

Пошук інгібіторів казеїнкінази 2 серед похідних 4-амінохіназоліну

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. За допомогою методу віртуального скринінгу з комбінаторної бібліотеки похідних 4-амінохіназоліну було відібрано 75 сполук для дослідження взаємодії з казеїнкіназою 2 (СК2) *in vitro*. Установлено, що 9 сполук інгібують активність СК2 більш як на 70 % при концентрації 33 μM . IC_{50} цих сполук лежать у межах від 7,7 до 20 μM . Найактивнішим інгібітором виявилася сполука 1.57 (2-(3-метилфеніл)-4-(4-карбоксіфеніламіно)хіназолін), яка мала IC_{50} 7,7 μM .

Ключові слова: інгібітори СК2, 4-амінохіназоліни, віртуальний скринінг.

Вступ. Протеїнкіназа СК2 належить до сімейства серин-треонінових протеїнкіназ і присутня практично в усіх еукаріотичних клітинах. Негативний вплив СК2 на механізми контролю апоптозу, підвищена активність цієї протеїнкінази у тканинах з прискороною проліферацією та багатьох пухлинах дає змогу розглядати її як суттєвий фактор процесів росту пухлин [1–3]. Відома також значна роль СК2 у перебігу запальних процесів [4]. Тому, на наш погляд, пошук нових її інгібіторів залишається актуальним.

Інгібітори СК2 знайдено серед похідних бензотріазолів [5], бензімідазолів [6], антрахінонів, хромонів [7], хіназолонів [8] і заміщених сульфамідів. Серед 4-амінохіназолонів досліджено лише взаємодію 4-(3-хлороаніліно)-6,7-диметоксихіназоліну-тирфостину AG1478 (IC_{50} =25,9 μM) з СК2 [9]. Ураховуючи високий рівень активності AG1478 по відношенню до СК2, метою нашої роботи був

пошук ефективних інгібіторів казеїнкінази серед 4-амінохіназолонів.

Матеріали і методи. Похідні 4-амінохіназоліну, не заміщені в другому положенні, було синтезовано з відповідних антранілових кислот, а похідні, заміщені в другому положенні, — з антраніламідів [10–13] (схема 1). Спектри ПМР синтезованих сполук наведено у віртуальному додатку до журналу www.bioorganica.org.ua.

Передбачення геометрії потенційних інгібіторів СК2 здійснено за допомогою авторської програми Topbuilder і напівемпіричного розрахункового методу AM1 пакета квантово-механічних розрахунків GAMESS [14]. Оптимізацію 3-D структури СК2 людини (www.pdb.org) проведено у вакуумі за допомогою алгоритму steepest descent силовим полем GROMOS FF, реалізованим у пакеті молекулярної динаміки GROMACS [15]. Часткові заряди атомів рецептора розраховано за допомогою AMBER FF. Для молекулярного докінгу та скорингу лігандів використано пакет DOCK 4.0 [16]. Для дослідження *in vitro* відібрано сполуки з високими енергіями зв'язування з рецептором.

*Corresponding author.

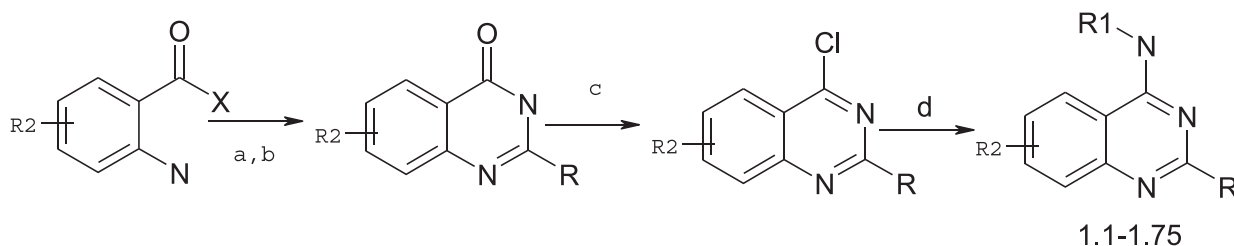
Tel.: +38044-2522389; fax: +38044-2522458

E-mail address:

sergiy@yarmoluk.org.ua

© В. М. Сапелкін, А. Г. Голуб, О. Я. Яковенко, В. Г. Бджола,
С. М. Ярмолук, 2004

Синтез похідних 4-амінохіназоліну



1.1-1.75

*R=H, Alkyl, Ar, CO₂Et, CONHR; R1= Alkyl, Ar, Het; R2= H, Me, Br, I

a — HCONH₂, кип'ятіння (R=H, X=OH); b — 1. RCOCl, Py 2. 200 °C (R≠H, X=NH₂); c — POCl₃, PCl₅; d — R₁NH₂, DMF.

Контроль за проходженням реакції та чистотою синтезованих сполук здійснювався хроматографічно на пластинках «Silufol UV-254», елюент: хлороформ-метанол (95:5). Структуру одержаних сполук доведено за допомогою спектрів ¹H-ЯМР, записаних в ДМСО-D₆ на приладі «Varian VXR-300» з робочою частотою 300 МГц і внутрішнім стандартом — тетраметилсиланом.

Біологічне тестування проводилося з використанням АТФ, СК2 людини (рекомбінантна, Biolabs). Як контроль використовували кверцетин. Радіоактивність вимірювалася сцинтиляційним лічильником (Rack Beta, Pharmacia).

Методика визначення ступеня інгібування СК2. До 30 μl буферного розчину (20 mM Tris·HCl, pH 7,5; 50 mM KCl; 10 mM MgCl₂) додавали ³²P γ-АТР до отримання специфічної активності 100 μCi/μM, 10 одиниць СК2 та необхідну для отримання концентрації 30 μM кількість тестованої речовини. Суміш витримували при температурі 30 °C протягом 20 хвилин, потім додавали 50 мл 10 %-ої Н₃РО₄, наносили на фосфатоцелюлозний фільтр і тричі промивали його 1 %-м розчином Н₃РО₄. Фільтр висушували на повітрі та визначали ступінь включення ³²P за допомогою сцинтиляційного лічильника без додавання сцинтилятора (за Черенковим). Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням включення ³²P до АТР при додаванні інгібітора та за його відсутності.

Результати і обговорення. Для пошуку нових інгібіторів СК2 було зроблено рецептор-орієнтований віртуальний скринінг 1000 похідних 4-амінохіназоліну. Докінг сполук

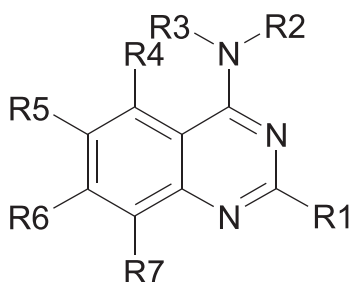
проведено в сайт цієї кінази, який зв'язує АТФ. На основі порівняльної оцінки розрахованих програмою DOCK енергій зв'язування лігандів з рецептором для подальшого синтезу та біологічного тестування було відібрано 75 сполук. Структури похідних 4-амінохіназоліну 1.1—1.75 і дані біологічного скринінгу (залишкова активність СК2 при концентрації сполук 33 μM) подано в таблиці 1.

Як видно з таблиці, 26 похідних 4-амінохіназоліну (34,6 % тестованих) інгібують активність СК2 більш як на 50 % (IC₅₀ < 33 μM). Сполуки, для яких активність цієї протеїнкінази не перевищувала 30 % при концентрації 33 μM, тестувалися додатково. Значення IC₅₀ цих сполук лежать у межах від 7,7 до 20 μM.

Аналіз комплексу сполуки 1.57 з СК2, отриманого методом молекулярного докінгу (рис. 2), дав змогу передбачити тип зв'язування похідних 4-амінохіназоліну з сайтом СК2, що зв'язує АТФ, та пояснити вплив замісників на активність тестованих сполук.

Слід зазначити, що взаємодія ліганду 1.57 з активним сайтом СК2 (рис. 2а) головним чином відбувається за рахунок гідрофобних контактів. Основний внесок в енергію зв'язування ліганду з СК2 дає хіназолінове ядро, яке має гідрофобні контакти з 8 амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту (Lys68, Glu81, Leu85, Ile95, Phe113, Ile174, Trp176, Asp175) (рис. 2б). Найважливіші серед них — взаємодія з Phe113 (стекінг з ним сприяє додатковій стабілізації), Asp175 та Ile174, останній з яких є ключовим для СК2 і певною мірою відповідає за селективність зв'язування лігандів. Саме щільна фіксація хіназолінового ядра в сайті СК2, який зв'язує АТФ, пояснює, чому серед похідних

Структури похідних 4-амінохіназоліну 1.1–1.75 і дані біологічного скринінгу
(залишкова активність СК2 при концентрації сполук 33 μM)



№	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Активність СК2, %	IC ₅₀ , μM
1.1	H	H	2-фурфурил	H	Br	H	H	76	
1.2	H	H	циклогексил	H	Br	H	H	69	
1.3	H	H	ізобутил	H	Br	H	H	40	
1.4	H	H	ізопропіл	H	Br	H	H	56	
1.5	H	метил	бензил	H	Br	H	H	52	
1.6	H	етил	бутил	H	Br	H	H	32	
1.7	H	H	бутан-2-ова кислота	H	Br	H	H	71	
1.8	H	H	бутан-2-діова кислота	H	Br	H	H	92	
1.9	феніл	H	ізобутил	H	H	H	H	78	
1.10	3-пентил	H	3-метоксифеніл	H	H	H	H	50	
1.11	3-пентил	H	4-карбметоксифеніл	H	H	H	H	69	
1.12	4-хлорофеніл	H	3,4-диметилфеніл	H	H	H	H	55	
1.13	4-хлорофеніл	H	2-хлорофеніл	H	H	H	H	42	
1.14	4-хлорофеніл	H	4-хлорофеніл	H	H	H	H	52	
1.15	4-хлорофеніл	H	3,4-дихлорофеніл	H	H	H	H	64	
1.16	4-хлорофеніл	H	4-іодифеніл	H	H	H	H	47	
1.17	4-хлорофеніл	H	3-карбоксифеніл	H	H	H	H	25	17
1.18	4-хлорофеніл	H	4-карбоксифеніл	H	H	H	H	14	10
1.19	H	H	3-карбоксифеніл	H	H	H	H	13	9
1.20	H	H	4-карбоксифеніл	H	H	H	H	57	
1.21	H	H	2-фурфурил	H	H	H	H	97	
1.22	H	H	4-метилтіо-2-бутанова кислота	H	H	H	H	107	
1.23	H	H	3-хлорофеніл	H	H	H	H	44	
1.24	H	H	4-хлорофеніл	H	H	H	H	84	
1.25	H	H	4-диметиламінофеніл	H	H	H	H	57	
1.26	2-хлорофеніл	H	ізобутил	H	H	H	H	98	
1.27	феніл	H	2-фурфурил	H	H	H	H	62	
1.28	феніл	H	бутан-2-діова кислота	H	H	H	H	81	
1.29	феніл	H	пропан-3-ова кислота	H	H	H	H	63	
1.30	феніл	H	гексан-6-ова кислота	H	H	H	H	70	
1.31	H	H	ізобутил	H	H	H	H	93	
1.32	H	H	3-диетиламінопропіл	H	H	H	H	92	
1.33	феніл	H	2-метил-3-хлорофеніл	H	H	H	H	70	
1.34	H	H	циклогексил	H	метил	H	H	58	
1.35	H	H	аліл	H	метил	H	H	97	
1.36	H	метил	циклогексил	H	метил	H	H	100	
1.37	H	H	трет-бутил	H	Br	H	H	48	
1.38	2,4-дихлорофеніл	H	2-фурфурил	H	H	H	H	42	
1.39	2,4-дихлорофеніл	етил	етил	H	H	H	H	86	
1.40	H	H	1-фенілетил	H	H	H	H	79	
1.41	феніл	2-метоксиетил	2-метоксиетил	H	H	H	H	100	
1.42	H	ізобутил	ізобутил	H	метил	H	H	98	
1.43	4-нітрофеніл	H	2,3-диметилфеніл	H	H	H	H	40	
1.44	4-нітрофеніл	H	2-метил-4-хлорофеніл	H	H	H	H	48	
1.45	4-нітрофеніл	H	4-іодифеніл	H	H	H	H	67	
1.46	4-нітрофеніл	H	4-бутоксифеніл	H	H	H	H	93	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.47	4-нітрофеніл	H	3-ацетилфеніл	H	H	H	H	89	
1.48	4-нітрофеніл	H	3-нітрофеніл	H	H	H	H	66	
1.49	4-нітрофеніл	H	4-карбоксифеніл	H	H	H	H	20	17
1.50	4-нітрофеніл	H	3-карбоксифеніл	H	H	H	H	28	20
1.51	4-метилфеніл	H	4-морфолінофеніл	H	H	H	H	51	
1.52	4-метилфеніл	H	4-метокси-5-хлорофеніл	H	H	H	H	68	
1.53	4-метилфеніл	H	4-карбоксифеніл	H	H	H	H	18	15
1.54	H	H	3-(2-хлоробензоїлокси)феніл	H	H	H	H	78	
1.55	H	H	3-(2-тієнілокси)феніл	H	H	H	H	57	
1.56	H		1,3,3-триметил-6-азабіцикло[3.2.1]октил	H	Br	H	H	37	
1.57	3-метилфеніл	H	4-карбоксифеніл	H	H	H	H	12	7,7
1.58	3-метилфеніл	H	3-карбоксифеніл	H	H	H	H	12	14
1.59	3-метилфеніл	H	4-(1-піперидино)феніл	H	H	H	H	93	
1.60	4-метоксифеніл	H	1-пропіл	H	H	H	H	85	
1.61	H	H	4-ацетамідифеніл	H	Br	H	H	102	
1.62	H	H	3-нітрофеніл	H	I	H	H	68	
1.63	H	H	4-ацетамідифеніл	H	I	H	H	62	
1.64	4-хлорофеніл	H	2-гідрокси-5-метилфеніл	H	H	H	H	62	
1.65	феніл	H	4-ацетамідифеніл	H	H	H	H	74	
1.66	H	H	4-(4-хлоробензіло)-ксифеніл	H	H	H	H	59	
1.67	H	H	4-карбомоїл-2-бутанова кислота	H	H	H	H	105	
1.68	феніл	H	трет-бутилкарбоксіетанол-2	H	H	H	H	83	
1.69	феніл	H	2-тієнілкарбоксіетанол-2	H	H	H	H	36	
1.70	4-хлорофеніл	H	2-метокси-5-діетиламіносульфамоїлфеніл	H	H	H	H	12	19
1.71	феніл	H	2-метокси-5-діетиламіносульфамоїлфеніл	H	H	H	H	40	
1.72	H	H	4-(1,5-диметил-2-фенілпіразолон-3-іл)	H	Br	H	H	90	
1.73	CO ₂ Et	H	4-хлорофеніл	H	H	H	H	32	
1.74	4-метилфеніламінокарбамоїл	H	4-метилфеніл	H	H	H	H	66	
1.75	1-нафтиламінокарбамоїл	H	1-нафтил	H	H	H	H	68	

4-амінохіназоліну виявлено значну кількість сполук, які суттєво впливають на активність СК2 *in vitro*.

Замісник R1 у другому положенні хіна-

золіну, у даному випадку 3-метилфеніл, має слабкі гідрофобні контакти з Asp175 та Ile174, тому варіації замісників у цьому положенні не призводять до значної зміни ак-

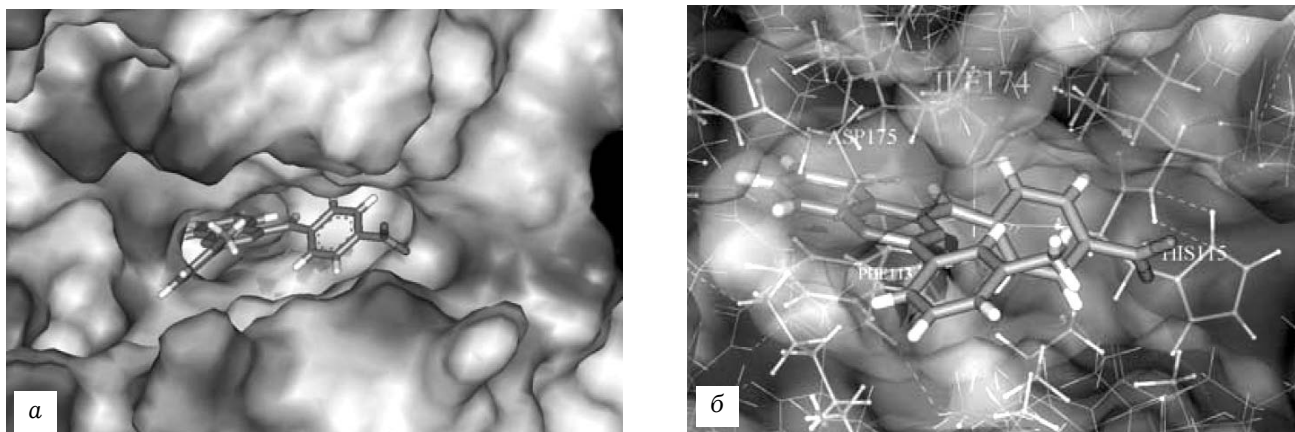


Рис. 2 (а, б). Сполука 1.57 у сайті СК2, який зв'язує АТФ (модель комплексу, отримана методом молекулярного докінгу).

тивності похідних 4-амінохіназоліну стосовно СК2.

Дослідження показало, що значний вплив на активність хіназолінів має замісник R3. При взаємодії лігандів з СК2 він утворює гідрофобні контакти з амінокислотними залишками сайту зв'язування АТФ (у випадку ліганду 1.57 це Val66, Phe113, Val116, Met163 та Le174), що додатково стабілізують комплекс. Серед тестованих похідних 4-амінохіназоліну найбільшу активність по відношенню до СК2 виявляють сполуки з R3 = 4- або 3-карбоксіфеніл. Це, очевидно, пояснюється тим, що карбоксигрупа знаходиться у зоні зв'язування фосфатної групи АТФ і є сольватованою. Тому вода створює менший тиск як на гідрофільну карбоксигрупу, так і на дес-табілізацію ліганду в цілому (рис. 2а). Вища активність амінохіназолінів з R3-4-карбоксіфенілом у порівнянні зі сполуками, що містять

3-карбоксіфеніл, можливо, обумовлена додатковою (крім контактів з Val66 і Val116) взаємодією 4-карбоксигрупи з His115, чого не спостерігається у випадку сполук з R3-3-карбоксіфенілом (рис. 2б).

Висновки. Для пошуку інгібіторів СК2 людини проведено рецептор-орієнтований віртуальний скринінг 1000 похідних 4-амінохіназоліну. Для синтезу та біологічного тестування було відібрано 75 сполук. Установлено, що 26 із них (34,6 %) при концентрації 33 μM інгібують активність СК2 більш як на 50 % ($\text{IC}_{50} < 33 \mu\text{M}$). Найактивнішим інгібітором виявився 2-(3-метилфеніл)-4-(4-карбоксіфеніламіно)хіназолін 1.57 ($\text{IC}_{50} = 7,7 \mu\text{M}$). Аналіз комплексу сполуки 1.57 з СК2, отриманого методом молекулярного докінгу, дав змогу передбачити тип зв'язування похідних 4-амінохіназоліну з АТФ-акцепторним сайтом СК2 та пояснити вплив замісників на активність тестованих сполук.

Search for casein kinase 2 inhibitors among 4 aminoquinazoline derivatives

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

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

Abstract. 75 compounds from combinatorial library of 4-aminoquinazoline derivatives have been chosen using receptor-based virtual screening technology for studying their CK2 inhibition activity. It has been shown that 9 substances inhibit CK2 activity by more than 70 %. IC_{50} of these compounds ranged from 7 to 20 μM . The most potent inhibitor, 1.57 (2-(3-methylphenyl)-4-(4-carboxyphenylamino)quinazolin, has IC_{50} 7.7 μM .

Keywords: CK2 inhibitors, 4-aminoquinazoline 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. — 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. — 364. — P. 41—47.
3. Guerra B., Issinger O.-G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology // *Electrophoresis.* — 1999. — 20. — P. 391—408.
4. Pinna L.A., Meggio F. Protein kinase CK2 («casein kinase-2») and its implication in cell division and proliferation // *Prog. Cell Cycle Res.* — 1997. — 3. — P. 77—97.
5. 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. — 43, № 2. — P. 389—396.
6. 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.
7. 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. — 93, NN 2—3. — P. 159.
8. 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. — 46, N 13. — P. 2656—2662.
9. 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. — 23, № 6. — P. 556—561.

10. *Amarego W.L.F.* Preparation of phthalazine and quinazoline // *J. Appl. Chem.* — 1961. — N 11. — P. 70—72.

11. *Сапелкін В.М., Маковенко І.Є., Лукашов С.С., Дубініна Г.Г. та Ярмолюк С.М.* Протипухлинна активність 6-заміщених похідних 4-алкіламінохіназоліну // *Біополімери і клітина.* — 2003. — 19, № 5. — С. 467—472.

12. *Partridge M.W., Butler K.J.* Cyclic amidines. Part IX. Tricycloquinazoline // *J. Chem. Soc.* — 1959. — P. 2396—2400.

13. *Gardner B., Kanagasooriam A.G.S., Smyth R.M., Williams A.* Mechanism of alkaline cyclization of 2-(sub-

stituted benzamido)benzamides to 4-quinazolinones // *J. Org. Chem.* — 1994. — 59. — P. 6245—6250.

14. *Schmidt, M.W., Baldrige, 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. — 14. — P. 1347—1358.

15. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis // *J. Mol. Mod.* — 2001. — 7. — P. 306—317.

16. *Ewing T.J.A., Kuntz I.D.* Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening // *J. Computational Chem.* — 1996. — 18, N 9. — P. 1175—1189.