

## Пошук специфічних інгібіторів протеїнкази СК2 і вазоактивних сполук серед похідних 5-аміно-1,3-оксазолів

О.В. Шабликін<sup>1\*</sup>, О.П. Кухаренко<sup>2</sup>, І.Н. Яковенко<sup>1</sup>,  
С.М. Ярмолук<sup>2</sup>, В.С. Броварець<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
вул. Мурманська, 1, Київ, 02660, Україна

<sup>2</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

**Резюме.** У процесі взаємодії 2-ациламіно-3,3-дихлороакрилонітрилів з амінокислотами — гліцином, β-аланіном, γ-аміномасляною кислотою та орнітином — отримано нові похідні 5-амінооксазолу. Біологічну активність нових сполук протестовано на моделі ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів (за впливом на тонус судин) і в біохімічних тестах активності ряду протеїнказ людини. Деякі сполуки виявили вазодилатуючі властивості поряд з інгибуванням активності протеїнкази СК2. Обговорюється можливий внутрішньоклітинний механізм дії досліджуваних сполук на тонус кровоносних судин ссавців, що зумовлені їх впливом на протеїнказу СК2 судинних міоцитів.

**Ключові слова:** амінокислота, 5-аміно-1,3-оксазоли, кровоносні судини, вазодилататори, протеїнказа СК2.

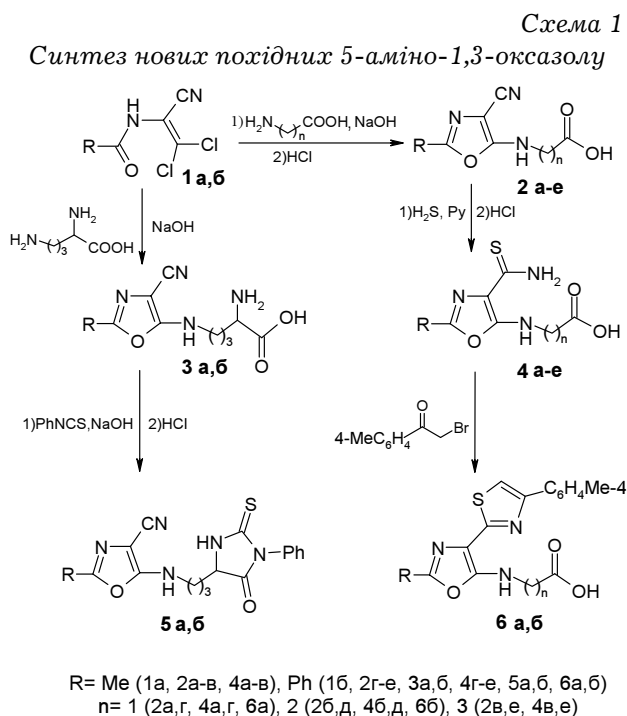
**Вступ.** Вивчення біологічної активності нових хімічних сполук задля оцінки можливостей подальшого їх застосування в медичній практиці є одним із напрямів сучасної фармакології. Метою нашого дослідження було вивчення впливу нещодавно синтезованих нами нових похідних 5-амінооксазолів на активність СК2 та ряду інших протеїнказ людини, а також на тонус ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів. Вибір цього класу сполук пов'язаний із тим, що за останні роки з природних об'єктів виділено велику кількість біоактивних оксазоловмісних речовин [1, 2]. До того ж, зараз уже відома велика кількість синтетичних біорегуляторів оксазольної природи,

які виявляють високу антимікробну, цитостатичну, нейролептичну, протизапальну, анальгетичну й антидіабетичну активність [3–5]. Серед них значну частку займають заміщені 5-амінооксазоли, для яких на сьогодні відома ціла низка методів синтезу, що дає змогу отримувати різноманітні похідні оксазолу з фармакофорними групами.

**Хімічна частина.** Відомо, що для синтезу похідних 5-аміноалкілоксазолу застосовують конденсацію дихлороакрилонітрилів **1** з аліфатичними амінами [6], але використання в цій реакції амінокислот як амінів викликає певні труднощі. Як правило, такі синтези проводяться в апротонних розчинниках, в яких амінокислоти та їх солі не розчинні. Тому нами запропоновано проводити конденсацію акрилонітрилів **1** з амінокислотами у водно-спиртовому середовищі. Нам вдалося ввести в положення 5 оксазольного фрагмента залишки

\* Corresponding author.  
Tel./fax: +38044-5732561  
E-mail address: shablykin@gmail.com

© О.В. Шабликін, О.П. Кухаренко, І.Н. Яковенко,  
С.М. Ярмолук, В.С. Броварець, 2008



гліцину,  $\beta$ -аланіну,  $\gamma$ -аміномасляної кислоти й орнітину. Отримані N-заміщені амінокислоти **2** та **3** за рахунок наявності реакційноздатних функціональних груп було введено у відомі реакції гетероциклізації. Будову всіх сполук, поданих на схемі 1, підтверджено комплексними спектральними й хімічними дослідженнями. Так, в ІЧ-спектрах сполук **2**, **3** та **5** присутня інтенсивна смуга в області 2200–2220  $\text{cm}^{-1}$ , яка відсутня у сполуках **4** та **6**, що вказує на участь нітрильної групи в цих реакціях. До того ж, перетворення **3**→**5** і **4**→**6** — поодинокі випадки добре відомих циклізацій, які вивчені раніше на багатьох інших прикладах. Це значно полегшило ідентифікацію ряду заміщених оксазолів **5** та **6** (схема 1).

**Результати й обговорення.** Тестування синтезованих сполук за впливом на тонус ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів виявило вазодилатуючу активність сполук **2д**, **2е**, **3а**, **4д**, **4е** та **5а** за їх дією на попередньо скорочені фенілефрином судини (табл. 1). Найбільшу активність виявляла сполука **4е**. За порівняно низької концентрації (10  $\mu\text{M}$ ) вона достовірно зменшувала тонус судин до  $80,7 \pm 1,6$  % від рівня базового скорочення фенілефрином (контроль). За концентрації 50 і 100  $\mu\text{M}$  сполука **4е** знижувала судинний тонус відповідно на  $70,1 \pm 1,8$  і  $58,1 \pm 2,9$  %

порівняно з контролем. Інші сполуки виявляли суттєву активність в концентраціях вище 10  $\mu\text{M}$  (табл. 1). Дія всіх активних сполук була оборотною, за винятком сполуки **5а**. Тобто після відмивання ізольованих сегментів артерій від досліджуваної речовини судинний тонус відновлювався до вихідних значень (на фоні дії постійної концентрації фенілефрину). Відмивання судин від сполуки **5а** вела до часткового відновлення судинного тону, що може пов'язуватися зі значною гідрофобністю цієї сполуки.

Тестування впливу сполук на активність протеїнкіназ проводилося шляхом кінзних реакцій *in vitro* з рекомбінантною СК2 людини. Активність протеїнкіназ у присутності синтетичних сполук визначалася двома методами — прямою детекцією продукту кінзної реакції за допомогою радіоактивної мітки  $^{32}\text{P}$  АТФ, а також методом непрямой детекції із застосуванням люциферазної реакції для визначення залишкової концентрації АТФ у реакційній суміші [7, 8].

За результатами тестувань сполуки **4д** і **4е** специфічно пригнічували протеїнкіназу СК2 людини *in vitro* (табл. 2, рис. 1), достовірно не впливаючи при цьому на активність деяких інших протеїнкіназ людини. Було перевірено вплив сполук на протеїнкінази людини — Ask1, Jnk3, Rock1, Lck. Жодна з тестованих сполук, включаючи **4д** і **4е**, не впливала на активність цих ферментів. Отже, для всього синтезованого ряду сполук виявлено специфічну активність лише проти кінзи СК2.

Отримані нами дані свідчать про те, що виявлені вазодилатуючі властивості ряду нових сполук можуть обумовлюватися їх дією на протеїнкіназу СК2 кролика. На сьогодні не знайдено жодного специфічного інгібітора СК2 кролика, але існує досить багато високоспецифічних інгібіторів СК2 людини. Кінза СК2 ссавців має надзвичайно консервативну амінокислотну послідовність, отже, структура каталітичного домену ферменту кроликів може бути досить близькою до такої в структурі людського білка. Тому можна припустити, що сполуки — інгібітори СК2 людини — також будуть пригнічувати активність СК2 кроликів. Для підтвердження цього припущення нами додатково вивчено вплив уже описаних в літе-

Вплив нових сполук на тонус попередньо скорочених фенілефрином (10 мкМ) ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів

Сполука	Формула	Процент від скорочення, викликаного фенілефрином (10 мкМ)		
		Концентрація		
		100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
2а		97,3±1,8	100±0	100±0
2б		100±0	100±0	100±0
2в		100±0	100±0	100±0
2г		100±0	100±0	100±0
2д		68,0±4,0*	75,3±2,2*	100±0
2е		65,1±7,0*	75,4±2,1*	100±0
3а		77,6±3,1*	89,2±2,0*	100±0
4а		100±0	100±0	100±0
4в		98,0±1,0	100±0	100±0
4г		100±0	100±0	100±0
4д		74,4±9,2*	90,3±1,4*	100±0
4е		58,1±2,9*	70,1±1,8*	80,7±1,6*
5а		70,4±2,9*	75,1±1,8*	100±0

Примітки. Показники ( $M \pm t$ ;  $n=3$ ) розраховано як процент від прийнятого за 100 % скорочення, викликаного фенілефрином (10 мкМ). \* — значення достовірно відрізняються від контролю ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2

Вплив нових сполук на активність протеїнкінази СК2 (активність кінази визначалася методом з люциферазою)

Сполука	Відносний рівень люмінесценції за концентрації сполук 25 мкМ	Показник відносної зміни активності кінази, %
DMSO*	111772	100
2a	77386	144
2б	82952	135
2в	86485	129
2г	106678	105
2д	109060	102
2е	110243	101
3a	94266	119
3б	79386	141
4a	79097	141
4б	110825	101
4в	113388	99
4г	93327	120
4д	192455	58
4е	167740	67
5a	113083	99
5б	67956	164
6a	87467	128
6б	111379	100

Примітка: \* — диметилсульфоксид використано як негативний контроль.

ратурі специфічних інгібіторів СК2 людини (сполуки 7-9, табл. 3 [9, 10]) на тонус артерій кроликів. З'ясувалося, що серед цих інгібіторів сполуки 8 і 9 також викликали суттєву вазорелаксацію судин і лише сполука 7 не впливала на судинний тонус.

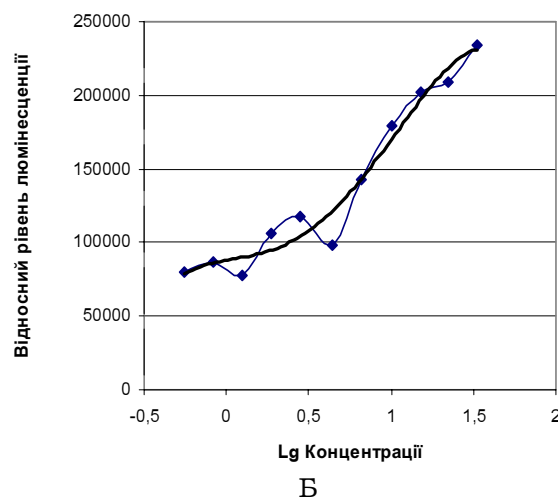
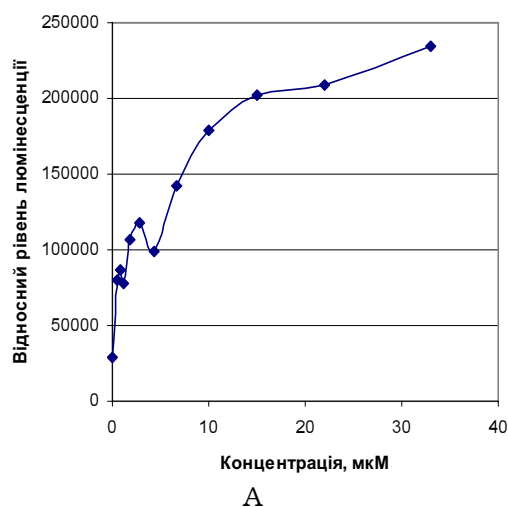
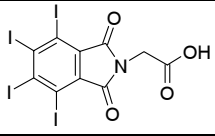
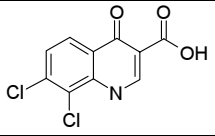
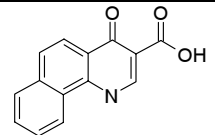


Рис. 1. Залежність відносного рівня люмінесценції від концентрації сполуки 4е в реакційній суміші з СК2 після кіназної реакції: А — у звичайних координатах; Б — у логарифмічних координатах. Визначене з графіка  $IC_{50}$  складає  $\lg 0,95 = 8,9$  мкМ (0,95 — значення концентрації сполуки в центрі сигмоїдальної кривої в логарифмічних координатах).

Отримані нами дані *in vitro* та *in vivo* (на ізольованих сегментах судин) свідчать, що вазорелаксація, викликана досліджуваними сполуками, може зумовлюватися інгібуванням протеїнкінази СК2. Деякі розбіжності в значеннях інгібіторної активності сполук на протеїнкіназу СК2 людини *in vitro* та на величину вазорелаксації каротидних артерій кроликів, ймовірно, обумовлені видовими відмінностями молекулярних структур цього ферменту, що може бути предметом додаткових досліджень.

**Можливий механізм дії сполук.** Відомо, що скорочення судин під дією агоністів  $\alpha_1$ -адренорецепторів відбувається внаслідок активації  $Ca^{2+}$ -мобілізуючої поліфосфоінозитидної (ПФІ) системи внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції [11]. Початковий (трансмембранний) етап цього сигнального каскаду опосередкований гуанін-нуклеотид-зв'язувальними білками (G-білками), які передають активуючий фосфоліпазу С (ФЛ-С) сигнал від  $\alpha_1$ -адренорецептора. У результаті цього ФЛ-С починає гідролізувати фосфоліпід клітинної мембрани фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ2) з утворенням двох продуктів — інозитол-1,4,5-трифосфату (ІФ3) та 1,2-діацилгліцеролу (ДАГ). ІФ3 дифундує через цитоплазму і взаємодіє з ІФ3-рецепторами, що локалізовані на ендоплазматичному ретикулумі, викликаючи вивільнення кальцію. Одночасно з цим ДАГ активує різні ізоформи протеїнкінази С (ПК-С).

Дія інгібіторів СК2 людини на тонус ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів

Сполука	Формула	Процент від скорочення, викликаного фенілефрином (10 мкМ)		
		Концентрація		
		100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
7		95,4±2,8	100±0	100±0
8		26,7±2,8*	56,1±2,8*	100±0
9		69,1±3,4*	72,7±2,3*	90,5±1,2*

Результатом цих процесів є мобілізація внутрішньоклітинного кальцію та скорочення гладеньком'язових міоцитів судин. Хоча в літературі наведено деякі дані про участь СК2 в регуляції тонусу непосмугованих м'язів клітин дихальних шляхів щура [12], на сьогодні ми не знайшли відомостей про дослідження, які б безпосередньо доводили вплив специфічних інгібіторів СК2 на тонус кровоносних судин ссавців. З огляду на загальновідомі дані про універсальність шляхів сигнальної трансдукції можна припустити, що вазорелаксація під час інгібування СК2 може реалізовуватись опосередковано через зміну активності фосфатази РТЕН (англ. *phosphatase and tensin homolog*). Загальновідомо, що ця фосфатаза дефосфорилує внутрішньоклітинний фосфатидилінозитол 3,4,5-трифосфат (ФІФ3), який синтезується фосфатидилінозитол 3-кіназою (ФІ3-К) шляхом фосфорилування того ж мембранного фосфоліпіда ФІФ2.

Показано, що інгібітори ФІ3-К викликають релаксацію ізольованих і попередньо скорочених гладеньких м'язів товстої та дванадцятипалої кишок, аорти щура [13-16]. Такі вазорелаксуючі ефекти інгібіторів ФІ3-К можуть бути обумовлені регуляторною роллю ФІФ3 у продукції ІФ3 за участі ФЛ-С у гладеньком'язових клітинах різних типів [17]. В літературі описано молекулярні механізми такої регуляції шляхом прямої активації однієї з ізоформ ФЛ-С ПФІ-каскаду (ФЛ-С гамма,

ФЛ-С $\gamma$ ) у процесі зв'язування ФІФ3 із РН- або SH2-доменом ферменту [18, 19] та опосередкованої через активацію тирозинкінази Брутона (Btk-кінази) [20].

На ендотеліоцитах аорти бика показано фосфорилування РТЕН протеїнкіназою СК2, яке веде до інактивації останньої [21]. Отже, блокування в клітинах СК2 має привести до активації РТЕН, у результаті чого рівень ФІФ3 зменшиться, що знизить активність ФЛ-С $\gamma$  і продукції ІФ3 і ДАГ. Кінцевим ефектом цих ланцюгових реакцій буде зменшення тонусу судин, особливо на фоні стимуляції  $\alpha_1$ -адренорецепторів фенілефрином.

Ми також дослідили вплив сполуки **4e** на ізольовані каротидні артерії кроликів в інших умовах — за їх попереднього скорочення шляхом підвищення зовнішньої концентрації іонів  $K^+$  (т.зв.  $K^+$ -контрактура) [22]. За такої стимуляції скорочення судин відбувається не за рахунок активації ПФІ-каскаду, як за фенілефринової стимуляції, а шляхом активації потенціал-чутливих  $Ca^{2+}$ -каналів міоцитів, що є результатом  $K^+$ -деполяризації їх біомембран. Отримані в цьому експерименті дані також свідчать на користь зазначеного вище механізму дії за участі РТЕН, оскільки в цьому разі сполука **4e** майже не впливає на тонус судин, попередньо активованих підвищенням концентрації  $K^+$  в омиваючому судини розчині Кребса (табл. 4). Незначні вазодилатуючі ефекти сполуки **4e** на судини, скорочені шля-

Таблиця 4

Вплив сполуки **4e** на тонус попередньо скорочених гіперкалієвим (30 мМ) розчином Кребса ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів за додаткової стимуляції скорочення судин фенілефрином (10 мкМ) (А) та без неї (Б)

Умови досліджу	Процент від рівня скорочення на зазначену стимуляцію		
	Концентрація ( <b>4e</b> )		
	100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
А	60,2±3,9*	70,4±2,4*	82,1±1,9*
Б	84,3±1,7*	100±0	100±0

Примітки. Показники ( $M \pm t$ ;  $n=3$ ) розраховано як процент від контрольного скорочення, прийнятого за 100 %. \* — значення достовірно відрізняються від контролю ( $p < 0,05$ ).

хом однієї  $K^+$ -контрактури (табл. 4), можуть зумовлюватися незначною базовою активністю ПФІ-каскаду в цих судинах. Вазорелаксаторні властивості сполуки **4e** суттєво відновлювалися після додаткового скорочення судин фенілефрином на фоні  $K^+$ -контрактури. Отримані нами дані свідчать про те, що вплив сполуки **4e** на тонус судин опосередкований дією цієї сполуки на ПФІ  $Ca^{2+}$ -мобілізуючу систему внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції.

**Висновки.** Серед синтезованих нами нових речовин сполуки **4d** та **4e** ідентифіковані як специфічні інгібітори протеїнкінази СК2 людини. Вони також викликають релаксацію попередньо скорочених фенілефрином каротидних артерій кроликів. Найбільшу вазодилатуючу активність серед досліджуваних речовин виявила N-(4-тіокарбамоїл-2-феніл-1,3-оксазол-5-іл)- $\gamma$ -аміномасляна кислота **4e** в діапазоні концентрацій 10–100 мкМ. За попереднього скорочення судин шляхом  $K^+$ -контрактури сполука **4e** суттєво не впливала на тонус судин і відновлювала свої вазодилатуючі властивості в судинах, додатково скорочених фенілефрином (на фоні  $K^+$ -контрактури). Оскільки агоніст  $\alpha_1$ -адренорецепторів фенілефрин викликає скорочення судин через ПФІ  $Ca^{2+}$ -мобілізуючий каскад сигнальної трансдукції, а  $K^+$ -контрактура — через активацію потенціалчутливих  $Ca^{2+}$ -каналів, вазодилатуючі властивості сполуки **4e** можуть бути опосередковані функціональним антагонізмом із ПФІ  $Ca^{2+}$ -мобілізуючим каскадом сигнальної трансдукції,

активність якого знижується у процесі інгібування протеїнкінази СК2.

**Експериментальна частина. Біологічна частина.** Вплив сполук на активність протеїнкіназ досліджували методом АТР consumption із люциферазою та класичним методом прямої детекції продуктів кіназної реакції з радіоактивним субстратом р32 АТФ [7, 8]. Вазоактивні властивості синтезованих нами нових похідних 5-аміно-1,3-оксазолу досліджували на каротидних артеріях кроликів, як описано раніше [23]. Кільцеві сегменти каротидних артерій кроликів діаметром 2,5 мм і довжиною 2 мм фіксували ізометрично в камері з фізіологічним розчином Кребса між сталевим стаціонарним гачком та ізометричним перетворювачем, з'єднаним із самописцем (TZ 213S Laboratorni pristroje, Чехія).

У подальшому експериментальну камеру із судинами за допомогою перистальтичного насосу перфузували за 37 °С фізіологічним розчином Кребса, який містив (у мМ): NaCl — 133; KCl — 4,7;  $CaCl_2$  — 2,5;  $MgCl_2$  — 1,2;  $NaHCO_3$  — 10;  $NaH_2PO_4$  — 1,38; глюкозу — 7,8; hepes — 10 (рН 7,4). Оскільки тонус судин *in vivo* регулюється нейроендокринною системою та в ізольованих сегментах судин, його базальний рівень наближається до нульового значення, ізольовані сегменти судин попередньо скорочували агоністом  $\alpha_1$ -адренорецепторів фенілефрином. У серії експериментів сегменти судин також скорочували шляхом  $K^+$ -деполяризації біомембран гладеньком'язових міоцитів, для чого в омиваючому ізольовані судини розчині Кребса збільшували концентрацію  $K^+$  до 30 мМ, додаючи відповідну кількість KCl, як описано в літературі [22].

Досліджувані сполуки вносили в розчин Кребса, який перфузує судинний сегмент. Після досягнення максимальної зміни судинного тону під дією досліджуваної речовини та стабілізації цієї зміни на рівні плато ізольований сегмент відмивали від сполуки розчином Кребса. Відмивання вело до відновлення вихідного рівня судинного тону.

**Хімічна частина.** ІЧ-спектри речовин записували на спектрометрі «Specord M-80» у КВр. Спектри ЯМР  $^1H$  отримували на приладі «VXR-300» (300 МГц) у  $DMCO-d_6$ , внутрішній стандарт — ТМС. Хід реакцій і чистоту синте-

зованих сполук контролювали методом ТШХ на пластинках «Merck 60 F<sub>254</sub>».

**Синтез N-заміщених амінокислот 2а-е.** До 20 мл 50%-го водно-етанольного розчину 0,033 моля гідроксиду натрію додавали 0,033 моля відповідної амінокислоти та 0,01 моля дихлороакрилонітрилу 1. Реакційну суміш перемішували 24 год за 20-25 °С, розчинник видаляли у вакуумі до половини об'єму, підкислювали соляною кислотою до рН~4-5, осад відфільтровували, сполуки **2а-е** очищали переосадженням соляною кислотою з водного розчину гідроксиду натрію.

*N*-(2-Метил-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)гліцин (**2а**). Вихід 45 %.  $T_{\text{пл}}$  167-168 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2220 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 3,91 (д., 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6,1$  Hz), 8,20 (т, 1H, NH,  $J=6,1$  Hz), 12,67 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 23,13.  $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 23,20.

*N*-(2-Метил-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланін (**2б**). Вихід 70 %.  $T_{\text{пл}}$  136-137 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2210 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,51 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,43 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,95 (ш.т, 1H, NH), 12,19 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 21,42.  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 21,53.

*N*-(2-Метил-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)- $\gamma$ -аміномасляна кислота (**2в**). Вихід 75 %.  $T_{\text{пл}}$  109-110 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2210 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,78 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,24 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,75 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,93 (т, 1H, NH), 11,98 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 20,01.  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 20,09.

*N*-(2-Феніл-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)гліцин (**2г**). Вихід 55 %.  $T_{\text{пл}}$  184-185 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2220 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 4,07 (д, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6,0$  Hz), 7,40-7,95 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,65 (т, 1H, NH,  $J=6,0$  Hz), 12,93 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 17,18.  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 17,28.

*N*-(2-Феніл-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланін (**2д**). Вихід 78 %.  $T_{\text{пл}}$  166-167 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2215 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,56 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,55 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,45-7,90 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,65 (ш.т, 1H, NH), 12,29 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 16,36.  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 16,33.

*N*-(2-Феніл-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)- $\gamma$ -аміномасляна кислота (**2е**). Вихід 83 %.  $T_{\text{пл}}$  118-119 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2220 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,85 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,33 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,39 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,40-7,85 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,37 (т, 1H, NH,  $J=6,3$  Hz), 12,03 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 15,53.  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 15,49.

**Синтез N-заміщених орнітинів 3а,б.** До 20 мл 50%-го водно-етанольного розчину 0,03 моля гідроксиду натрію додавали 0,01 моля гідрохлориду орнітину та 0,01 моля дихлороакрилонітрилу 1. Реакційну суміш перемішували за 20-25 °С 48 год, осад відфільтровували, промивали водою, сполуки **3а,б** очищали кристалізацією з водного етанолу.

*N*5-(2-Феніл-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)орнітин (**3а**). Вихід 67 %.  $T_{\text{пл}}$  260-261 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2210 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,57-1,95 (м, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 3,27 (м, 1H, CH), 3,35 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,45-7,90 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), NH (в обміні). Знайдено, %: N 18,53.  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 18,66.

*N*5-(2-(4-Толуїл)-4-ціано-1,3-оксазол-5-іл)орнітин (**3б**). Вихід 55 %.  $T_{\text{пл}}$  255-256 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2215 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,50-2,01 (м, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 2,34 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,24 (м, 1H, CH), 3,36 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,92 (м, 1H, CH), 7,45-7,90 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), NH (в обміні). Знайдено, %: N 17,88.  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ . Обчислено, %: N 17,82.

**Синтез N-заміщених амінокислот 4а-е.** У розчин 0,01 моля сполук **2а-е** в 20 мл піридину пропускали сірководень до насичення, реакційну суміш залишали на 24 год при 20-25 °С, упарювали у вакуумі, підкислювали соляною кислотою до рН~6. Осад відфільтровували, сполуки **4а-е** очищали переосадженням соляною кислотою з водного розчину гідроксиду натрію.

*N*-(2-Метил-4-тіокарбамойл-1,3-оксазол-5-іл)гліцин (**4а**). Вихід 19 %.  $T_{\text{пл}}$  242-243 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 4,11 (д., 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6,1$  Hz), 8,25 (с, 1H, NH), 8,53 (с, 1H, NH), 8,66 (т, 1H, NH,  $J=6,1$  Hz), 12,94 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 19,45; S 14,86.  $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 19,52; S 14,90.

*N*-(2-Метил-4-тіокарбамойл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланін (**4б**). Вихід 15 %.  $T_{\text{пл}}$  216-217 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,45 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,46 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8,15 (с, 1H, NH), 8,43 (с, 1H, NH), 8,57 (ш.т, 1H, NH), 12,10 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 18,37; S 14,05.  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 18,33; S 13,99.

*N*-(2-Метил-4-тіокарбамойл-1,3-оксазол-5-іл)- $\gamma$ -аміномасляна кислота (**4в**). Вихід 46 %.  $T_{\text{пл}}$  203-204 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,79 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,29 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,37 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8,07 (с, 1H, NH), 8,48 (с, 1H, NH), 8,62 (т, 1H, NH), 12,09 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 17,32; S 13,11.  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 17,27; S 13,18.

*N*-(4-Тіокарбамоїл-2-феніл-1,3-оксазол-5-іл)гліцин (**4z**). Вихід 75 %.  $T_{\text{пл}}$  185-186 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 4,28 (д., 2H,  $J=6,1$  Hz), 7,40-7,90 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,20 (с, 1H, NH), 8,65 (с, 1H, NH), 8,84 (т, 1H, NH,  $J=6,1$  Hz), 12,20 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 15,03; S 11,64.  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 15,15; S 11,56.

*N*-(4-Тіокарбамоїл-2-феніл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланін (**4d**). Вихід 80 %.  $T_{\text{пл}}$  182-183 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,64 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,75 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,45-8,05 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,13 (с, 1H, NH), 8,58 (с, 1H, NH), 8,87 (ш.т, 1H, NH), 12,31 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 14,29; S 11,13.  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 14,42; S 11,01.

*N*-(4-Тіокарбамоїл-2-феніл-1,3-оксазол-5-іл)- $\gamma$ -аміномасляна кислота (**4e**). Вихід 80 %.  $T_{\text{пл}}$  176-177 °С; ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,91 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,35 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,56 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,35-7,95 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,13 (с, 1H, NH), 8,66 (с, 1H, NH), 8,77 (ш.т, 1H, NH), 12,08 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 13,57; S 10,59.  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 13,76; S 10,50.

**Синтез тіогідантоїнових похідних 5a,б.** До розчину 0,01 моля гідроксиду натрію в 20 мл води додавали 0,01 моля однієї із сполук **3a,б**. Суміш залишали на 5 хв до повного розчинення, охолоджували до 5 °С і додавали розчин 0,01 моля фенілізотіоціанату в 10 мл ацетону. Суміш перемішували 4 год, додавали 0,1 моля концентрованої соляної кислоти та кип'ятили 20 хв, осад відфільтровували, промивали водою. Сполуки **5a,б** очищали кристалізацією з водного етанолу.

5- $\{[3-(5\text{-Оксо-1-феніл-2-тіоксоімідазолідин-4-іл)пропіл]аміно}\}$ -2-феніл-1,3-оксазол-4-карбонітрил (**5a**). Вихід 56 %.  $T_{\text{пл}}$  171-172 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2205 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,67-2,06 (м, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 3,43 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,43 (м, 1H, CH), 7,37-7,94 (м, 10H,  $2\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8,47 (ш.т, 1H, NH),

10,56 (с, 1H, NH). Знайдено, %: N 16,43; S 7,21.  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ . Обчислено, %: N 16,77; S 7,43.

5- $\{[3-(5\text{-Оксо-1-феніл-2-тіоксоімідазолідин-4-іл)пропіл]аміно}\}$ -2-(4-толуїл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (**5б**). Вихід 43 %.  $T_{\text{пл}}$  166-167 °С. ІЧ,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2210 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,54-2,01 (м, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 2,27 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,43 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,47 (м, 1H, CH), 7,37-7,94 (м, 9H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 8,56 (ш.т, 1H, NH), 10,60 (с, 1H, NH). Знайдено, %: N 16,66; S 7,21.  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ . Обчислено, %: N 16,23; S 7,43.

**Синтез *N*-заміщених амінокислот ба,б.** До суспензії 0,01 моля однієї зі сполук **4a,б** у 20 мл етанолу додавали 0,01 моля 2-бром-1-(*n*-толуїл)етанолу. Суміш кип'ятили на водяній бані 4 год, охолоджували, осад відфільтровували, промивали гарячою водою. Сполуки **ба,б** очищали кристалізацією з етанолу.

*N*- $\{4-[4-(4\text{-Толуїл})-1,3\text{-тіазол-2-іл}]-2\text{-феніл-1,3-оксазол-5-іл}]\}$ гліцин (**6a**). Вихід 57 %.  $T_{\text{пл}}$  219-220 °С. ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,37 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,11 (ш.с, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,21-8,00 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 7,38-7,90 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 7,48 (с, 1H, NH), 7,68 (с, 1H,  $\text{CH}_{\text{тіаз}}$ ), 12,33 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 10,54; S 8,07.  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 10,73; S 8,19.

*N*- $\{4-[4-(4\text{-Толуїл})-1,3\text{-тіазол-2-іл}]-2\text{-феніл-1,3-оксазол-5-іл}]\}$ - $\beta$ -аланін (**6б**). Вихід 66 %.  $T_{\text{пл}}$  188-189 °С. ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 2,38 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,79 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,80 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,21-7,95 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 7,25 (с, 1H, NH), 7,41-7,95 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 7,65 (с, 1H,  $\text{CH}_{\text{тіаз}}$ ), 12,38 (ш.с, 1H, OH). Знайдено, %: N 10,21; S 7,69.  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ . Обчислено, %: N 10,36; S 7,91.

Роботу виконано за фінансової підтримки Українського науково-технологічного центру (УНТЦ), проект 3017(R).

Надійшла в редакцію 03.03.2008 р.

#### Search for specific protein kinase CK2 inhibitors and vasoactive compounds among 5-amino-1,3-oxazoles derivatives

O.V. Shablykin<sup>1</sup>, O.P. Kucharenko<sup>2</sup>, I.N. Iakovenko<sup>1</sup>, S.M. Yarmoluk<sup>2</sup>, V.S. Brovarets<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry, NAS of Ukraine  
1 Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

**Summary.** Under treatment of 2-acylamino-3,3-dichloroacrylonitriles with glycine,  $\beta$ -alanine,  $\gamma$ -amino acid and ornithine the new *N*-substituted amino-oxazoles were obtained. The new chemical compounds were screened for the pos-



sible influence on the tonus of isolated rabbit carotid arteries as well as for inhibitory activity against some human protein kinases. Some compounds revealed vessels relaxation activity on the phenylephrine-precontracted rabbit carotids. Due to the maximal vasodilatation activity of compound **4e**, the mechanism of its influence on vessels was further investigated. It was shown that **4e** did not change the level of vessel constriction caused due to prior K<sup>+</sup>-depolarization of smooth myocyte biomembranes at increasing K<sup>+</sup> concentration in solution. This was opposite to that observed with vasodilatate caused due to prior vessel constriction with phenylephrine. Nevertheless the relaxation effect of **4e** on phenylephrine-constricted vessels was observed even on the background of high K<sup>+</sup> constriction. The vasodilator properties of **4e** and closely related compounds among investigated 5-amino-1,3-oxazole derivatives, highly correlated with its specific inhibitor activity against human protein kinase CK2. Protein kinase CK2 participates in the regulation of intracellular transduction signalling involving phosphoinositide triphosphates (PIP3) and Ca<sup>2+</sup> release. The possible role of CK2 inhibition in the vasodilatation effect of **4e** is discussed.

**Keywords:** amino acid, 5-amino-1,3-oxazole, blood vessels, vasodilators, protein kinase CK2.

## Перелік літератури

1. Matsunaga S., Fusetani N. Absolute stereochemistry of the CalyculinS potent inhibitors of Protein Phosphatases 1 and 2A // *Tetrahedron Lett.* — 1991. — Vol. 32, No. 40. — P. 5605-5606.
2. Searle Ph.A., Molinski T.F. Phorboxazoles A and B: potent cytostatic macrolides from Marine Sponge Phorbasp. // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1995. — Vol. 117, No. 31. — P. 8126-8131.
3. Драч Б.С., Броварец В.С., Смолий О.Б. Ациламинозамещенные винилфосфониевые соли в синтезах производных азотистых гетероциклов // *Журн. общ. химии.* — 2002. — Т. 72, № 11. — С. 1764-1790.
4. Драч Б.С., Броварец В.С., Смолий О.Б., Зябров В.С. Новые достижения в химии функциональных производных оксазола // *Труды Второй международной конференции «Химия и биологическая активность кислород- и серусодержащих гетероциклов».* — Москва, 2003. — 1. — С. 58-73.
5. Negwer M. Organic-chemical drugs and their synonyms (an international survey), 7<sup>th</sup> revised and enlarged edition. — Berlin: Acad. Verl., 1994. — Vol. 1, No. 4. — P. 4284.
6. Драч Б.С., Миськевич Г.Н. Реакции  $\alpha$ -бензамидо- и  $\alpha$ -фенилсульфамидо- $\beta,\beta$ -дихлоракрилонитрилов с нуклеофилами // *Журн. орг. химии.* — 1977. — Т. 13, № 7. — С. 1398-1404.
7. Lundin A. Applications of Firefly Luciferase. In: *Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry*, edited by M. Serio and M. Pazzagli, Raven Press New York, 1982.
8. Tamaoki T. Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors // *Methods in Enzymology.* — 1991. — Vol. 201. — P. 340-347.
9. Golub A.G., Yakovenko O.Ya., Prykhod'ko A.O., Lukashov S.S., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M. Evaluation of 4,5,6,7-tetrahalogeno-1H-isoindole-1,3(2H)-diones as inhibitors of human protein kinase CK2 // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2008. — 1784. — P. 143-149.
10. Golub A.G., Yakovenko O.Ya., Bdzhola V.G., Sapelkin V.M., Zien P., Yarmoluk S.M. Evaluation of 3-carboxy-4(1H)-quinolones as inhibitors of human protein kinase CK2 // *J. Med. Chem.* — 2006. — Vol. 49. — P. 6443-6450.
11. Кухарь В.П., Луйк А.И., Могилевич С.Е., Радченко И.В., Кибирев В.К., Скрыма Р.Н., Сорочинский А.Е., Галушко С.В., Корнилов А.М., Лебедь О.И. Химия биорегуляторных процессов. — К.: Наук. думка, 1991. — 477 с.
12. Tolloczko B., Turkewitsch P., Al-Chalabi M., Martin J.G. LY-294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] affects calcium signaling in airway smooth muscle cells independently of phosphoinositide 3-kinase inhibition // *J. Pharmacol. Experm. Ther.* — 2004. — 311. — P. 787-793.
13. Ibitayo A.I., Tsunoda Y., Nozu F., Owyang C., Bitar K.N. Src kinase and PI3-kinase as a transduction pathway in ceramide-induced contraction of colonic smooth muscle // *Am. J. Physiol.* — 1998. — 275. — P. G705-G711.
14. Kawabata A., Kuroda R., Kuroki N., Nishikawa H., Kawai K., Araki H. Characterization of the protease-activated receptor-1-mediated contraction and relaxation in the rat duodenal smooth muscle // *Life Sci.* — 2000. — 67. — P. 2521-2530.
15. Yang Z., Wang J., Altura B.T., Altura B.M. Extracellular magnesium deficiency induces contraction of arterial muscle: role of PI3-kinases and MAPK signaling pathways // *Pflugers Arch.* — 2000. — 439. — P. 240-247.
16. Northcott C.A., Poy M.N., Najjar S.M., Watts S.W. Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats // *Circ. Res.* — 2002. — 91. — P. 360-369.
17. Scharenberg A.M., Kinet J.P. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals // *Cell.* — 1998. — 94. — P. 5-8.
18. Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P., Baccante G., Lemmon M.A., Schlessinger J. Activation of phospholipase C gamma by PI3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting // *EMBO J.* — 1998. — 17. — P. 414-422.
19. Rameh L.E., Rhee S.G., Spokes K., Kazlauskas A., Cantley L.C., Cantley L.G. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase C gamma-mediated calcium signaling // *J. Biol. Chem.* — 1998. — 273. — P. 23750-23757.
20. Li Z., Wahl M.I., Equinoa A., Stephens L.R., Hawkins P.T., Witte O.N. Phosphatidylinositol 3-kinase-gamma activates Bruton's tyrosine kinase in concert with Src family kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — 94. — P. 13820-13825.
21. Hoshino Y., Nishimura K., Sumpio B.E. Phosphatase PTEN is inactivated in bovine aortic endothelial cells exposed to cyclic strain // *J. Cell. Biochem.* — 2007. — 100. — P. 515-526.
22. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. — Киев: Наук. думка, 1988. — 252 с.
23. Яковенко І.Н., Сливчук С.Р., Броварець В.С. Дослідження вазоактивних властивостей нових піридинових та піримідинових основ та їх конденсованих аналогів // *Журнал орг. та фарм. хімії.* — 2007. — Т. 5, № 3. — С. 74-77.