

## Пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних оксиіндолу

А.А. Грищенко, В.Г. Бджола, О.В. Боровиков, О.П. Кухаренко,  
Л.В. Плетньова, С.М. Ярмолюк\*

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна*

**Резюме.** Протеїнкіназа FGFR1 відіграє ключову роль у процесі пухлинної трансформації тканин та онко-васкулогенезу. Інгібітори цієї кінази можуть використовуватись як протипухлинні засоби. У цій роботі проведено пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних оксиіндолу методом віртуального скринінгу та проведено біохімічне тестування їх інгібіторної активності. Найбільш активним виявився (2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ідин)-гідразид 2-гідроксибензойної кислоти із  $IC_{50}$  1,25 мкМ. Вивчено взаємозв'язок «структура — активність» досліджених сполук і запропоновано шляхи їх подальшої оптимізації.

**Ключові слова:** протеїнкіназа FGFR1, оксиіндоли, докінг.

**Вступ.** Рецептор фактора росту фібробластів 1 (FGFR1) — член родини рецепторних тирозинових протеїнкіназ (РТК). Ця кіназа експресується під час ембріонального розвитку в багатьох типах тканин дорослого організму і, відповідно, має широкий спектр функцій в організмі. Найважливішою функцією FGFR1 у постнатальному розвитку організму є її участь у процесі ангиогенезу разом з іншими РТК [1].

Експериментально показано, що підвищення активності FGFR1 спричиняє проліферативні ефекти [2]. Підвищену активність FGFR1 знайдено в низці онкогенних захворювань, таких як рак грудей [3], простати [4] та ін. Онкогенний ефект FGFR1 пов'язують з ангиогенною функцією кінази. Підвищення активності FGFR1 разом з іншими РТК (VEGFR і EGFR) забезпечує процес неоваскуляризації пухлинної тканини, що є однією з необхідних умов росту солідних пухлин. Блокування онкоангіогенезу веде до зупинки росту пухлини та некрозу. Таким чином, одним із підходів у лікуванні солідних пухлин є пригнічення онкогенного неоваскулогенезу шляхом інгібування активності РТК, зокрема FGFR1. У зв'язку з цим останнім часом проводиться інтенсивний пошук інгібіторів РТК для застосування їх як протипухлинних препаратів.

Інгібітори РТК часто мають низьку селективність у межах родини, що зумовлено високим ступенем гомології цих кіназ, зокрема АТФ-зв'язувального сайту, до якого афінні більшість інгібіторів протеїнкіназ. Але онкоангіогенний ефект водночас зумовлюється і синергічною дією кількох РТК. Тому нерідко до клінічних випробувань допускаються інгібітори, що діють одразу на кілька РТК.

Оксиіндоли — один із перших знайдених класів інгібіторів FGFR1. Сполука SU5402 має  $IC_{50}$  30 нМ за концентрації АТФ 10 мкМ. Для цієї сполуки встановлено просторову структуру комплексу з кіназою [5]. У результаті подальших досліджень серед цього класу сполук знайдено інгібітор SU6668, який нарівні з FGFR1 інгібує VEGFR і PDGFR із  $IC_{50}$  1,2, 2,1 та 0,008 мкМ відповідно. Цей інгібітор прохо-

\*Corresponding author.

Tel./ fax: +38044-5222458

E-mail address: yarmoluksm@gmail.com

дить першу фазу клінічних випробувань як протипухлинний препарат [6].

У цій роботі проведено пошук інгібіторів FGFR1 серед похідних оксиіндолу.

**Методи та матеріали.** Віртуальний скринінг сполук здійснювали за допомогою програми AutoDock [7]. Докінг виконували в АТФ-зв'язувальний сайт кінази. Підготовку лігандів та рецептора для докінгу проведено за допомогою програми MGL Tools. Як мішені для докінгу використовували субодиночку А комплексу протеїнкінази FGFR1 з інгібітором SU5402 (код PDB банку 1fgi) [5]. Отримані методом молекулярного докінгу комплекси «ліганд-рецептор» оцінювались візуально і за величиною енергії зв'язування з кіназою. Перспективні сполуки відібрано для тестування *in vitro*.

Інгібування кіназної активності FGFR1 досліджуваними сполуками визначали біохімічними тестами *in vitro*. Для тестів використовували активований кіназний домен людської FGFR1. Активність FGFR1 визначали за включенням радіоактивного фосфору в пептидний субстрат кінази при його фосфорилуванні кіназою у присутності  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-АТФ [8]. Концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. У негативний контроль замість розчину сполук додавали розчинник ДМСО. Концентрація сполук у реакційній суміші становила 33 мкМ. Залишкову активність кінази виражали у процентах від активності кінази в негативному контролі (100 %).

Для сполук, які зменшували залишкову активність кінази до 30 %, побудовано криві залежності активності ферменту від концентрації інгібітора і за ними визначено IC<sub>50</sub>.

**Результати й обговорення.** З 80000 хімічних сполук було відібрано 920 похідних оксиіндолу. Методом рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу серед них провели пошук потенційних інгібіторів протеїнкінази FGFR1. Для біологічного тестування відбирали сполуки, які мали за результатами докінгу орієнтацію оксиіндольного гетероциклу в АТФ-зв'язувальному сайті, що аналогічна до положення оксиіндолу в комплексі протеїнкінази FGFR1 з інгібітором SU5402 (код PDB банку 1fgi). Також брали до уваги значення енергії зв'язування сполук із кіназою.

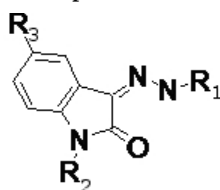
Для біологічного тестування було відібрано 9 сполук, усі вони належали до класу 3-гідразоноксиіндолів. За даними біологічного тестування, 2 сполуки інгібували активність кінази більш ніж на 70 % за концентрації 33 мкМ. Структури похідних оксиіндолу та їхню біологічну активність (залишкова активність FGFR1) наведено в таблиці 1.

При перегляді результатів скринінгу було зроблено припущення, що положення лігандів класу 3-гідразоноксиіндолів в АТФ-зв'язувальному сайті FGFR1 подібне до розташування в ньому сполуки SU5402, для якої отримана просторова структура комплексу з FGFR1. За даними рентгеноструктурного аналізу комплексу FGFR1 із SU5402, оксиіндольне кільце інгібітора в сайті зв'язування кінази займає місце аденіну АТФ та утворює два водневі зв'язки: з Оксигеном основного ланцюга Глу562 і Нітрогеном основного ланцюга Ала561. Ці амінокислотні залишки розташовані на шарнірному регіоні кінази, який з'єднує С- та N-кінцеві домени каталітичної частини кінази. Оксиіндольний гетероцикл інгібітора стабілізується гідрофобними зв'язками із залишками Вал492, Ала512, Іле545, Вал561, Ала564 та Лей630, Лей484 і Тир563, які утворюють АТФ-зв'язувальний сайт кінази (рис. 1А).

Для перевірки припущення про положення 3-гідразоноксиіндолів в АТФ-зв'язувальному сайті FGFR1 було визначено активність сполуки **10**, яка є аналогом активної сполуки **9**, але з *n*-пропільним замісником в положенні 1 оксиіндолу. Показано, що ця сполука не має вираженої інгібіторної активності, за даними докінгу це пояснюється тим, що наявність замісника при атомі Нітрогену оксиіндолу унеможливорює водневий зв'язок із карбонільною групою Глу562 та створює стеричні перешкоди для утворення іншого водневого зв'язку між Оксигеном оксиіндолу та Нітрогеном основного ланцюга Ала564. Відсутність двох ключових водневих зв'язків зменшує енергію зв'язування сполуки **10** із кіназою та проявляється в її низькій інгібіторній здатності. Це підтверджує припущення, що 3-гідразоноксиіндольні інгібітори мають положення в сайті зв'язування FGFR1, що аналогічне із SU5402 (рис. 1Б).

У комплексі SU5402 із FGFR1 пірольне кільце інгібітора утворює гідрофобні взаємодії

## Структури похідних 3-гідразоноксіндолу та біологічна активність у відношенні протеїнкінази FGFR1



№ сполуки	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Залишкова активність кіннази, %	IC <sub>50</sub> , мкМ
1		H	H	56	–
2		H	H	39	–
3		H	H	70	–
4		H	Br	72	–
5		H	NO <sub>2</sub>	65	–
6		H	H	97	–
7		H	Cl	75	–
8		H	H	25	5,6
9		H	H	23	1,25
10		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	78	–

з гідрофобним регіоном II FGFR1, а залишок пропіонової кислоти при пірольному кільці утворює водневий зв'язок з атомом Нітрогену бічного ланцюга Асн568. У запропонованому в нашій роботі положенні 3-гідразоноксіндольних інгібіторів в сайті зв'язування кіннази замісник у 3-му положенні оксіндолу направлений у бік гідрофобного регіону II кіннази, аналогічно пірольному гетероциклу SU5402. Зв'язки ліганду з рецептором в гідрофобному регіоні II кіннази посилюють інгібіторні властивості,

тому насамперед було досліджено взаємозв'язок структури та активності серед оксіндолів з варіаціями замісника R<sub>1</sub>, які в запропонованій моделі зв'язування інгібіторів з FGFR1 розташовані в цьому регіоні кіннази. Сполука **1** із фенільним замісником R<sub>1</sub> зменшує активність кіннази на 44 %. Уведення більш об'ємних і гідрофобних замісників до сполук **6** і **7** зменшує інгібіторні властивості цих сполук в порівнянні зі сполукою **1**, оскільки розмір подібних замісників не дозволяє їм зайняти

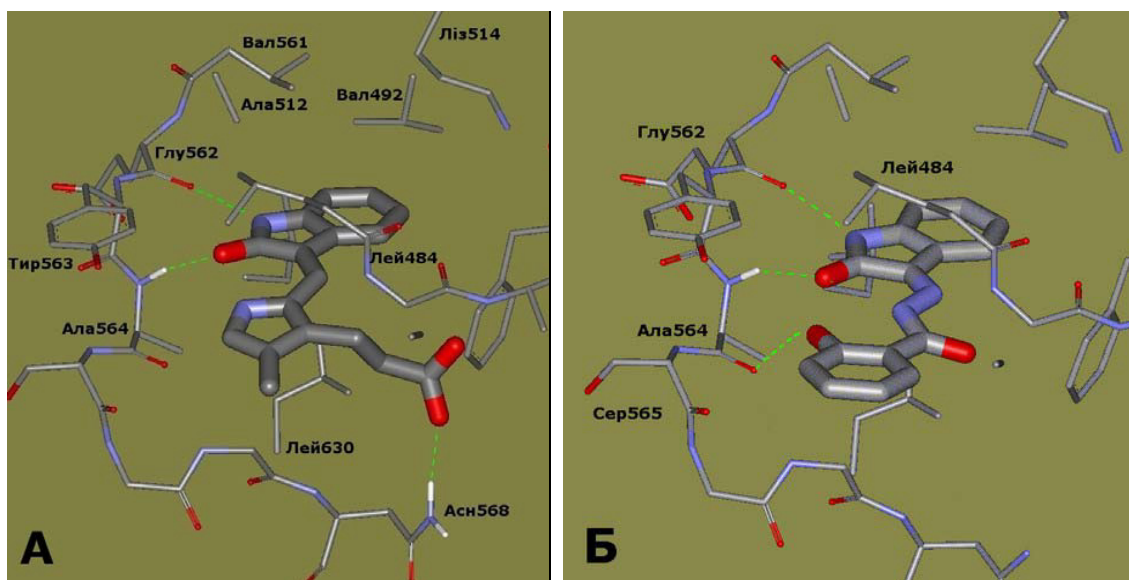


Рис 1. **А.** Комплекс SU5402 з протеїнкіназою FGFR1 (за даними рентгеноструктурного аналізу). **Б.** Комплекс сполуки 9 із протеїнкіназою FGFR1 (за даними молекулярного докінгу).

гідрофобний регіон II кінрази. Можливо, з тих же причин послаблюється інгібіторний ефект сполук з гідрофобними замісниками у фенільному кільці (сполуки 3 і 4). Сполука 2 ( $R_1$  — ізоніотинова кислота) демонструє дещо кращі інгібіторні властивості. Менший за об'ємом 2-карбоксивуран як замісник  $R_1$  у сполуці 5 не веде до покращення інгібування кінрази цією сполукою. Це може бути пов'язано зі зменшенням кількості ван-дер-ваальсових взаємодій карбоксивуранового замісника з гідрофобним регіоном II.

Найкращими інгібіторами виявились сполуки 8 і 9 із карбоксивурановими замісниками  $R_1$ , що зменшували активності кінрази на 75–77% і мали  $IC_{50}$  5,6 та 1,25 мкМ відповідно. За даними докінгу, ортогідроксильна група фенілу в сполуці 9 утворює водневий зв'язок з Оксигеном основного ланцюга Ала564, а метагідроксильна група фенілу сполуки 8 утворює водневий зв'язок з Оксигеном основного ланцюга Сер565. Фенільний замісник утворює гідрофобні контакти із залишком Лей484. Припускається, що саме утворення додаткового водневого зв'язку між гідроксильною групою фенілу інгібітора та кіназою пояснює високі інгібіторні здатності сполук 8 і 9.

У роботі [9] показано високу ефективність сполук з різними замісниками в 5-му положенні оксиіндолу у відношенні протеїнкіназ FGFR1, VEGFR та PDGFR у порівнянні з ана-

логічними сполуками без замісників. Замісники в цьому положенні орієнтуються вглиб сайту зв'язування і вступають у гідрофобні взаємодії в гідрофобному регіоні I кінрази або утворюють водневий зв'язок із залишком Ліз514, збільшуючи таким чином спорідненість інгібітора з кіназою. Уведення невеликих за розміром гідрофобних або електроноакцепторних замісників у  $R_3$  фенольних похідних 3-гідразоноксиіндолів може привести до посилення інгібіторних властивостей і пропонується як шлях для подальшої оптимізації цього класу сполук.

Також можливим способом оптимізації фенольних похідних 3-гідразоноксиіндолів є введення електроноакцепторних замісників у 6-те положення фенілу. Такі замісники в цьому положенні можуть утворювати водневий зв'язок з Асн568 кінрази, подібний до того, що спостерігається в комплексі SU5402 із FGFR1. Також слід зауважити, що обов'язковою умовою для активності оксиіндолів є відсутність замісників у положенні 1 гетероциклу. У цій роботі показано, що такі замісники унеможливають водневий зв'язок із шарнірним регіоном кінрази, що призводить до значного послаблення інгібіторних властивостей.

**Висновки.** У роботі досліджено інгібіторні властивості ряду сполук класу оксиіндолів по відношенню до протеїнкінази FGFR1. Методом

рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу перевірено 920 сполук класу оксіндолів та відібрано 9 сполук для тестів *in vitro*. Установлено високу інгібіторну ефективність фенольних похідних 3-гідразоноксіндолів. Найбільш активним інгібітором серед досліджуваних сполук виявилась (2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ідин)-гідразид 2-гідроксибензойна кислота із  $IC_{50}$  1,25 мкМ. Показано, що висока інгі-

біторна активність фенольних похідних 3-гідразоноксіндолів зумовлена утворенням водневого зв'язку між гідроксильною групою фенілу та кіназою. Запропоновано шляхи проведення подальшої оптимізації цього класу сполук з метою посилення їхніх інгібіторних властивостей.

Надійшла в редакцію 17.11.2009 р.

#### Search for FGFR1 inhibitors among oxindole derivatives

A.A. Gryshchenko, V.G. Bdzhola, O.V. Borovikov, O.P. Kukharenko, L.V. Pletnyova, S.M. Yarmoluk

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

**Summary.** Protein kinase FGFR1 plays a key role in oncogenic transformation and oncovasculogenesis. Inhibitors of this kinase can be used as anticancer drugs. Protein kinase FGFR1 inhibitors searching were performed among oxindole derivatives. 9 compounds from 920 oxindole derivatives have been chosen using virtual screening. The most active compound was 2-Hydroxy-benzoic acid (2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidene)-hydrazide ( $IC_{50}$  1.25  $\mu$ M). Structure-activity relationship of tested compounds was investigated and optimization strategies were proposed.

**Keywords:** protein kinase FGFR1, oxindole, docking.

#### Перелік літератури

1. Friesel R.E. and Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction // *FASEBJ*. — 1995. — Vol. 9. — P. 919-925.
2. Xian W., Schwertfeger K.L., Vargo-Gogola T., Rosen J.M. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model // *J. Cell Biol.* — 2005. — Vol. 171, No. 4. — P. 663-73.
3. Elbauomy Elsheikh S., Green A.R., Lambros M.B., Turner N.C., Grainge M.J., Powe D., Ellis I.O., Reis-Filho J.S. FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis // *Breast Cancer Res.* — 2007. — Vol. 9, No. 2.
4. Gowardhan B., Douglas D.A., Mathers M.E., McKie A.B., McCracken S.R., Robson C.N., Leung H.Y. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer // *Br. J. Cancer.* — 2005. — Vol. 92, No. 2. — P. 320-327.
5. Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh B.K., Hubbard S.R., Schlessinger J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors // *Science.* — 1997. — Vol. 276, No. 5314. — P. 955-960.
6. Sessaa C., Viganò L., Grasselli G., Trigoc J., Marimón I., Llado A., Locatelli A., Ielmini N., Marsoni S., Giann L. Phase I clinical and pharmacological evaluation of the multi-tyrosine kinase inhibitor SU006668 by chronic oral dosing // *Euro J. Cancer.* — 2006. — Vol. 42. — P. 171-178.
7. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *J. Comput. Chem.* — 1998. — 19. — P. 1639-1662.
8. Hastie C.J., McLauchlan H.J., Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1, No. 2. — P. 968-971.
9. Sun L., Tran N., Liang C., Hubbard S., Tang F., Lipson K., Schreck R., Zhou Y., McMahon G., Tang C. Identification of substituted 3-[(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylene]-1,3-dihydroindol-2-ones as growth factor receptor inhibitors for VEGF-R2 (Flk-1/KDR), FGF-R1, and PDGF-Rbeta tyrosine kinases // *J. Med. Chem.* — 2000. — Vol. 43, No. 14. — P. 2655-2663.