

Синтез і біологічне визначення тієнопіримідинонів як інгібіторів протеїнкінази СК2

І.М. Котей, А.О. Баланда, В.Г. Бджола, С.С. Лукашов,
О.П. Кухаренко, В.М. Харченко, С.М. Ярмолюк*

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

Резюме. З метою пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 синтезовано і проведено *in vitro* тести 86 похідних тієно[2,3-*d*]піримідинону. Серед них виявлено 15 активних сполук із IC_{50} від 2,5 до 20 мкМ. Найбільш активним інгібітором є 4-[[5-(4-етилфеніл)-4-оксотієно[2,3-*d*]піримідин-3(4*H*)-іл]метил} бензойна кислота **4o** (IC_{50} =2,5 мкМ). Досліджено взаємозв'язок «структура-активність» і запропоновано типи зв'язування похідних тієно[2,3-*d*]піримідинону із протеїнкіназою СК2.

Ключові слова: інгібітори СК2, тієно[2,3-*d*]піримідинони, гнучкий докінг.

Вступ. Як відомо, одним з універсальних клітинних механізмів передачі сигналів є послідовне фосфорилування/дефосфорилування білків. За перебіг процесу фосфорилування відповідають високоспецифічні регулятори клітинних функцій — протеїнкінази [1]. Протеїнкіназа СК2 є висококонсервативною серин-треоніною кіназою, що зустрічається в усіх еукаріотичних організмах [2]. Фізіологічна роль СК2 в організмі полягає в контролі клітинного росту і проліферації. СК2 є анти-апоптичним агентом і значно активується у випадку патологічних змін, тобто при пухлинотворенні та запальних процесах. Таким чином, СК2 є перспективною мішенню для створення протипухлинних ліків [3].

Серед відомих інгібіторів кінази СК2 є похідні бензотриазолів [4], бензімідазолів [5], хромонів [6] і хіназолінів [7]. Незважаючи на їх достатню кількість, пошук специфічних інгібі-

торів, що пригнічували б активність СК2 у низьких концентраціях, є актуальним.

У цій роботі проведено пошук інгібіторів СК2 серед похідних тієнопіримідинового гетероциклу. Серед речовин цього класу знайдено інгібітори кіназ ErbB, PDGF, KDR і VEGFR-2 [8-10]. Взаємодію тієно[2,3-*d*]піримідинонів із СК2 та активність інгібування ними протеїнкінази СК2 на сьогодні майже не досліджено. З огляду на це ми поставили за мету провести спрямований синтез низки сполук — похідних тієно[2,3-*d*]піримідинонів — і встановити за допомогою біологічного тестування, як вони впливають на активність СК2 *in vitro*.

Значна частина інгібіторів СК2 містить у своєму складі карбоксильну групу [11, 12], важливість наявності цієї групи в інгібіторах СК2 показано також в роботах [13, 14]. У нашому дослідженні для оцінки класу тієно[2,3-*d*]піримідинонів було синтезовано похідні, у структурі яких наявна карбоксильна група, і вивчено їх взаємодію із СК2.

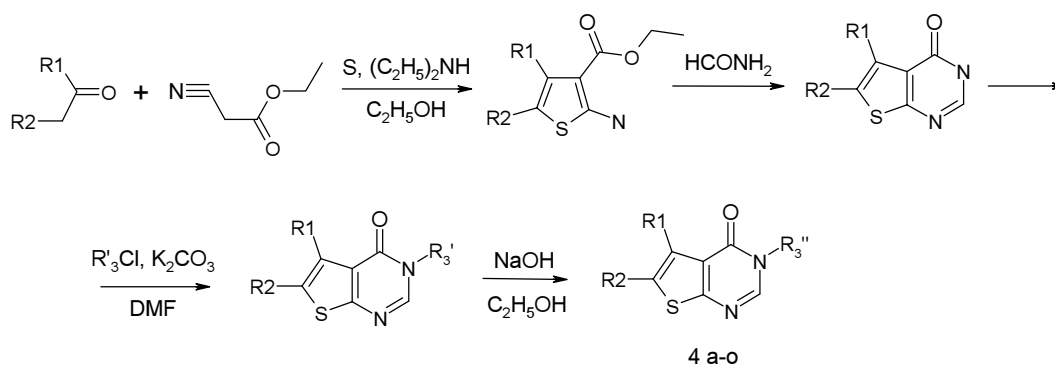
Матеріали і методи. Усі похідні тієно[2,3-*d*]піримідинонів синтезували з відповідних карбонільних сполук відповідно до схеми 1. Спочатку отримували похідні 2-аміно-3-карбе-

*Corresponding author.

Tel./ fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

Синтез похідних тісно[2,3-d]піримідин-4-онів



токситіофену за реакцією Гевальда (методика 1). Далі шляхом високотемпературної конденсації у формаміді синтезували низку вихідних тіснопіримідинонів (методика 2), що слугували вихідними сполуками для подальшого формування комбінаторних рядів. Усі кінцеві сполуки отримували алкілюванням гетероциклу різного роду галогенорганічними похідними, що мають у своїй структурі складнофірну групу, гідролізом якої одержували карбоксильні похідні (методика 3).

Контроль за перебігом реакції і чистотою одержаних сполук проводили за допомогою методу ТПХ на пластинках «Kieselgel 60 F 254» («Merck»). Структуру синтезованих речовин встановлювали за допомогою спектрів ¹H ЯМР, записаних у ДМСО-d₆ на приладі «Varian Mercury VRX-400» із робочою частотою 400 МГц і внутрішнім стандартом — ТМС.

Для отримання комплексів «ліганд—рецептор» використано пакет молекулярного докінгу «DOCK 4.0» [15–17]. Гнучкий докінг, підготовку лігандів і рецептора проведено згідно з [14].

Методики одержання похідних тісно[2,3-d]піримідинонів.

Методика 1. Суміш 107 мл (1 моль) етилового естеру ціаноцтової кислоти, 32 г (1 моль) елементарної сірки і 1 моля відповідного кетону у 200 мл етилового спирту перемішували за кімнатної температури та протягом 12 год додавали 80 мл діетиламіну. Реакційну суміш залишали на ніч, утворений осад відфільтровували, промивали водним спиртом (1:1) і сушили на повітрі. Вихід 50–88 %.

Методика 2. До 1 моля отриманого амінотіофену приливали еквімолярну кількість формаміду, розчин витримували 24 год за тем-

ператури 160–170 °С. Контроль за перебігом реакції проводили за допомогою тонкошарової хроматографії (рухома фаза — хлороформ — метиловий спирт (9:1). Після конденсації гарячий розчин реакційної суміші розбавляли ізопропіловим спиртом, охолоджували, отримані кристали відфільтровували, промивали ізопропанолом, водою і висушували у шафі-термостаті (60 °С). Вихід 85–90 %.

Методика 3. До суміші 0,005 моля відповідного тіснопіримідинону, 0,01 моль сухого карбонату калію і 10 мл ДМФА невеликими порціями при перемішуванні додавали 0,006 моль етилового (метилового) естеру галогенкарбонової кислоти. Реакційну суміш витримували за температури водяної бані 90 °С протягом 2 діб. За перебігом реакції вели хроматографічний контроль. Висаджений водою і відфільтрований продукт очищали перекристалізацією з ізопропілового спирту. Ряд утворених естерів піддавали лужному гідролізу, унаслідок якого отримували відповідні карбонові кислоти.

Визначення ступеня інгібування СК2. Біохімічні тестування активності хімічних сполук проводили методом непрямой детекції протеїнкіназної активності (т.зв. «ATP consumption»), який базується на визначенні залишкової концентрації АТФ у реакційній суміші після проведення кіназної реакції. Залишкові концентрації АТФ визначали за допомогою люциферазної суміші (Easy Light kit, PerkinElmer) через рівні інтенсивності люмінесценції, яку вимірювали на приладі-люмінометрі (PerkinElmer VICTOR 1420-50 Multilabel Counter).

Методика тестування. Реакції проводили у 96-лунковому планшеті для вимірювань люмінесценції (Optiplate 96, PerkinElmer, Cat

#6005290). У лунках планшета компонували реакційну суміш, кінцевий об'єм якої становив 30 мкл. Спочатку у пробірці (типу «епендорф») готували суміш без АТФ (Master Mix). До складу цієї суміші входили: фермент СК2 (рекомбінантний холоензим-гетеротетрамер СК2 людини, отриманий у клітинах *E.coli*, New England Biolabs, # Cat. P6010L) у кількості 0,04 мкл/пробу (що відповідно містить 20 нанограмів білка і відповідає 0,02 одиниці активності протеїнкіназ (0,02 Units) на одну реакційну пробу), субстрат кінази — пептид СК2-tide (RRRDDDSDDD) у кількості 5 мікрограмів на одну пробу (на одну реакцію — 2,5 мкл розчину пептиду з концентрацією 2 мкг/мкл), 3 мкл 10x буфера (10x=200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM KCl; 100 mM MgCl₂), деіонізована вода — 13,5 мкл.

Реакційну суміш (Master Mix) вносили в лунки 96-лункового планшета (19 мкл на кожну лунку) та окремо додавали до кожної проби розчин відповідної синтетичної сполуки. Розчини тестованих сполук готували у DMSO («Sigma», 99,9 % GC). Для попереднього тестування активності сполук (скринінг) розчин сполук готували в концентрації 0,5 мМ, тобто кінцева концентрація сполуки становила 16,6 мкМ. Після попередньої десятихвилинної інкубації кіназної суміші зі сполуками розпочинали кіназну реакцію, додаючи розчин АТФ. Для старту кіназної реакції вводили 10 мкл 22,5 мкМ АТФ і переносили планшет на термостат 30 °C («Терміт», Росія). Кінцева концентрація АТФ у реакції становила 7,5 мкМ. Кіназна реакція тривала протягом 25 хв.

Після 25 хв інкубування до реакції додавали 30 мкл люциферазної суміші («EasyLight» kinase, Perkin Elmer), що одночасно зупиняло кіназну і починало люциферазну реакцію із залишковим АТФ. Планшет одразу ставили в люмінометр (Multilabel Counter) і проводили вимірювання згідно з протоколом програми приладу (1 секунда на пробу) [18].

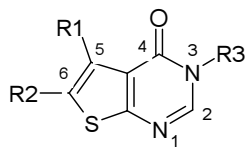
Результати проб порівнювали з негативним контролем (проба без додавання сполук із внесенням 1 мікролітра ДМСО — ДМСО контроль, або 100 % кіназної активності) та з пробю, до якої не вносили кінази (100 % інгібування кінази, або контроль АТФ). Проби, в яких інтенсивність люмінесценції була істотно

вищою за ДМСО-контроль (на 50–400 %), вважали такими, де кіназну активність пригнічено. Ці сполуки розтитрували, тобто визначали рівні активності залежно від їх концентрації в реакції, отримуючи титрувальні криві для визначення IC₅₀.

Результати й обговорення. З метою вивчення впливу похідних тієно[2,3-*d*]піримідинонів на активність протеїнкінази СК2 синтезовано і перевірено біологічну активність 86 сполук цього класу. Результати біологічного тестування засвідчують, що 15 із них за концентрації 20 мкМ пригнічують активність СК2 більш як на 50 % (значення IC₅₀ для активних сполук наведено у табл. 1).

Найбільшу активність проявили сполуки, які у 5-му положенні гетероциклу містять фенільний замісник. Також, як видно з таблиці, на активність сполук істотно впливає варіація замісника в пара-положенні фенілу. Вплив на активність протеїнкінази СК2 для цих сполук зростає в ряду H < Cl < Me < 3,4-dMe < MeO < Et (IC₅₀ **4j**, **4k**, **4l**, **4m**, **4n** і **4o** відповідно становлять 10, 5,2, 5, 4,7, 2,9 і 2,5 мкМ). Поява метильного замісника у 6-му положенні гетероциклу значно зменшує активність сполук. Для порівняння: IC₅₀ **4g** і **4h** більше 10 мкМ, а для їх незаміщених у 6-му положенні аналогів **4m** і **4l** вона становить відповідно 4,7 і 5.

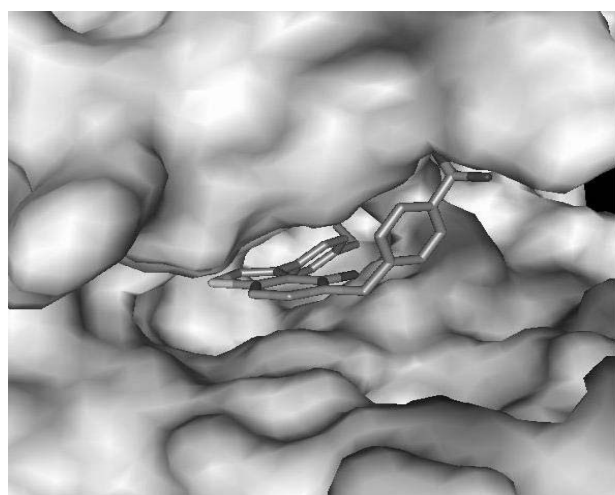
З метою з'ясування залежності «структура—активність» у досліджуваному класі сполук було проведено комп'ютерне моделювання. Аналіз комплексів цих сполук із протеїнкіназою СК2, отриманих методом молекулярного докінгу, показав, що майже всі активні сполуки мають подібний тип зв'язування. Похідні тієно[2,3-*d*]піримідинонів знаходяться у глибині АТФ-акцепторного сайту СК2 (рис. 1а). Взаємодія лігандів відбувається здебільшого за рахунок гідрофобних контактів з 11 амінокислотними залишками каталітичного сайту СК2 (рис. 1б). Серед основних контактів слід вирізнити взаємодію фенілу, замісника у 5-му положенні гетероциклу, який глибоко занурений у гідрофобну кишеню АТФ-зв'язувального сайту СК2, утворену амінокислотними залишками Phe113, Ile95 і Ile174. Крім гідрофобної взаємодії, відбувається ще й додаткова стекінг-взаємодія між ним і фенілом бічного радикала Phe113, що

Структури похідних тієно[2,3-*d*]піримідинону і дані біологічного скринінгу (IC_{50} , мкМ)

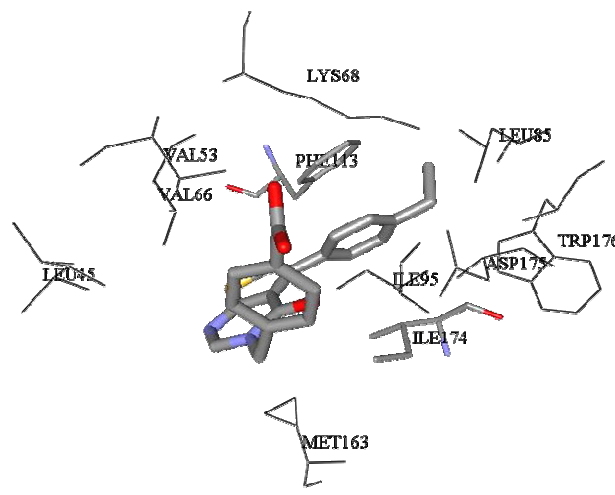
Структура	R1	R2	R3	IC_{50} , мкМ
4a		H		15-20
4b		H		15-20
4c		H		15-20
4d		Me		15-20
4e	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -			3,5
4f	Me	Me		15-20
4g		Me		15-20
4h		Me		15-20
4i		H		15-20
4j		H		10
4k		H		5,2
4l		H		5
4m		H		4,7
4n		H		2,9
4o		H		2,5

значно стабілізує комплекс. Цим, напевно, і пояснюється, чому серед похідних тієно[2,3-*d*]піримідинону виявлено значну кількість сполук, які пригнічують активність СК2 *in vitro*. Також розроблена модель взаємодії пояснює збільшення впливу інгібіторів на активність протеїнкінази СК2 при варіації

замісника в пара-положенні фенілу в ряду PrO<H<Cl≤Me≤3,4-diMe<MeO≤Et. Активність сполук підвищується зі збільшенням гідрофобності замісника, який покращує взаємодію. У випадку груп MeO й Et, найактивніших представників ряду, відбувається гідрофобна взаємодія з додатковим амінокислот-



а



б

Рис. 1. Комплекс СК2 і сполуки **4o**, отриманий методом молекулярного докінгу: а — загальний вигляд комплексу; б — взаємодії між сполукою **4o** й амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту СК2.

ним залишком АТФ-акцепторного сайту СК2 Leu85 (рис. 1б). У випадку значно більшої PrO групи в пара-положенні фенілу (сполука **4i**) уже виникають просторові ускладнення, це зміщує ліганд із вигідної позиції в сайті, що призводить до зменшення активності сполуки.

Уведення метильної групи в пара-положення фенілу вдвічі підвищує активність сполуки порівняно з незаміщеним фенілом (IC_{50} сполук **4j** і **4l** становлять відповідно 10 і 5 мкМ).

Слід було очікувати, що додаткове введення гідрофобних метильних груп також істотно покращуватиме активність. Але, як показали біологічні дослідження, активність сполуки зі 3,4-diMe заміщеним фенілом лише незначно підвищується порівняно з 4-Me заміщеним (IC_{50} **4m** і **4l** відповідно дорівнюють 4,7 і 5 мкМ). Під час порівняння комплексів цих сполук (рис. 2) з'ясувалося, що введення замісників у мета-положення фенілу призводить до зміщення ліганду, і вираш від додаткової гідро-

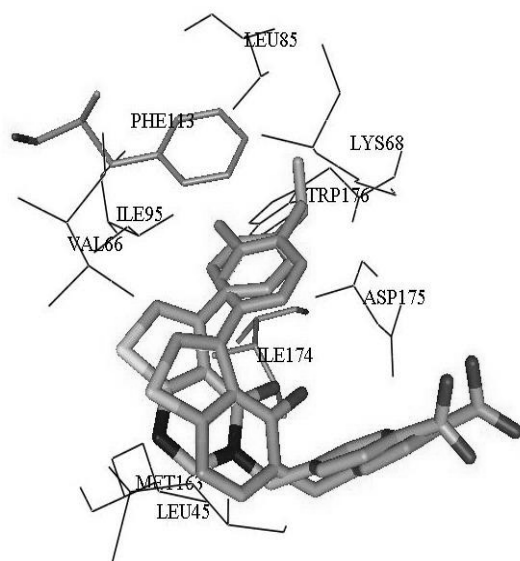


Рис. 2. Порівняльна модель взаємодії інгібіторів **4m** і **4o** з активним сайтом СК2, отримана методом молекулярного докінгу.

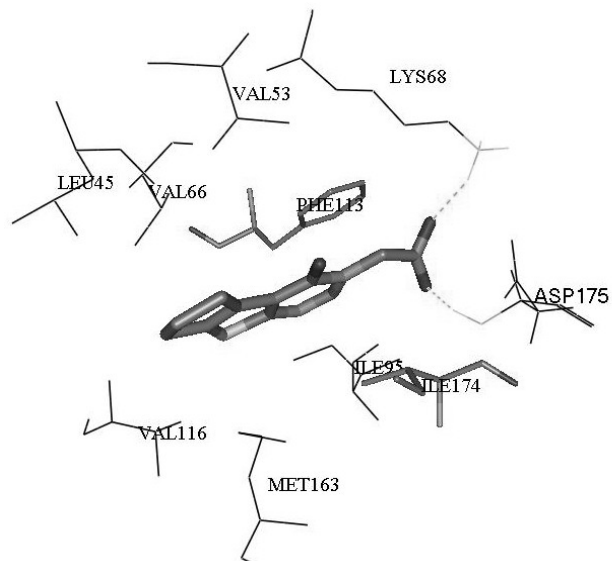


Рис. 3. Модель комплексу сполуки **4e** в АТФ-зв'язувальному сайті СК2, отримана методом молекулярного докінгу.

фобної взаємодії анулюється зменшенням стекінг-взаємодії між фенілами. Уведення метильної групи в 6-те положення гетероциклу призводить до такого ж зміщення лігандів із вигідної позиції. Вірогідно, цим і пояснюється менша активність 6-заміщених тієно[2,3-*d*]піримідинонів порівняно з незаміщеними.

Замісник R3 також істотно впливає на активність сполук. 3-(4-карбоксібензил)-5-феніл заміщені тієно[2,3-*d*]піримідинони проявляють більшу активність порівняно з 3-ацетил заміщеними, що обумовлено більшою гідрофобною взаємодією 4-карбоксібензилу з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2.

Особливої уваги заслуговує сполука **4e** ($IC_{50}=3,5$ мкМ). Як показали результати комп'ютерного моделювання, тип зв'язування в цьому випадку відрізняється від описаної вище моделі зв'язування 5-феніл заміщених тієно[2,3-*d*]піримідинонів. Карбоксильна група ліганду знаходиться у глибині АТФ-акцепторного сайту СК2 в регіоні екранованих від розчинника двох полярних амінокислотних залишків Lys68 і Asp175. Взаємодія відбувається з утворенням двох водневих зв'язків, між карбоксильною групою ліганду й атомами азоту бокового ланцюга Lys68 та азоту основного ланцюга Asp175 (рис. 3). Подібний тип взаємо-

дії інгібіторів із СК2 був уже раніше описаний для IQA, структуру комплексу якого із СК2 встановлено методом рентгеноструктурного дослідження, і для 3-карбоксі-4-(1*H*)-хінолонів [11, 14].

В обох запропонованих нами типах зв'язування досліджуваних сполук з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 тієно[2,3-*d*]піримідиновий гетероцикл взаємодіє з обома ключовими для СК2 амінокислотними залишками Val66 та Ile174. Це є необхідною умовою при зв'язуванні селективних інгібіторів із СК2 [19] і вказує на перспективність подальшої оптимізації цього класу сполук з метою пошуку ефективних інгібіторів.

Висновки. Показано, що тієнопіримідинони є перспективним класом для розробки ефективних інгібіторів протеїнкінази СК2. 15 сполук із 86 досліджених похідних інгібують активність СК2 з $IC_{50}<20$ мкМ. Запропоновано типи зв'язування похідних тієно[2,3-*d*]піримідинону з АТФ-акцепторним сайтом СК2, який пояснює вплив замісників на активність тестованих сполук. Здобуті дані дають змогу визначити напрями подальшої оптимізації структури знайдених інгібіторів.

Надійшла в редакцію 24.06.2008 р.

Synthesis and biologic evaluation of thienopyrimidinones inhibition activity against protein kinase CK2

I.M. Kotey, A.O. Balanda, V.G. Bdzhola, S.S. Lukashov, O.P. Kukhareenko, V.M. Kharchenko, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary. Inhibition activity against protein kinase CK2 of thieno[2,3-*d*]pyrimidinone derivatives was discovered. *In vitro* testing of 86 compounds allowed finding of 15 compounds with IC_{50} less than 20 μ M. The most active compound is 4-([5-(4-ethylphenyl)-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine-3-(4*H*)-yl]methyl) benzoic acid ($IC_{50}=2.5$ μ M). The structure-activity relationship of thieno[2,3-*d*]pyrimidinones was investigated and the binding modes of their interaction with protein kinase CK2 were proposed.

Keywords: CK2 inhibitors, thieno[2,3-*d*]pyrimidinones, flexible docking.

Перелік літератури

1. Manning G., White D.B., Martinez R., Hanter T., Sundersanam S. The protein kinase complement of the human genome // *Science*. — 2002. — No. 298. — P. 1912-1934.
2. Pinna L. Protein kinase CK2 // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 1997. — No. 29. — P. 551-554.
3. Ahmad K. A., Wang G., Slaton J., Unger G., Ahmed K. Targeting CK2 for cancer therapy // *Anti-Cancer Drugs*. — 2005. — Vol. 16. — P. 1037-1043.
4. Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 («casein kinase») // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 49, No. 6. — P. 44-48.
5. Szyszka R., Boguszewska 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.
6. Sarno S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistuta R., Zanotti G., Pinna L. Towards the rational design of protein kinase casein kinase 2 inhibitors // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2002. — Vol. 93, No. 2-3. — P. 159.
7. Сапелькін В.М., Голуб А.Г., Яковенко О.Я., Бджо-

ла В.Г., Ярмолюк С.М. Пошук інгібіторів казеїнкінази серед похідних 4-амінохіназоліну // Ukr. Bioorg. Acta. — 2004. — Т. 1, №№ 1-2. — С. 74-79.

8. Woods I.R., Shewchuk L.M., Ellis B., Brignola P. 6-Ethynylthieno[3,2-d]- and 6-ethynylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-anilines as tunable covalent modifiers of ErbB kinases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, No. 8. — P. 2773-2778.

9. Munchhof M.J., Beebe J.S., Casavant J.M., Cooper B.A. Design and SAR of thienopyrimidine and thienopyridine inhibitors of VEGFR-2 kinase activity // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2004. — Vol. 14, No. 1. — P. 21-24.

10. Dai Y., Guo Y., Frey R.R., Ji Z. et al. Thienopyrimidine ureas as novel and potent multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors // J. Med. Chem. — 2005. — Vol. 48, No. 19. — P. 6066-6083.

11. Sarno S., De Moliner E., Ruzzene M., Pagano M.A., Battistutta R., Bain J., Fabbro D., Schoepfer J., Elliott M., Furet P., Meggio F., Zanotti G., Pinna L.A. Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA) // Biochem. J. — 2003. — No. 374. — P. 639-646.

12. Pagano M.A., Poletto G., Di Maira G., Cozza G., Ruzzene M., Sarno S., Bain J., Elliott M., Moro S., Zago G., Meggio F., Pinna L.A. Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors // ChemBioChem. — 2007. — No. 8. — P. 129-139.

13. Golub A.G., Yakovenko O.Y., Prikhod'ko A.O.,

Lukashov S.S., Bdzholo 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 // Biochim. Biophys. Acta. — 2008. — No. 1784 (1). — P. 143-149.

14. Golub A.G., Yakovenko O.Y., Bdzholo 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. — No. 49. — P. 6443-6450.

15. Ewing T.J., 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.

16. Ewing T.J., Makino S., Skillman A.G., Kuntz I.D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases // J. Comput. Aided. Mol. Des. — 2001. — No. 15. — P. 411-428.

17. Ring C.S., Sun E., McKerrow J.H., Lee G.K., Rosenthal P.J., Kuntz I.D., Cohen F.E. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1993. — No. 90. — P. 3583-3587.

18. Tamaoki T. Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors // Methods in Enzymology. — 1991. — No. 201. — P. 340-347.

19. 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. — No. 10. — P. 2200-2206.