П. Кухаренко, С.М. Ярмолук\*

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

**Резюме.** Робота присвячена хімічній оптимізації похідних 2-хінолінону як перспективних інгібіторів протеїнкінази СК2. Запропоновано структури і синтезовано 15 нових сполук. Для найактивнішої сполуки (інгібітор **7a**,  $IC_{50}=2,3$  мкМ) отримано й досліджено комплекс з АТФ-акцепторним сайтом СК2 методом молекулярного моделювання.

**Ключові слова:** інгібітори СК2, 2-хінолінон, аміди 3-карбоксихіноліну.

**Вступ.** СК2 є консервативною убіквістичною конститутивно активною серин-треоніновою (відомі випадки фосфорилування залишків тирозину [1]) протеїнкіназою [2]. Цей ензим має велику кількість субстратів (понад 500 [3]), а також унікальну властивість використовувати як донор фосфату молекули АТФ і ГТФ [2]. СК2 залучена в різноманітні процеси в клітині, включаючи транскрипцію, трансляцію, проліферацію, диференціацію, виживання клітини й апоптоз [3].

Численні експериментальні дані вказують на участь СК2 у злоякісній трансформації клітин. Надекспресію цього ензиму спостерігають при пухлинах голови і шиї, молочних залоз, яєчників, простати, нирок, легень, гематологічних злоякісних новоутвореннях та ін. [4]. СК2 задіяна в процесах, що спричиняють стійкість до апоптозу, викликаного хіміопрепаратами [5]. Доведено участь цієї протеїнкінази в розвитку запальних процесів, нейродегенера-

тивних хвороб, захворюванні судин, патофізіології м'язів і кісток, вірусних інфекцій та ін. [6].

Тому СК2 є перспективною мішенню для пошуку інгібіторів як інструменту для вивчення ролі цього ензиму в клітині і в організмі в цілому та як попередників фармацевтичних засобів.

Раніше нами було проведено пошук нових інгібіторів СК2 серед похідних 2-хінолінону [7]. Ця робота присвячена їх хімічній оптимізації з метою покращення інгібувальної активності щодо СК2.

### Матеріали і методи

**Хімічний синтез.** Спектри ПМР синтезованих 2-хінолонів реєстрували на приладі «Varian VXR 400» з робочою частотою 400 МГц (розчинник DMSO-d<sub>6</sub>, внутрішній стандарт — ТМС). Величини хімічних змещень виміряли з точністю до 0,01 м.ч. Температури плавлення визначали в капілярі з точністю 1 °С і не уточнювались.

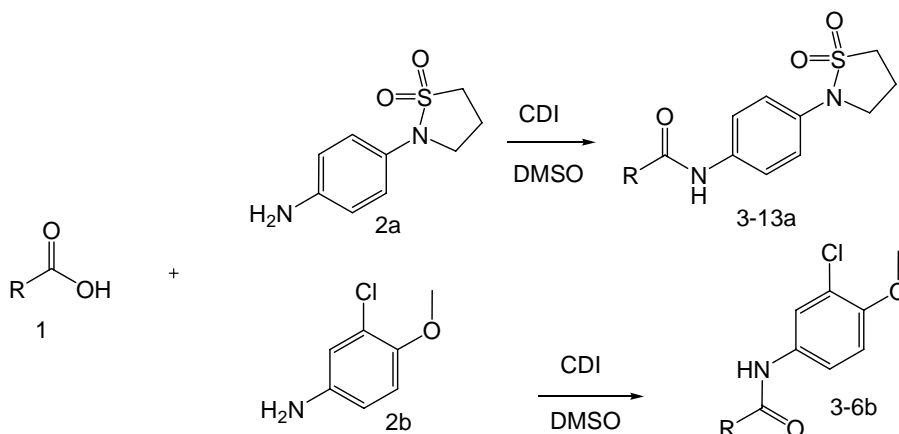
**Синтез амідів.** Загальну методика комбінаторного синтезу амідів **3-13a** та **3-6b** представлено на схемі 1. До розчину 0,2 ммоль синтезованої раніше відповідної кислоти **1** [8] у 3 мл диметилсульфоксиду при перемішуванні до-

\* Corresponding author.

Tel.: +38044-5222458

E-mail address: yarmolyuksm@gmail.com

## Загальна схема синтезу амідів 3-карбоксихіноліну



давали 0,036 г (0,22 ммоль) карбодімідазолу. Суміш перемішували 1 годину за кімнатної температури і додавали 0,2 ммоль відповідного аміну **2a-b** із подальшим нагріванням до 60 °С упродовж 12 годин. Після охолодження реакційну суміш виливали в 30 мл 1% розчину соляної кислоти та відфільтрували на центрифугі осад, що утворився. Після перекристалізації із системи 2-пропанол — диметилформамід продукт висушували у вакуумній сушильній шафі протягом 24 годин при 70 °С.

*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-6-метокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**3a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,42 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,08$  Hz), 3,50 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,08$  Hz), 3,75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5,86$  Hz), 3,84 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7,25 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,30$  Hz), 7,34-7,38 (m, 1H, CH), 7,44 (d, 1H, CH,  $J=8,79$  Hz), 7,54 (s, 1H, CH), 7,75 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,79$  Hz), 8,93 (s, 1H, CH), 12,23 (br. s., 1H, NH), 12,45 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=235$  °С; жовтувато-сірий порошок.

*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-7-метокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**4a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,42 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,32$  Hz), 3,47 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,32$  Hz), 3,75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5,13$  Hz), 3,89 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6,89-7,00 (m, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ), 7,25 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=7,81$  Hz), 7,72 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,30$  Hz), 7,90 (d, 1H, CH,  $J=8,30$  Hz), 8,87 (s, 1H, CH), 11,99 (br. s., 1H, NH), 12,32 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=279$  °С; сірий порошок.

*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**5a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,37-2,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,49 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,08$  Hz),

3,74 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5,37$  Hz), 3,84 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3,89 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7,00 (s, 1H, CH), 7,24 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,3$  Hz), 7,51 (s, 1H, CH), 7,73 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,3$  Hz), 8,85 (s, 1H, CH), 12,23 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=264$  °С; сірий порошок.

6-бром-*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**6a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,39-2,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,49 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,81$  Hz), 3,75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5,86$  Hz), 7,25 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,30$  Hz), 7,49 (d, 1H, CH,  $J=8,79$  Hz), 7,66 (s, 1H, CH), 7,74 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,30$  Hz), 7,95 (d, 1H, CH,  $J=7,81$  Hz), 8,95 (s, 1H, CH), 11,95 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=282$  °С; сірувато-жовтий порошок.

*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-6-фенокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**7a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,42 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,32$  Hz), 3,49 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,32$  Hz), 3,75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5,86$  Hz), 7,04 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=7,81$  Hz), 7,15 (t, 1H, CH,  $J=7,08$  Hz), 7,25 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,30$  Hz), 7,40 (t, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,06$  Hz), 7,46 (d, 1H, CH,  $J=6,84$  Hz), 7,51-7,56 (m, 1H, CH), 7,70 (s, 1H, CH), 7,74 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=8,79$  Hz), 8,94 (s, 1H, CH), 12,12 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=320$  °С; жовтий порошок.

5-оксо-*N*-[4-(1,1-діоксидіізотіазолідин-2-іл)феніл]-2,3-дигідро-1*H*,5*H*-піридо[3,2-*ij*]хінолін-6-карбоксамід (**8a**).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,39-2,44 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,01 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,50 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=7,57$  Hz), 3,75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6,10$  Hz), 4,23 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,25 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=7,81$  Hz), 7,32 (s, 1H, CH), 7,57 (s, 1H, CH), 7,77 (d, 2H,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $J=7,81$  Hz), 7,88 (d, 1H, CH,  $J=6,84$  Hz), 8,95 (s, 1H, CH), 12,15 (br. s., 1H, NH).  $T_{\text{mpt}}=250$  °С; сірий порошок.

9-бром-5-оксо-*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіа-  
золідин-2-іл)феніл]-2,3-дигідро-1*H*,5*H*-піри-  
до[3,2,1-*ij*]хінолін-6-карбоксамід (**9a**). <sup>1</sup>HNMR  
(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
3,00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,48 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=7,32 Hz),  
3,76 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5,86 Hz), 4,19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
7,26 (m, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 7,75 (m, 3H, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>), 8,16 (s, 1H,  
CH), 8,92 (s, 1H, CH), 12,03 (br. s., 1H, NH).  
T<sub>пл</sub>=244 °C; жовтий порошок.

*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіазолідин-2-іл)фе-  
ніл]-7-метокситетразоло[1,5-*a*]хінолін-4-  
карбоксамід (**10a**). <sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,42  
(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,77 (m, 2H,  
CH<sub>2</sub>), 3,98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,31 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,  
J=7,81 Hz), 7,74 (s, 1H, CH), 7,84 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,  
J=8,32 Hz), 8,03 (d, 1H, CH, J=10,25 Hz), 8,62 (d,  
1H, CH, J=8,30 Hz), 8,94 (s, 1H, CH), 10,86 (br. s.,  
1H, NH). T<sub>пл</sub>=289 °C; жовтий порошок.

7-бром-*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіазолідин-  
2-іл)феніл]тетразоло[1,5-*a*]хінолін-4-кар-  
боксамід (**11a**). <sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,44 (m,  
2H, CH<sub>2</sub>), 3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
7,31 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, J=8,30 Hz), 7,85 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,  
J=8,79 Hz), 8,12 (d, 1H, CH, J=10,25 Hz), 8,26 (d,  
1H, CH, J=7,32 Hz), 8,79 (s, 1H, CH), 8,96 (s, 1H,  
CH), 10,84 (br. s., 1H, NH). T<sub>пл</sub>=304 °C; жовтий  
порошок.

8-бром-*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіазолідин-  
2-іл)феніл]тетразоло[1,5-*a*]хінолін-4-кар-  
боксамід (**12a**). <sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,38 (m,  
2H, CH<sub>2</sub>), 3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
7,31 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, J=7,81 Hz), 7,85 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>,  
J=5,86 Hz), 8,12 (s, 1H, CH), 8,24 (d, 1H, CH,  
J=6,84 Hz), 8,74 (s, 1H, CH), 9,01 (s, 1H, CH),  
10,84 (br. s., 1H, NH). T<sub>пл</sub>=296 °C; жовтий поро-  
шок.

*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіазолідин-2-іл)фе-  
ніл]-7-фенокситетразол[1,5-*a*]хінолін-4-  
карбоксамід (**13a**). <sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,40  
(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (m, 2H,  
CH<sub>2</sub>), 7,19 (d, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, J=7,32 Hz), 7,27-7,34 (m,  
3H, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>), 7,44-7,54 (m, 3H, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>), 7,84 (d, 2H,  
C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, J=8,30 Hz), 8,09 (s, 1H, CH), 8,73 (d, 1H,  
CH, J=9,77 Hz), 8,96 (s, 1H, CH), 10,83 (br. s., 1H,  
NH). T<sub>пл</sub>=298 °C; сірий порошок.

*N*-(3-хлор-4-метоксифеніл)-6-метокси-2-  
оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамід (**3b**).  
<sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,83 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,86 (s,  
3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,16 (d, 1H, CH, J=8,30 Hz), 7,34 (d,  
1H, CH, J=7,81 Hz), 7,39-7,45 (m, 1H, CH), 7,52

(s, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 7,99 (s, 1H, CH), 8,89 (s, 1H, CH),  
12,32 (br. s., 1H, NH). T<sub>пл</sub>=291 °C; світло-жовтий  
порошок.

9-бром-5-оксо-*N*-[4-(1,1-диоксидоізоіа-  
золідин-2-іл)феніл]-2,3-дигідро-1*H*,5*H*-піри-  
до[3,2,1-*ij*]хінолін-6-карбоксамід (**4b**). <sup>1</sup>HNMR  
(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
3,00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,48 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=7,32 Hz),  
3,76 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J=5,86 Hz), 4,19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  
7,26 (m, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 7,75 (m, 3H, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>), 8,16 (s, 1H,  
CH), 8,92 (s, 1H, CH), 12,03 (br. s., 1H, NH).  
T<sub>пл</sub>=244 °C; жовтий порошок.

*N*-(3-хлор-4-метоксифеніл)-7-фенокси-  
тетразоло[1,5-*a*]хінолін-4-карбоксамід (**5b**).  
<sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,89 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,16-  
7,30 (m, 4H, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>), 7,50 (t, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, J=6,59 Hz),  
7,67 (d, 1H, CH, J=8,30 Hz), 7,79 (d, 1H, CH,  
J=8,79 Hz), 8,01 (s, 1H, CH), 8,07 (s, 1H, CH), 8,72  
(d, 1H, CH, J=9,28 Hz), 8,92 (s, 1H, CH), 10,77 (br.  
s., 1H, NH). T<sub>пл</sub>=284 °C; сірий порошок.

2-аміно-*N*-(3-хлор-4-метоксифеніл)-6-  
феноксихінолін-3-карбоксамід (**6b**). <sup>1</sup>HNMR  
(DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,85 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7,17-7,31 (m,  
3H), 7,23-7,26 (m, 1H, CH), 7,44-7,48 (m, 2H,  
C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 7,53-7,55 (m, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 7,68 (d, 1H, CH,  
J=9,77 Hz), 7,88 (s, 1H, CH), 8,07 (d, 1H, CH,  
J=7,32 Hz), 8,62 (s, 1H, CH), 10,68 (br. s., 1H, NH).  
T<sub>пл</sub>=328 °C; темно-сірий порошок.

### Рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг

Підготовка молекул лігандів і рецептора.  
Для рецепторно-орієнтованого гнучкого докін-  
гу використовували пакет програм «Autodock  
4.2.6» [9]. Підготовку лігандів проводили за до-  
помогою програм «Vega ZZ (command line)»  
[10] та «MGL Tools 1.5.6» [9].

Для проведення розрахунків у програмі  
«Autodock» вхідні формати даних рецептора й  
лігандів конвертуються в спеціальний формат  
«PDBQT». Цей формат містить координати  
атомів і часткові заряди.

Формування файлів PDBQT, призначення  
торсійних кутів та видалення воднів у непо-  
лярних атомів здійснювали програмою «Vega  
ZZ». Вхідний PDBQT файл рецептора і карти  
рецептора готували в програмах «MGL Tools»  
та «AutoGrid».

Гнучкий докінг. Як мішень для докінгу ви-  
користовували каталітичну субодиницю комп-  
лексу протеїнкінази СК2 з інгібітором (код

PDB банку (3PE1)) [11]. З PDB файлу було видалено молекули води, йони і ліганд.

Було встановлено такі параметри докінгу: крок поступального руху становив 2 Å, кут кватерніону — 50°, торсійний кут — 50°. Ступінь торсійної свободи та коефіцієнт склали 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 — 850 000, максимальне число генерацій — 27 000, кількість структур, які переходять до наступної генерації, — 1, рівень генної мутації — 0,02, рівень кросоверу — 0,8, спосіб кросоверу — арифметичний.  $\alpha$ -Параметр розподілу Гауса становив 0,  $\beta$ -параметр розподілу Гауса — 1. Кількість ітерацій генетичного алгоритму-пошуку Ламарка склала 50 для кожного ліганду.

**Візуальний аналіз.** Візуальний аналіз взаємодії сполук з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 проводили в програмі «Discovery Studio Visualizer 4.0» [12].

#### **Біохімічні тести *in vitro***

**Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази СК2 людини.** Тестування сполук проводили за методикою, описаною С.Д. Hastie з колегами [13]. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав 3 мкл 10X буфера для СК2 (200 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 500 мМ КСl; 100 мМ MgCl<sub>2</sub>); 4 мкг синтетичного пептидного субстрату RRRDDDSDDD (New England Biolabs, Великобританія); 0,02 мкл (10 одиниць, 20 нг очищеного рекомбінантного білка протеїнкінази СК2 (гетеротетрамерний холоензим, продукований в *E. Coli*, #P6010L, New England Biolabs, Великобританія)); 13 мкл дистильованої води. Кінцеві молярні концентрації компонентів реакції для тестів із СК2: близько 150-175 мкМ пептидного субстрату та близько 20 нМ ензиму. Далі аліквоти реакційної суміші (19 мкл/пробу) поміщали в пробірки типу «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл і додавали по 1 мкл розчину інгібітора (розчиненого в ДМСО) потрібної концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали попередньо приготовану суміш, яка складалася з 10 мкл 150 мкМ АТФ та [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ у кількості, яка

відповідала кінцевій специфічній активності міченого АТФ 3000 mCi/tmol. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Після інкубації, що тривала 25 хв при 30 °С, реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5% розчину ортофосфорної кислоти. Отриману реакційну суміш наносили на 20 мм диск (18x18 мм) фосфоцелюлозного паперу (Whatman, р31, р81). Диски відмивали тричі з використанням 1% розчину ортофосфорної кислоти та просушували в термостаті при 45 °С. Рівень радіоактивного сигналу визначали в СРМ (count per minute) у сцинтиляційній рідині у флаконах, використовуючи сцинтиляційний лічильник «Tricarb 2800 TR» (PerkinElmer, США). Як негативний контроль замість розчину інгібітора додавали 1 мкл ДМСО (3,3 %). Відсоток інгібування СК2 визначали як відношення рівнів радіоактивного сигналу проби з інгібітором та контролю (середнє значення трьох проб із ДМСО).

**Визначення показника IC<sub>50</sub>.** Показник IC<sub>50</sub> інгібіторів визначали шляхом встановлення ступеня інгібування ензиму за різних концентрацій сполук, отриманих двократним розведенням у трьох повторах. Титрувальні криві будували в координатах СРМ (по осі ординат) і десятичного логарифма концентрації інгібітора (lg[I]) (по осі абсцис). Для точки, що є серединою кривої, знаходили значення осі ординат, для якого розраховували обернений логарифм, що дорівнює IC<sub>50</sub>.

**Результати й обговорення.** У попередньому дослідженні [7] нами за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу було ідентифіковано 98 похідних 2-хінолінону як перспективні інгібітори протеїнкінази СК2 [7]. Ці сполуки було вперше синтезовано й протестовано *in vitro*.

Для двох похідних 2-хінолінону, які продемонстрували найкращі інгібувальні властивості щодо СК2, було побудовано і досліджено комплекси з ензимом за допомогою молекулярного моделювання (рис. 1-2 [7]). Згодом ми встановили значення IC<sub>50</sub> для цих інгібіторів (рис. 1). Ґрунтуючись на ключових взаємодіях між досліджуваними лігандами й амінокислотними залишками активного сайту протеїнкінази, нами було запропоновано такі кроки хімічної оптимізації:

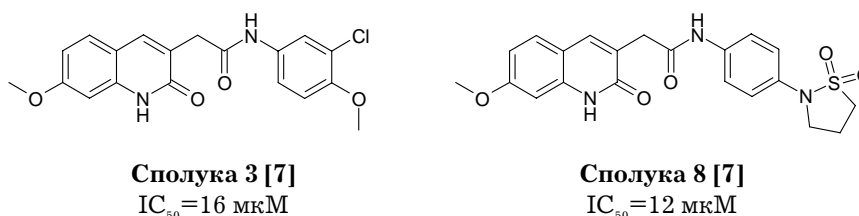


Рис. 1. Загальна хімічна структура і дані IC<sub>50</sub> для похідних 2-хінолінону, які продемонстрували найкращі інгібувальні властивості щодо СК2 [7].

1) синтезувати похідні хіноліну, які в 3-й позиції гетероциклу містять замісник -CO-NH-R замість -CH<sub>2</sub>-CO-NH-R, з метою зменшення довжини ліганду;

2) синтезувати похідні хіноліну, які містять метоксигрупу і гідрофобні замісники різного розміру в положеннях 6 та 7 хінолінового циклу з метою вивчення їх впливу на утворення водневих зв'язків із шарнірною ділянкою та гідрофобних контактів у гідрофобному регіоні I активного сайту СК2, відповідно;

3) синтезувати похідні, які у 2-му положенні хінолінового гетероциклу замість карбонільної групи містять аміногрупу; метою такої модифікації є дослідження впливу групи C=O на утворення водневого зв'язку інгібіторів з Lys68 АТФ-акцепторної кишені СК2;

4) синтезувати похідні, які б містили конденсований цикл у положеннях 1-2 і 1-8 хінолінового гетероциклу з метою вивчення його впливу на утворення гідрофобних контактів (у

тому числі π-π-стекинг із Phe113) у глибині активного сайту.

У результаті проведеної оптимізації було запропоновано структури 15 похідних 2-хінолінону, які синтезували та протестували *in vitro*. Результати біохімічних тестів представлено в табл. 1 і 2.

Як видно з представлених результатів, 12 з 15 одержаних похідних хінолінону пригнічують активність протеїнкінази СК2 у діапазоні 2,3-33 мкМ. Найбільшу активність мають сполуки з оксифенільним замісником у 6-й позиції хінолінового гетероциклу (сполуки **7a**, **13a** і **5b**). При цьому похідні 2-хінолініламіну виявилися більш активними, ніж хінолін-2-они, що видно на прикладі пар сполук **3a-10a** та **11a-6a**. Інгібітори **7a** і **13a** мають майже однакову активність.

Серед похідних хінолін-2-ону кращу інгібувальну активність продемонстрували сполуки з аліфатичним циклом, що видно на прикладі

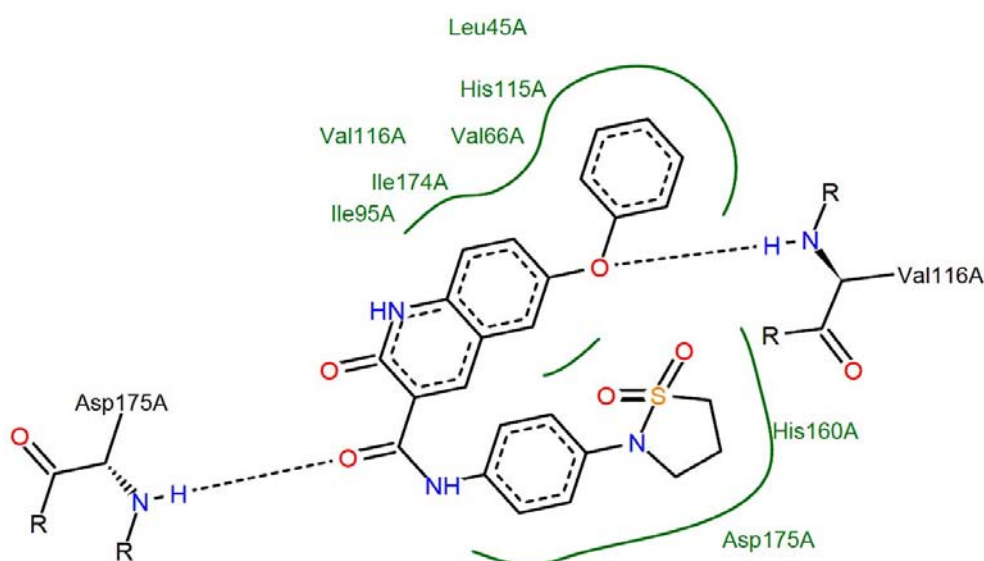
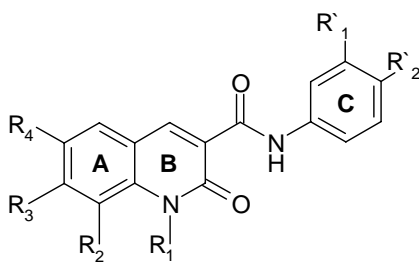


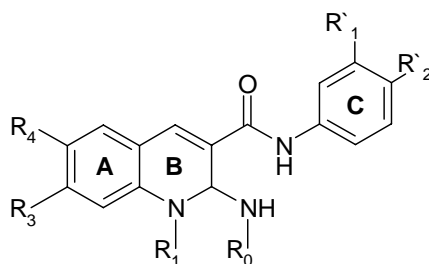
Рис. 2. Сполука **7a** в АТФ-зв'язувальному сайті СК2 (2D-модель комплексу: водневі зв'язки зображено пунктирною лінією, зеленим кольором позначено амінокислоти, з якими ліганд формує гідрофобні контакти).

Хімічні структури замісників похідних хінолін-2-ону і результати біохімічного тестування ( $IC_{50}$ , мкМ)

№	R1	R2	R3	R4	R1'	R2'	$IC_{50}$ , мкМ
3a	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H		21
4a	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H		4,05
5a	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H		7,9
6a	H	H	H	Br	H		н/а
7a	H	H	H	OPh	H		2,3
8a	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		H	H	H		н/а
9a	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		H	Br	H		7,4
3b	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	Cl	OCH <sub>3</sub>	7,8
4b	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		H	Br	Cl	OCH <sub>3</sub>	17,4

пари сполук **9a-6a**. Окрім замісника  $R1=R2=-(CH_2)_3-$ , значний вплив на активність інгібітора **9a** має атом Броду в 6-й позиції кільця A, оскільки його видалення, як у сполуки **8a**, призводить до інактивації останньої. А от заміна атома Броду в тому самому положенні в неактивній сполуки **6a** на метоксигрупу дала змогу отримати інгібітор **3a** з  $IC_{50}$  21 мкМ, а на метоксифенільний замісник — інгібітор **7a** з  $IC_{50}$  2,3 мкМ. Завдяки переміщенню метоксигрупи із 6-ї (сполука **3a**) у 7-му (сполука **4a**) позицію хінолінового гетероциклу вдалося

значно покращити активність останньої (з 21 до 4,05 мкМ, відповідно). Проте введення одразу двох метоксигруп не привело до синергетичного ефекту, і активність сполуки **5a** ( $IC_{50}=7,9$  мкМ) виявилася нижчою, ніж очікували. Похідні хінолін-2-ону з аліфатичним циклом та ізотіазолідин-1,1-діоксидиновим замісником у кільці C продемонстрували кращу активність, ніж 3-хлор-4-метокси заміщенням (наприклад сполуки **9a** і **4b**). Похідні хінолін-2-ону із 4-метокси заміщенням (сполуки **3a** та **3b**) мають протилежну залежність:

Хімічні структури замісників похідних 2-хінолініламіну і результати біохімічного тестування ( $IC_{50}$ , мкМ)

№	R0	R1	R3	R4	R1'	R2'	$IC_{50}$ , мкМ
10a	-N=N-		H	OCH <sub>3</sub>	H		н/а
11a	-N=N-		H	Br	H		5,2
12a	-N=N-		Br	H	H		9,3
13a	-N=N-		H	OPh	H		3,2
5b	-N=N-		H	OPh	Cl	OCH <sub>3</sub>	3,3
6b	H	H	H	OPh	Cl	OCH <sub>3</sub>	33

сполука з  $R1' = Cl$  та  $R2' = OCH_3$  є майже втричі активнішою.

При порівнянні хімічної структури похідних амідів 3-карбоксихіноліну видно, що найбільший вплив на їх інгібувальну активність має замісник R4. Цю залежність можна подати у такому вигляді:  $OCH_3 < Br < OPh$ . Зазначені замісники відповідають інгібіторам **10a** ( $IC_{50} =$  н/а), **11a** ( $IC_{50} = 5,2$  мкМ) і **13a** ( $IC_{50} = 3,2$  мкМ), відповідно. Зміна позиції атома Бром у з 6-ої на 7-му призводить до незначного погіршення показника  $IC_{50}$ , що видно на прикладі сполук **11a** ( $IC_{50} = 5,2$  мкМ) та **12a** ( $IC_{50} = 9,3$  мкМ). Заміна замісника ізотіазолідин-1,1-діоксиду в сполуки **13a** на 3-хлор-4-метокси заміщення також забезпечує гарну активність інгібітора **5b** ( $IC_{50} = 3,3$  мкМ), тоді як заміна -N=N- на NH<sub>2</sub> негативно впливає на активність сполук (сполуки **5b** і **6b**, відповідно).

За допомогою молекулярного моделювання було досліджено положення найактивнішого інгібітора **7a** в АТФ-зв'язувальній кишені

СК2. Встановлено, що цей ліганд є комплементарним до активного сайту та формує низку гідрофобних контактів з такими амінокислотними залишками: Leu45, Val66, Ile95, His115, Val116, His160, Ile174 та Asp175 (рис. 2). Одночасно сполука утворює два водневих зв'язки: один із шарнірною ділянкою між атомом Нітрогену амінокислотного залишку Val116 та атомом Оксигену метоксифенільного замісника R4 ліганду, інший — у глибині сайту зв'язування між атомом Нітрогену амінокислотного залишку Asp175 та атомом Оксигену карбонільної групи в 3-му положенні хінолінового гетероциклу інгібітора **7a**.

Отже, найбільш успішним кроком проведеної нами оптимізації було введення оксифенільного замісника в 6-ту позицію хінолінового гетероциклу, завдяки якому ліганди утворюють водневий зв'язок із шарнірною ділянкою активного сайту СК2 та низку гідрофобних контактів.

**Висновки.** Проведено успішну оптимізацію

похідних хіноліну. Досягнуто покращення інгібувальної активності сполук до 2,3 мкМ. Для найбільш активного інгібітора **7a** отримано модель зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом CK2. Показано, що ключовими взаємодія-

ми, які призводять до збільшення інгібувальної активності досліджуваних похідних амідів 3-карбоксихінололу, є гідрофобні контакти.

Надійшла в редакцію 20.07.2016 р.

### Chemical optimization of 3-carboxyquinoline amides as inhibitors of protein kinase CK2

O.V. Ostrynska, A.R. Syniugin, M.O. Chekanov, M.V. Protopopov, O.P. Kukharenko, S.M. Yarmoluk

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

**Summary.** This work is devoted to the chemical optimization of 2-quinolinone derivatives as promising inhibitors of protein kinase CK2. The structures of new compounds were proposed and 15 compounds were synthesized. The complex of the most active compounds (inhibitors **7a**,  $IC_{50}=2.3$  mM) with the ATP-acceptor site of CK2 was obtained and investigated by molecular modeling.

**Keywords:** CK2 inhibitors, 2-quinolinone, 3-carboxyquinoline amides.

### Перелік літератури

1. Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells / [G. Vilks, J.E. Weber, J.P. Turrowec et al.] // *Cell Signal.* — 2008. — Vol. 20, No. 11. — P. 1942-1951.
2. *Litchfield D.W.* Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death // *Biochem. J.* — 2003. — Vol. 369, No. 1. — P. 1-15.
3. *Pinna L.A.* Protein kinase CK2. — England: John Wiley & Sons, Inc, 2013. — 484 p.
4. Protein kinase CK2 signal in neoplasia / S. Tawfic, S. Yu, H. Wang [et al.] // *Histol. Histopathol.* — 2001. — Vol. 16, No. 2. — P. 573-582.
5. *Guo C., Yu S., Davis A.T., Wang H., Green J.E., Ahmed K.* A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells // *J. Biol. Chem.* — 2001. — 276. — P. 5992-5999.
6. *Guerra B.* Protein kinase CK2 in human diseases / B. Guerra, O. Issinger // *Curr. Med. Chem.* — 2008. — Vol. 15, No. 19. — P. 1870-1886.
7. Нові похідні 2-хінолінону: синтез і CK2-інгібіторна активність / [А.Р. Синюгін, М.О. Чеканов, О.Ю. Нипорко та ін.] // *Ukr. Bioorg. Acta.* — 2012. — № 1. — С. 51-60.
8. Design, synthesis and evaluation of 3-quinoline carboxylic acids as new inhibitors of protein kinase CK2 / [A.R. Syniugin, O.V. Ostrynska, M.O. Chekanov та ін.] // *J Enzyme Inhib Med Chem.* — 2016. — P. 1-10. DOI: 10.1080/14756366.2016.1222584.
9. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / [G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom та ін.] // *J. Computational Chemistry.* — 2009. — No. 16. — P. 2785-2791.
10. Pedretti A. VEGA — An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming / A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli // *J.C.A.M.D.* — 2004. — Vol. 18. — P. 167-173.
11. Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer / [R. Battistutta, G. Cozza, F. Pierre та ін.] // *Biochem.* — 2011. — Vol. 50, No. 39. — P. 8478-8488.
12. <http://accelrys.com/>
13. *Hastie C.J.* Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol / C.J. Hastie, H.J. McLauchlan, P. Cohen // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1, No. 2. — P. 968-971.