

Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 3-карбетокси-4-амінохіноліну

В. М. Сапелкін, А. Г. Голуб, О. Я. Яковенко, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Резюме. З метою пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну. *In vitro* тести 52 відібраних сполук дали змогу виявити серед них 6 активних з IC_{50} від 9 до 19 μ М. Найбільш активним інгібітором виявився 3,6-дикарбетокси-4-(4-ацетамідофеніламіно)хінолін **1.32** ($IC_{50} = 9 \mu$ М). На основі аналізу одержаних з допомогою докінгу комплексів сполук із СК2 запропоновано модель зв'язування похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну з цією протеїнкіназою та досліджено взаємозв'язок «структура—активність».

Ключові слова: інгібітори СК2, 4-аміно-3-карбетоксихіноліни, віртуальний скринінг.

Вступ. Протеїнкіназа СК2 належить до сімейства серин-треонінових протеїнкіназ і входить до складу майже всіх еукаріотичних клітин. Інгібуючий вплив СК2 на механізми контролю апоптозу, підвищена активність цієї протеїнкінази у тканинах та багатьох пухлинах, що швидко проліферують, дають змогу розглядати її як суттєвий фактор процесів росту пухлин [1–3]. Відомий також значний вплив СК2 на перебіг запальних процесів [4]. У зв'язку з цим ведеться пошук специфічних інгібіторів цієї протеїнкінази як серед вже відомих класів інгібіторів серин-треонінових кіназ, так і серед комбінаторних бібліотек хімічних речовин. Інгібітори СК2 знайдено серед похідних бензотріазолів [5], бензімідазолів [6], антрахінонів, хромонів [7], хіназолінів [8, 9] та заміщених сульфамідів. Метою нашої роботи було дослідження взаємодії похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну з СК2.

Матеріали та методи. Похідні 4-аміно-3-карбетоксихіноліну синтезували з відповідних анілінів

[10–11] (схема). Контроль за проходженням реакції і чистотою синтезованих сполук здійснювався хроматографічно на пластинках «Silufol UV-254», елюент — хлороформ-метанол (95:5). Структуру одержаних сполук було доведено за допомогою спектрів 1H -ЯМР, записаних у ДМСО- D_6 на приладі «Varian VXR-300» з робочою частотою 300 МГц і внутрішнім стандартом тетраметилсиланом.

Комп'ютерне моделювання проводилося з використанням наступних програм. Передбачення геометрії потенційних інгібіторів СК2 здійснювалося за допомогою авторської програми «Top-builder» та напівемпіричного розрахункового методу AM1 пакету квантово-механічних розрахунків «GAMESS» [12]. Оптимізація 3-D структури СК2 людини (www.pdb.org) проводилася у вакуумі за алгоритмом steepest descent силовим полем GROMOS FF, реалізованим у пакеті молекулярної динаміки «GROMACS» [13]. Часткові заряди атомів рецептора було обчислено за допомогою «AMBER FF». Для молекулярного докінгу та скорингу лігандів використовувався пакет «DOCK 4.0» [14]. Для біологічного тестування *in vitro* було відібрано сполуки з найвищими енергіями зв'язування із сайтом СК2.

Біологічне тестування відбувалося з використанням ^{32}P γ -АТР, СК2 людини (рекомбінан-

*Corresponding author.

Tel.: +38044-5222458; fax: +38044-5222458

E-mail address:

sergiy@yarmoluk.org.ua

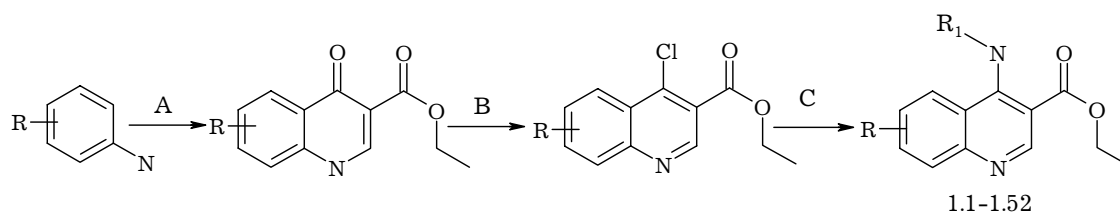


Схема. Синтез похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну: А — діетилетоксиметиленмалонат, нагрівання, В — $POCl_3$, С — R_1NH_2 , DMF .

тна, Biolabs). Як контроль використовували кверцетин. Радіоактивність виміряли сцинтиляційним лічильником (Rack Beta, Pharmacia).

Методика визначення ступеня інгібування СК2. До 30 μ l буферного розчину (20 mM Tris \cdot HCl, рН 7,5; 50 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$) додавали ^{32}P γ -АТР до отримання специфічної активності 100 μ Сi/ μ М, 10 одиниць СК2 та необхідну для одержання концентрації 30 μ М кількість тестованої речовини. Суміш витримували при температурі 30 °С протягом 20 хв., потім додавали 50 мл 10 %-ої H_3PO_4 , наносили на фосфатоцелюлозний фільтр і тричі промивали його 1 %-м розчином H_3PO_4 . Фільтр висушували на повітрі. Ступінь включення ^{32}P визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника без додавання сцинтилятора (за Черенковим), а ступінь інгібування СК2 — за співвідношенням включення ^{32}P до АТР при додаванні інгібітора та за його відсутності.

Методика одержання похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну. До розчину 10 ммоль відповідного 4-хлоро-3-карбетоксихіноліну у 5 мл ДМФА додавали 10,5 ммоль відповідного аміну та кип'ятили 5 хв., послідовно вводили 20 ммоль триетиламіну, 15—20 мл етанолу та воду до кристалізації. Осад, що випав, фільтрували, промивали етанолом та висушували. Вихід цільових сполук становив 50—98 %. Речовини, отримані у вигляді гідрохлоридів, одержували аналогічно, опускаючи обробку реакційної суміші триетиламіном та етанолом.

Результати та обговорення. Для пошуку нових інгібіторів СК2 серед похідних 4-аміно-3-карбетоксихінолінів використовувався рецептор-орієнтований віртуальний скринінг 1000 сполук даного класу. На основі порівняльної оцінки розрахованих програмою «DOCK» енергій взаємодії лігандів з АТФ-зв'язувальним сайтом кінази для подальшого синтезу та біологічного тестування було відібрано 52 сполуки (5 % вихідного сету). Структури похідних 4-аміно-3-

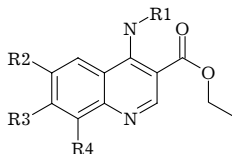
карбетоксихіноліну 1.1-1.52 і дані біологічних тестів *in vitro* (залишкова активність СК2 при концентрації сполук 33 μ М) наведено в таблиці.

Дані біологічного тестування свідчать, що 19 похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну (36,5 % тестованих) при концентрації 33 μ М пригнічують активність СК2 більш як на 50 % ($IC_{50} < 33 \mu$ М). IC_{50} найбільш активних сполук 1.14-1.16 та 1.32 визначали з допомогою додаткових тестів. Найбільш активним інгібітором виявився 3,6-дикарбетокси-4-(4-ацетамідофеніламіно)хінолін 1.32 ($IC_{50} = 9 \mu$ М).

Аналіз комплексів похідних 4-аміно-3-карбетоксихінолінів із СК2, отриманих методом молекулярного докінгу, показав, що ліганди знаходяться в глибині активного сайту кінази та мають подібний тип зв'язування. Стабілізація комплексів відбувається за рахунок гідрофобної взаємодії та водневих зв'язків між лігандом та СК2-кіназою. Основний внесок в енергію зв'язування ліганду з цією протеїнкіназою робить хінолінове ядро, яке має гідрофобні контакти з 7 амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту (Val53, Val66, Ile95, Phe113, Val116, Met163 та Ile174) (рис. 1). Найбільш важливими серед них є взаємодія з Phe113, а також із ключовими для СК2 залишками Ile174 та Val66, які відповідають за селективність зв'язування лігандів [15].

У ході дослідження також було виявлено, що утворення комплексу відбувається з формуванням двох водневих зв'язків між карбоксигрупою ліганду та залишками Asp175, Lys68. Атом кисню при подвійному зв'язку 3-карбетоксигрупи ліганду та атом азоту карбоксиамідного ланцюга Asp175 утворюють водневий зв'язок, у якому відстань між атомами становить 3,04 А. На відстані 3,51 А від атома кисню при одинарному зв'язку 3-карбетоксигрупи знаходиться атом азоту бічного радикала Lys68, тому слід очікувати, що в природних умовах існування комплексу між ними також утворюється водневий зв'язок.

Аналізуючи комплекси сполук з СК2, ми

Структури похідних 4-аміно-3-карбетоксихіноліну 1.1-1.52 і дані біологічного скринінгу (залишкова активність СК2 при концентрації сполук 33 μM)

| № | R1 | R2 | R3 | R4 | Активність СК2, % | IC ₅₀ , μM |
|-------|--------------------------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1.1 | 3-карбометоксифеніл | H | C ₄ H ₄ | | 38 | |
| 1.2 | 4-карбетоксифеніл | H | H | Cl | 50 | |
| 1.3 | 3-трифторометилфеніл | Cl | H | Me | 31 | |
| 1.4* | 3-карбоксифеніл | метил | H | Me | 57 | |
| 1.5 | 3,4-дихлорофеніл | карбометокси | H | H | 50 | |
| 1.6 | 4-іодофеніл | карбометокси | H | H | 64 | |
| 1.7 | 4-етоксифеніл | карбометокси | H | H | 55 | |
| 1.8 | 4-карбометоксифеніл | карбометокси | H | H | 65 | |
| 1.9* | 3-карбоксифеніл | карбометокси | H | H | 46 | |
| 1.10 | 3-хлоро-4-метилфеніл | карбометокси | H | H | 91 | |
| 1.11 | 4-метилфеніл | карбетокси | H | H | 34 | |
| 1.12 | 3,4-етилендіоксифеніл | карбетокси | H | H | 38 | |
| 1.13 | 4-(4-хлоробензилокси)феніл | карбетокси | H | H | 55 | |
| 1.14 | 3-карбетоксифеніл | карбетокси | H | H | 15 | 19 |
| 1.15 | 4-карбетоксифеніл | карбетокси | H | H | 16 | 17 |
| 1.16 | 3-бромо-4-метилфеніл | карбетокси | H | H | 20 | 19 |
| 1.17 | 4-карбетоксифеніл | Cl | H | H | 70 | |
| 1.18 | 3-карбоксифеніл | Cl | H | H | 103 | |
| 1.19 | 4-карбоксифеніл | Cl | H | H | 68 | |
| 1.20* | 4-карбоксифеніл | H | C ₄ H ₄ | | 80 | |
| 1.21 | 4-диметиламінофеніл | H | C ₄ H ₄ | | 73 | |
| 1.22* | 3-карбоксифеніл | H | H | OMe | 71 | |
| 1.23 | 4-карбоксифеніл | Br | H | H | 56 | |
| 1.24 | 4-ацетамідофеніл | Br | H | H | 62 | |
| 1.25 | 3-карбоксифеніл | Cl | H | Cl | 73 | |
| 1.26 | 4-карбоксифеніл | Cl | H | Cl | 134 | |
| 1.27 | 4-ацетилфеніл | Cl | H | Cl | 30 | |
| 1.28 | 4-ацетамідофеніл | Cl | H | Cl | 104 | |
| 1.29 | 4-циклогексилоксикарбоксифеніл | карбометокси | H | H | 82 | |
| 1.30 | 4-ацетилфеніл | карбометокси | H | H | 88 | |
| 1.31 | 4-ацетамідофеніл | карбометокси | H | H | 67 | |
| 1.32 | 4-ацетамідофеніл | карбетокси | H | H | 16 | 9 |
| 1.33 | 3-карбоксифеніл | H | C ₄ H ₄ | | 64 | |
| 1.34 | 6-метил-3-карбоксифеніл | H | C ₄ H ₄ | | 50 | |
| 1.35 | 4-карбоксифеніл | H | C ₄ H ₄ | | 52 | |
| 1.36 | 4-ацетамідофеніл | H | Cl | Cl | 77 | |
| 1.37 | 3-гідроксифеніл | H | Cl | Cl | 65 | |
| 1.38 | - | OMe | H | H | 44 | |
| 1.39 | 3-(піридилкарбоксі)пропанол-3 | карбетокси | H | H | 89 | |
| 1.40 | 4-(піридилкарбоксі)пропанол-3 | карбетокси | H | H | 91 | |
| 1.41 | 3-карбетоксифеніл | H | H | CF ₃ | 46 | |
| 1.42 | 4-карбетоксифеніл | H | H | CF ₃ | 30 | |
| 1.43 | 4-(2-піримідиламіносультфамойл)феніл | H | H | CF ₃ | 58 | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------|---|------------|---|----|----|---|
| 1.44 | 2-гідрокси-5-хлорофеніл | Cl | H | H | 72 | |
| 1.45 | 4-(2-піримідиламіносультфамойл)феніл | Cl | H | H | 46 | |
| 1.46 | 4-(4,6-диметил-2-піримідил-аміносультфамойл)феніл | Cl | H | H | 75 | |
| 1.47 | 4-(2-піримідиламіносультфамойл)феніл | Me | H | Me | 57 | |
| 1.48 | 2-гідрокси-5-хлорофеніл | карбетокси | H | H | 71 | |
| 1.49 | 4-(2-піримідиламіносультфамойл)феніл | Cl | H | H | 46 | |
| 1.50 | 3-дітиламіносультфамойл-6-метоксифеніл | Cl | H | H | 60 | |
| 1.51 | 4-ацетамідофеніл | F | H | H | 84 | |
| 1.52 | 4-феніламінофеніл | F | H | H | 67 | |

Примітка. * — речовини отримано у вигляді гідрохлоридів.

спробували пояснити вплив замісників на активність тестованих сполук. Замісники R2, R3 та R4 по-різному впливають на гальмівну активність 4-аміно-3-карбетоксихінолінів. Замісник R2 має найбільший вплив на активність сполук: вона найвища за умови, коли R2 = COOEt. Карбетоксигрупа має гідрофобні контакти з Leu45, Val66, Val116, Asn118 та Met163, заміна в ній етилу на метил призводить до втрати додаткових контактів з Leu45, Val116 та Asn118 і значно зменшує активність сполук.

Біологічні тести також показали, що на активність 4-аміно-3-карбетоксихінолінів значно впливає варіація замісника R1. Для пояснення впливу замісника ми порівняли комплекси активних сполук 1.14-1.16 та 1.32, одержані методом

молекулярного докінгу. У всіх комплексах замісник R1 має гідрофобні контакти з трьома амінокислотними залишками сайту Met163, Phe174 та Asp175. Значно більша активність сполуки 1.32 (R1 = 4-ацетамідофеніл), можливо, пояснюється тим, що навколо ацетамідної групи розташовані амінокислотні залишки, які можуть утворювати з нею водневі зв'язки (рис. 2). Це Asp175 (відстань N-O = 3.91 Å), Asn161 (відстань N-O = 4.3 Å) та His160 (відстань O-N = 4.7 Å).

Досить висока комплементарність хінолінового ядра до АТФ-зв'язувального сайту та утворення 3-карбетоксигрупою двох водневих зв'язків у цілому характеризують взаємодію похідних 4-аміно-3-карбетоксихінолінів із СК2 і вказують на перспективність хімічної оптимізації даного класу

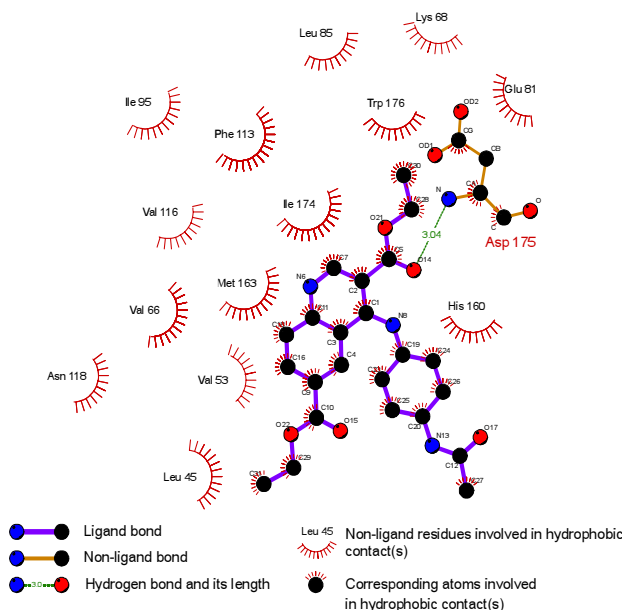


Рис. 1. Схематична діаграма взаємодії сполуки 1.32 з СК2. Діаграму виконано з допомогою програми «LigPlot» [16].

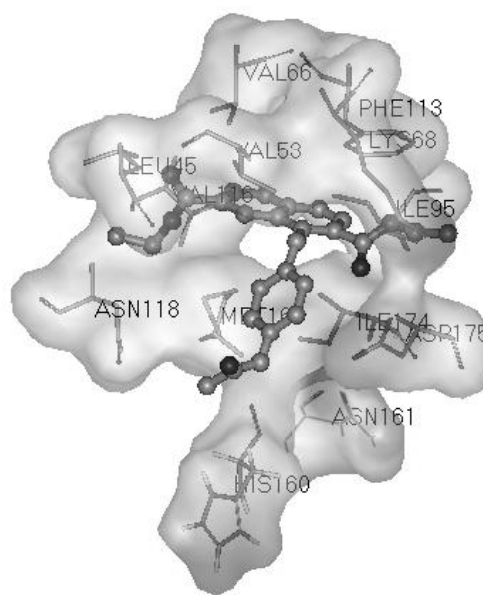


Рис. 2. Сполука 1.32 в АТФ-зв'язувальному сайті СК2. Модель комплексу отримана методом молекулярного докінгу.

сполук. Спираючись на дані біологічних тестів та отриману модель взаємодії, можна припустити, що найбільш суттєвою для біологічної активності буде варіація радикала в положенні R1. Цим можна досягти утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками Met163, His160, що дасть змогу одержати ряд більш активних сполук.

Висновки. З метою пошуку інгібіторів СК2 людини проведено рецептор-орієнтований віртуальний скринінг 1050 похідних 4-аміно-3-карбетоксхіноліну. Для синтезу та біологічного тестуван-

ня було відібрано 52 сполуки. Установлено, що 19 із них (36,5 %) при концентрації 33 μM інгібують активність СК2 більш ніж на 50 % ($\text{IC}_{50} < 33 \mu\text{M}$). Найвищий рівень активності мав 3,6-дикарбетокси-4-(4-ацетамідофеніламіно)хінолін 1.32 ($\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{M}$). Аналіз комплексу сполуки 1.32 з СК2, отриманого методом молекулярного докінгу, дав змогу передбачити тип зв'язування похідних 4-аміно-3-карбетоксхіноліну з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 та пояснити вплив замісників на активність тестованих сполук.

Search for protein kinase CK2 inhibitors among 3-carboxy-4-aminoquinoline derivatives

V. M. Sapelkin, A. G. Golub, O. Ya. Yakovenko, V. G. Bdzholo, S. M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv-143, 03143, Ukraine

Abstract. 52 compounds from combinatorial library of 4-amino-3-carbethoxy-quinoline derivatives have been chosen using receptor-based virtual screening technology for studying their CK2 inhibition activity. It has been shown that 6 substances inhibit CK2 activity by more than 70 %. IC_{50} of these compounds ranged from 9 to 19 μM . The most potent inhibitor, 1.32 (3,6-dicarbethoxy-4-(4-acetamidophenylamino)quinoline, has IC_{50} 9 μM . Model of binding of 4-amino-3-carbethoxy-quinoline derivatives to ATP-site of CK2 and structure-activity relationship are also proposed.

Key words: CK2 inhibitors, 4-amino-3-carbethoxy-quinoline derivatives, receptor based virtual screening.

Перелік літератури

1. Guo C., Yu S., Wang H., Davis A.T., 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. — Vol. 276. — P. 5992—5999.
2. Ruzzene M., Penzo D., Pinna L.A. Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabrombenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein1 (HS1) in Jurkat cells // *Biochem. J.* — 2002. — Vol. 364. — P. 41—47.
3. Guerra B., Issinger O.-G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology // *Electrophoresis.* — 1999. — Vol. 20. — P. 391—408.
4. Szyszka R., Boguszevska A., Shugar D., Grankowski N. Halogenated benzimidazole inhibitors of phosphorylation, in vitro and in vivo? Of the surface acidic proteins of the yeast ribosomal 60 S subunit by endogenous protein kinases CK-II and PK 60 S // *Acta Biochim. Pol.* — 1996. — Vol. 43, No 2. — P. 389—396.
5. PCT Int.Appl.WO 96 01,833(Cl.C07H19/052). Preparation of benzimidazole-containing nucleoside analogs as virucides Chamberlain S.D., Koszalka G.W. (Wellcome Foundation Limited, Uk), 25 Jan 1996, GB Appl. 94/13,724, 7 Jul 1994; 67 pp.
6. Sarno S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistutta R., Zanotti G., Pinna L. Towards the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors // *Pharmacol. Ther.* — 2002. — Vol. 93, No 2—3. — P. 159.
7. Vangrevelinghe E., Zimmermann K., Schoepfer J., Portmann R., Fabbro D., Furet P. Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking // *J. Med. Chem.* — 2003. — Vol. 46, No 13. — P. 2656—2662.
8. LIU Xin-Guang, LIANG Nian-Ci. Inhibitory effect and its kinetic analysis of tyrphostin AG 1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2002. — Vol. 23, No 6. — P. 556—561.
9. Сапелкін В.М., Голуб А.Г., Яковенко О.Я., Бджола В.Г., Ярмолук С.М. Пошук інгібіторів кazeїнкінази серед похідних 4-амінохіназоліну // *Ukr. Bioorg. Acta.* — 2004. — Т. 1, №№ 1—2. — С. 74—79.
10. Синтезы органических препаратов // *Сборник 4.* — М., 1953. — С. 240—242.
11. Amarego W.L.F. Preparation of phthalazine and quinazoline // *J. Appl. Chem.* — 1961. — No 11. — P. 70—72.
12. Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L. The general atomic and molecular electronic structure system // *J. Comp. Chem.* — 1993. — Vol. 14. — P. 1347—1358.
13. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. GRO-MACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis // *J. Mol. Mod.* — 2001. — Vol. 7. — P. 306—317.
14. Ewing T.J.A., Kuntz I.D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening // *J. of Computational Chem.* — 1996. — Vol. 18, No 9. — P. 1175—1189.
15. Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L.A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetrabromo-benzotriazole // *Protein Sci.* — 2001. — Vol. 10. — P. 2200—2206.
16. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. LIG-PLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions // *Prot. Eng.* — 1995. — Vol. 8. — P. 127—134.