

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ ім. В.П. КУХАРЯ

**Котей Ігор Михайлович**

УДК 547.735+547.859+615.355

**Нові інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та CK2  
на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину**

02.00.10 — біоорганічна хімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук

**Київ — 2019**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

**Науковий керівник:** доктор хімічних наук, професор,  
**Ярмолюк Сергій Миколайович**,  
Інститут молекулярної біології  
і генетики НАН України,  
завідувач відділу біомедичної хімії

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, доцент  
**Матійчук Василь Степанович**,  
Львівський національний університет  
ім. Івана Франка,  
професор кафедри органічної хімії

доктор біологічних наук, професор  
**Кібірєв Володимир Костянтинович**,  
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
ім. В.П. Кухаря НАН України,  
старший науковий співробітник відділу  
синтезу фізіологічно активних сполук

Захист відбудеться «28» листопада 2019 року о 10-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України за адресою 02094, м. Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України.

Автореферат розіслано «25» жовтня 2019 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої  
ради Д 26.220.01

В.О. Євдокименко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Тієнопіримідини – це відомий клас гетероциклічних сполук, які є біоізостерами азотистих основ – пуринів, структурний фрагмент яких широко використовується в процесі розробки багатьох біологічно активних речовин. Похідні тієно[2,3-*d*]піримідину мають значний фармакологічний потенціал, оскільки виявляють різноманітну біологічну активність, зокрема протипухлинну, протизапальну, протимікробну, противірусну, нейропротекторну та ін. Протипухлинна активність тієно[2,3-*d*]піримідинів пов'язується з різними механізмами їхньої дії, зокрема з інгібуванням протеїнкіназ, із пригніченням полімеризації тубуліну та із неселективною антипроліферативною активністю (Ali et al., 2019). Подібність тієнопіримідинового циклу з аденіном зробила сполуки цього класу одним з основних об'єктів для пошуку інгібіторів протеїнкіназ.

Низка експериментальних досліджень демонструє, що протеїнкінази FGFR1 і CK2 надекспресовані та/або надактивовані в різних типах пухлин, включаючи рак легень, голови і шиї, шлунку, молочної залози, простати, а також при мієлопроліферативних захворюваннях, гліобластомі, меланомі, ренальній карциномі та ін. (Haugsten et al., 2010, Chua et al., 2017). Зважаючи на значну роль FGFR1 і CK2 у процесах канцерогенезу, ці протеїнкінази є перспективними молекулярними мішенями для розробки нових протиракових препаратів. Однак у літературі не представлено інгібіторів цих ензимів серед похідних тієно[2,3-*d*]піримідинів, які, проте, характеризуються значним протипухлинним потенціалом.

Отже, розробка методів синтезу нових похідних тієно[2,3-*d*]піримідину та пошук серед них інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 і CK2 є актуальним завданням біоорганічної хімії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася в рамках бюджетних тем відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення протеїнкіназ як молекулярних мішеней для розробки терапевтичних засобів методами комбінаторної хімії та комп'ютерного моделювання» (номер державної реєстрації – 0107U003345, 2008–2012 рр.), «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.) і конкурсної тематики «Оптимізація інгібіторів протеїнкінази CK2 та дослідження їхньої біологічної активності на культурах ракових клітин» (номер державної реєстрації 0107U004939, 2007–2009 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи була розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 і CK2 людини на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

1. Розробити методики синтезу й отримати нові похідні тієно[2,3-*d*]піримідину.
2. Дослідити інгібувальну активність синтезованих сполук щодо протеїнкіназ FGFR1 та CK2 *in vitro*.
3. Проаналізувати дані біохімічного тестування і встановити залежність

інгібувальної активності сполук від їхньої хімічної структури.

4. Запропонувати шляхи хімічної модифікації інгібіторів на основі даних комп'ютерного моделювання та результатів тестування для підвищення їхньої інгібувальної активності.

5. Провести хімічну оптимізацію похідних тієно[2,3-*d*]піримідину для розробки активніших інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 і СК2.

**Об'єкт дослідження:** інгібувальна активність низькомолекулярних органічних сполук щодо протеїнкіназ FGFR1 та СК2 людини.

**Предмет дослідження:** похідні тієно[2,3-*d*]піримідину, протеїнкіназа СК2, протеїнкіназа FGFR1.

**Методи дослідження:** органічний синтез, комбінаторний синтез, фізико-хімічні методи аналізу органічних речовин (ЯМР спектроскопія на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , хромато-мас-спектрометрія, тонкошарова хроматографія), гнучкий молекулярний докінг, біохімічне тестування активності протеїнкіназ із використанням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}\text{P}$ .

**Наукова новизна одержаних результатів.** У результаті виконання дисертаційної роботи синтезовано й досліджено фізико-хімічні властивості нових похідних тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ону та тієно[2,3-*d*]піримідину.

Досліджено інгібувальну активність синтезованих сполук стосовно протеїнкіназ FGFR1 і СК2 та встановлено її залежність від хімічної структури.

Передбачено можливі способи зв'язування розроблених інгібіторів із АТФ-зв'язувальною кишенею FGFR1 і СК2 за допомогою методів комп'ютерного моделювання.

Знайдено новий клас низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 та СК2 – тієно[2,3-*d*]піримідини – і досліджено механізми їхньої взаємодії з ензимами.

**Практичне значення одержаних результатів.** У результаті виконання дисертаційної роботи одержано нові високоефективні інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та СК2, зокрема сполуки **3.45** ( $\text{IC}_{50}$  0,9 мкМ), **3.35** ( $\text{IC}_{50}$  0,18 мкМ), **3.36** ( $\text{IC}_{50}$  0,16 мкМ), **4.40** ( $\text{IC}_{50}$  0,1 мкМ), **4.80** ( $\text{IC}_{50}$  8 нМ), що пригнічують активність протеїнкінази у мікро- і наномолярному діапазоні концентрацій. Отримані інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та СК2 можуть бути використані в наукових дослідженнях з метою вивчення структури й особливостей функціонування цих ензимів. Крім того, ідентифіковані інгібітори можуть бути основою для розробки лікарських препаратів для лікування хвороб, асоційованих із підвищеною активністю протеїнкіназ FGFR1 та СК2.

**Особистий внесок здобувача.** У процесі виконання дисертаційної роботи автором власноруч виконано органічний синтез, проведено аналіз спектральних досліджень і встановлено структури отриманих сполук. Створено віртуальні бібліотеки хімічних сполук та підготовлено їх для подальшого використання у віртуальному скринінгу. Запропоновано напрями хімічної оптимізації сполук.

Молекулярний докінг та аналіз молекулярних комплексів інгібіторів із протеїнкіназами СК2 і FGFR1 проведено спільно з к.б.н. А.Г. Голубом та А.А. Грищенком. Біологічне тестування сполук *in vitro* здійснено к.б.н. О.П. Кухаренком і к.б.н. О.В. Остринською. Постановку наукових завдань

дослідження та подальшу інтерпретацію отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником д.х.н., проф. С.М. Ярмолюком і к.х.н. В.Г. Бджолою.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на II Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2008), I Всеукраїнському з'їзді «Медична та біологічна інформатика і кібернетика» з міжнародною участю (Київ, Україна, 2010), IV Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 165-й річниці від дня народження І.І. Мечникова (Київ, Україна, 2010), II Міжнародній науково-практичній конференції «Комп'ютерне моделювання в хімії та технологіях і сталий розвиток» (Київ, Україна, 2010), 96 Канадській хімічній конференції та виставці (Квебек, Канада, 2013), XIV Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії (Дніпропетровськ, Україна, 2016).

**Публікації.** За матеріалами роботи опубліковано 12 праць, із них 5 статей у провідних фахових журналах, 1 деклараційний патент на корисну модель і 6 тез наукових доповідей на конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у двох розділах, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Список використаних джерел складається з 111 найменувань. Дисертація містить 27 рисунків, 5 схем, 12 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 160 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури (розділ 1)** присвячений похідним тієно[2,3-*d*]піримідину, які виявляють інгібувальну активність щодо протеїнкіназ і володіють антипроліферативною активністю.

### **Матеріали і методи досліджень (розділ 2).**

Рецепторно-орієнтований гнучкий докінг проводили за допомогою пакету програм AutoDock4.0.1 з використанням кристалічної структури FGFR1 (PDB ID: 3GQI) або кристалічної структури CK2 (PDB ID: 4GRB). Під час підготовки рецептора до докінгу видаляли молекули води, додавали атоми Гідрогену й часткові атомні заряди Гастайгера за допомогою програми AutoDockTools-1.5.6. Ліганди мінімізували і додавали часткові атомні заряди за допомогою програми VEGA ZZ.

Хід реакцій та чистоту синтезованих сполук контролювали методом ТШХ на пластинках «Merck» (силікагель 60, УФ 254) у системі розчинників хлороформ: метанол (9:1). Спектри ЯМР  $^1\text{H}$  і  $^{13}\text{C}$  записані в DMSO- $d_6$  на спектрометрі «Varian VXR 400» при 400 та 100 МГц відповідно. Внутрішній стандарт – тетраметилсилан. Величини хімічних зсувів виміряні з точністю до 0,001 м.ч.

Біохімічне тестування проводили *in vitro* за допомогою радіоактивно міченого  $^{32}\text{P}$ -АТФ. Використовували рекомбінантні протеїни каталітичного домену FGFR1 або CK2 (Upstate/Millipore). Субстратами для цих протеїнкіназ слугували відповідно IGR-IRtide і пептид RRRDDDDSDDD. Суміш розчину  $\text{Mg}^{2+}$ /АТФ із додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}\text{P}$ , готували з розрахунку 0,05 мкКі на пробу. Кінцева

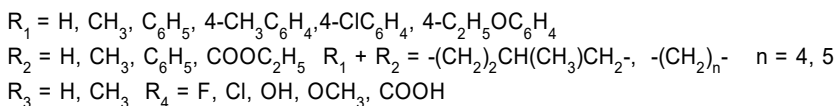
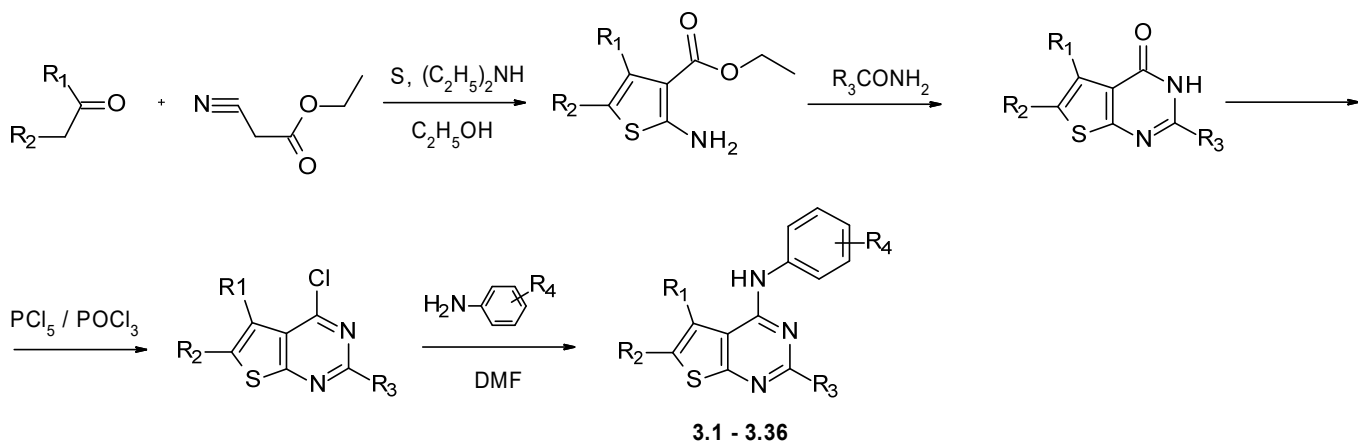
концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Рівень радіоактивного сигналу вимірювали за допомогою сцинтиляційного лічильника PerkinElmer, модель Tri-Carb 2800-TR. Ступінь інгібування протеїнкінази визначали за співвідношенням включення  $^{32}\text{P}$  при додаванні інгібітора та за його відсутності. Для визначення  $\text{IC}_{50}$  було використано низку концентрацій інгібітора й отримано криві залежності активності від концентрації.

### Пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних тієно[2,3-*d*]піримідину (розділ 3).

Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну, що налічувала більше 2000 речовин. За результатами скринінгу відібрали 35 сполук, з яких було синтезовано 32 похідні тієнопіримідину та досліджено їхню інгібувальну активність щодо FGFR1.

Синтез речовин проводили за загальною схемою 1. Спочатку були отримані заміщені 2-аміно-3-карбетокситієфени за реакцією Гевальда, які в подальшому шляхом конденсації із формамідом або ацетамідом були перетворені в тієнопіримідинони. Низку 4-хлоротієно[2,3-*d*]піримідинів отримали внаслідок взаємодії відповідних тієнопіримідинонів із п'ятихлористим фосфором. Кінцеві сполуки **3.1–3.36** одержували в результаті заміщення атома Хлору на відповідні аніліни, амінофеноли й амінобензойні кислоти.

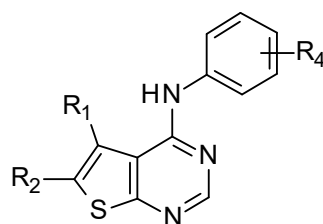
Схема 1



Хімічні структури найбільш активних похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну і дані біохімічного тестування наведено в *табл. 1*.

Серед досліджуваних похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну знайдено 14 сполук, що пригнічували активність протеїнкінази FGFR1 зі значеннями  $\text{IC}_{50}$  у діапазоні від 0,16 до 18,2 мкМ.

Хімічні структури похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну та їхня інгібувальна активність щодо FGFR1



№ сполуки/ замісники	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> , мкМ
<b>3.1</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	2-F	4,3
<b>3.5</b>	H	феніл	2-F	18,2
<b>3.8</b>	H	феніл	4-F	4,3
<b>3.9</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	4-F	3,2
<b>3.18</b>	феніл	H	4-OCH <sub>3</sub>	3,0
<b>3.22</b>	феніл	H	3-OCH <sub>3</sub>	2,5
<b>3.26</b>	феніл	H	4-OH	1,66
<b>3.27</b>	феніл	CH <sub>3</sub>	4-OH	1,25
<b>3.28</b>	H	феніл	4-OH	1,2
<b>3.30</b>	4-етоксифеніл	H	3-OH	12,5
<b>3.31</b>	4-метилфеніл	H	3-OH	0,7
<b>3.32</b>	4-хлорофеніл	H	3-OH	0,5
<b>3.34</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> -	3-OH	0,45
<b>3.35</b>	феніл	H	3-OH	0,18
<b>3.36</b>	H	феніл	3-OH	0,16

Дослідження залежності інгібувальної активності сполук від хімічної структури замісників (рис. 1) виявило, що сполуки з фенільною групою в положеннях 5 або 6 гетероциклу демонструють високу інгібувальну активність стосовно FGFR1, що свідчить про важливу роль ароматичного замісника для взаємодії з протеїнкіназою. В залежності від гідрофобності замісників у *para*-положенні фенілу активність інгібіторів зростала в ряду EtO < Cl < H. Інгібування FGFR1 залежить також від природи замісників та їхнього положення у N-фенільному радикалі, що розташований у положенні 4 тієно[2,3-*d*]піримідинового гетероциклу. Найбільш активними інгібіторами FGFR1 серед досліджуваних тієнопіримідинів із субмікромолярними значеннями IC<sub>50</sub> були похідні з гідроксильною групою. Як видно з табл. 1 і рис. 1, більш вигідним є знаходження гідроксильної групи в положенні 3 фенілу. Такі сполуки на порядок переважали в інгібувальній активності відповідні 4-гідроксипохідні. Це може бути обумовлено тим, що гідроксильна група цих сполук утворює водневий зв'язок в активному центрі FGFR1.

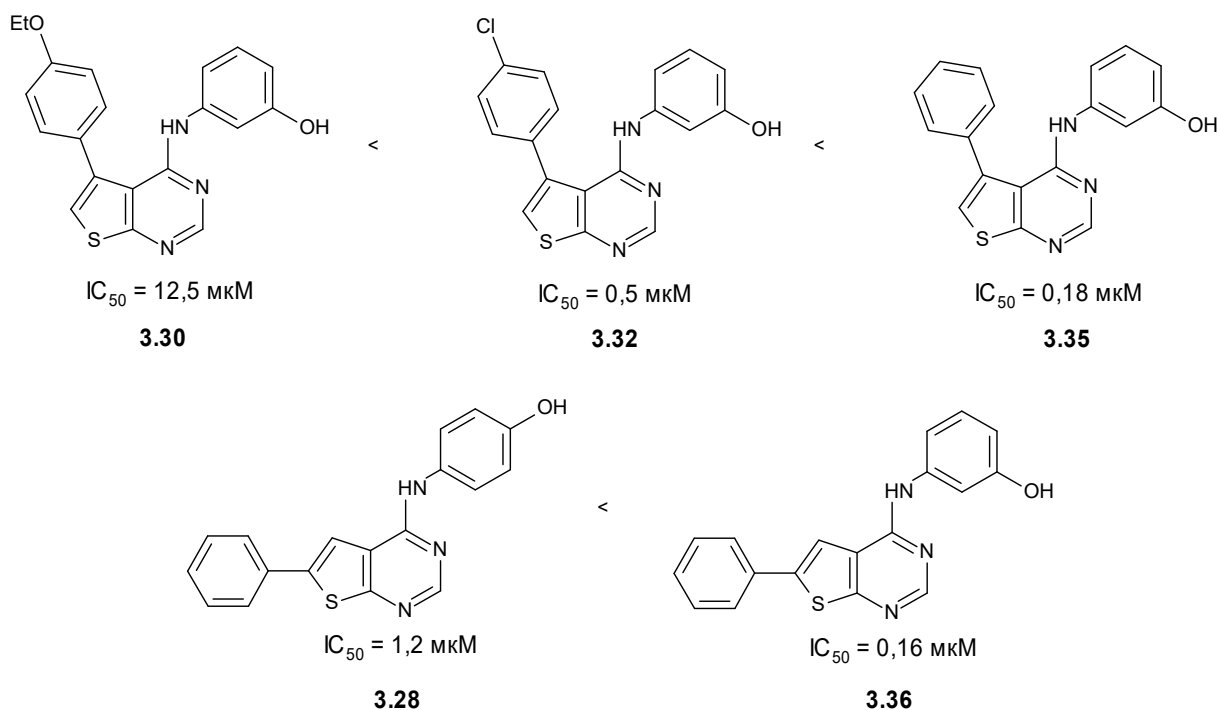


Рис. 1. Залежність інгібувальної активності похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну від хімічної структури їхніх замісників

Найбільш активні інгібітори FGFR1 – сполуки 3-[(5-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]фенол (**3.35** ( $IC_{50} = 0,18 \text{ мкМ}$ )) і 3-[(6-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]фенол (**3.36** ( $IC_{50} = 0,16 \text{ мкМ}$ )) – досліджували на інгібувальну активність щодо шести протеїнкіназ людини, а саме: ASK1, JNK3, Aurora A, ROCK1, HGFR1 та Tie2 (табл. 2).

Таблиця 2

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при додаванні в середовище інкубації інгібітора **3.35** або **3.36** у концентрації 33 мкМ

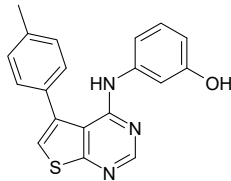
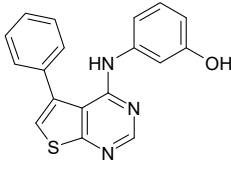
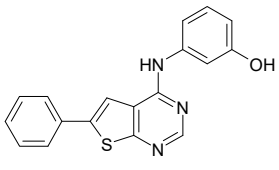
Сполука/Кіназа	FGFR1	Tie-2	HGFR1	Aurora A	JNK3	CK2	ASK1
<b>3.35</b>	3,5	38,7	38,3	43,5	114,5	34,3	58,0
<b>3.36</b>	1,2	35,8	62,1	61,8	81,1	61,4	93,8

Як видно з результатів тестування, похідні N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну демонструють значну селективність щодо протеїнкінази FGFR1.

П'ять похідних (сполуки **3.31**, **3.32**, **3.34**, **3.35** і **3.36**), які мають інгібувальну активність щодо FGFR1 у субмікромольному діапазоні, досліджували на антипроліферативну активність щодо клітинної лінії гострої мієлоїдної лейкемії KG1. Ця пухлинна клітинна лінія характеризується конститутивною активністю FGFR1 та використовується як модельна система для дослідження цитотоксичності інгібіторів FGFR1. За результатами тестування було встановлено, що сполуки **3.35** і **3.36** мають найкращу протипухлинну активність на клітинній лінії KG1 зі значеннями  $IC_{50} = 26,2$  та  $16,2 \text{ мкМ}$  відповідно.



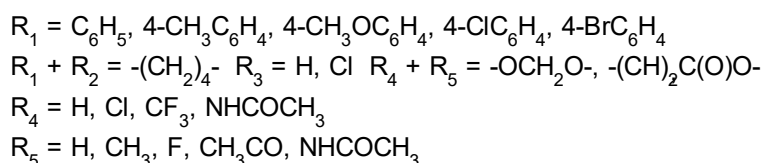
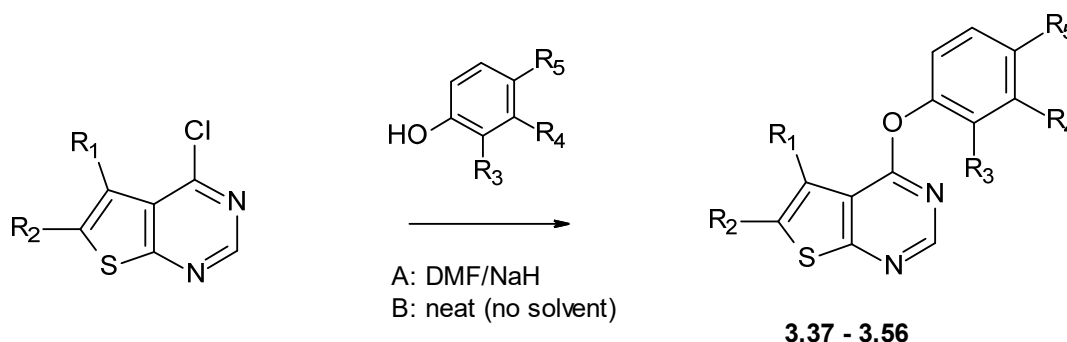
Антипроліферативна активність сполук **3.31**, **3.35** і **3.36**  
щодо клітинної лінії KG1

Хімічна структура	IC <sub>50</sub> , мкМ	Хімічна структура	IC <sub>50</sub> , мкМ	Хімічна структура	IC <sub>50</sub> , мкМ
	33,9		26,2		16,2
<b>3.31</b>		<b>3.35</b>		<b>3.36</b>	

Отже, одержані похідні N-арилтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну можуть бути основою для подальшої хімічної оптимізації з метою розробки вискоєфективних інгібіторів FGFR1 з протипухлинною активністю.

**Пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину.** Наступним етапом досліджень був пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину. У результаті було синтезовано й досліджено на інгібувальну активність щодо протеїнкінази FGFR1 23 похідні 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину. Отримували їх шляхом заміщення атома Хлору в положенні 4 тієно[2,3-*d*]піримідинового гетероциклу вихідної сполуки на відповідні феноли, що відбувалося в розчинах за участю неорганічних основ і під час сплавлення речовин (схема 2).

Схема 2

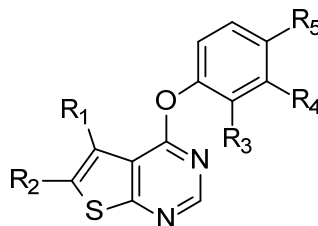


Результати тестування *in vitro* наведено в табл. 4. Знайдено 9 похідних 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину, що пригнічують активність FGFR1 зі значенням

IC<sub>50</sub> у діапазоні концентрацій від 0,9 до 5,6 мкМ. Вивчення залежності інгібувальної активності отриманих сполук від структури показало, що найбільш активні сполуки у положенні 5 гетероциклу мають *para*-заміщений фенільний радикал. Крім того, для прояву інгібувальної активності похідних важливою є присутність акцепторів водневих зв'язків у положеннях 3 і 4 фенольного замісника.

Таблиця 4

Хімічні структури похідних 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину та їхня інгібувальна активність щодо FGFR1

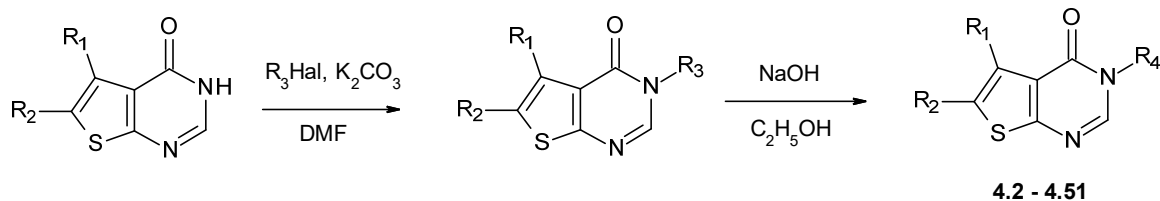


Сполука	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	IC <sub>50</sub> , мкМ
<b>3.37</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		H	H	CH <sub>3</sub>	4,47
<b>3.38</b>	феніл	H	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	2,3
<b>3.39</b>	4-бромфеніл	H	H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)O-		2,45
<b>3.40</b>	4-хлорофеніл	H	H	-OCH <sub>2</sub> O-		2,14
<b>3.41</b>	4-метилфеніл	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	5,0
<b>3.42</b>	4-метилфеніл	H	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	2,5
<b>3.43</b>	феніл	H	H	Cl	F	3,55
<b>3.44</b>	4-метоксифеніл	H	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	5,6
<b>3.45</b>	4-метилфеніл	H	H	-OCH <sub>2</sub> O-		0,9
<b>3.48</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		H	H	F	>30
<b>3.50</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	>30
<b>3.51</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -		H	CF <sub>3</sub>	H	>30
<b>3.54</b>	феніл	H	H	CF <sub>3</sub>	H	>30
<b>3.56</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		H	NHCOCH <sub>3</sub>	H	>30

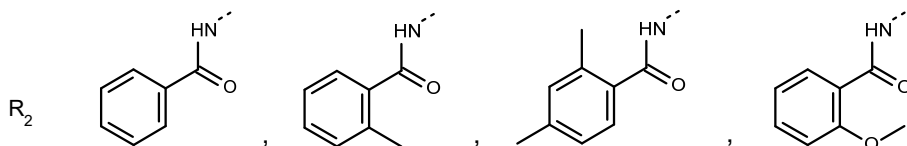
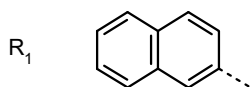
Найбільш активні сполуки **3.40** і **3.45** містили метилендіоксифенільний замісник та інгібували FGFR1 зі значеннями IC<sub>50</sub>, рівними 2,14 і 0,9 мкМ відповідно.

#### Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних тієно[2,3-*d*]піримідину (розділ 4).

Оскільки інгібувальна активність похідних тієно[2,3-*d*]піримідину, заміщених по положенню 3 гетероциклу, мало досліджена, було вирішено, використовуючи методологію комбінаторного синтезу, отримати 50 карбоксилвмісних похідних тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ону.

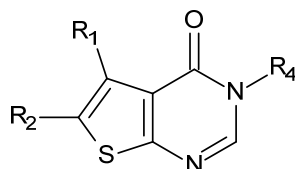


$R_1 = \text{H, CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5, 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4, 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4, 4\text{-FC}_6\text{H}_4, 4\text{-ClC}_6\text{H}_4, 4\text{-BrC}_6\text{H}_4, 3,4\text{-(CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3, 3,4\text{-(CH}_3\text{O)}_2\text{C}_6\text{H}_3, 4\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4, 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4, 4\text{-C}_3\text{H}_7\text{OC}_6\text{H}_4$   
 $R_2 = \text{H, CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{COOCH(CH}_3)_2, \text{CONH}_2$      $R_1 + R_2 = \text{-(CH}_2)_3\text{-, -(CH}_2)_4\text{-, -(CH}_2)_2\text{CH(CH}_3\text{)CH}_2\text{-, -(CH}_2)_2\text{CH((C)CH}_3)_3\text{)CH}_2\text{-}$   
 $R_3 = \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5, \text{CH(CH}_3\text{)COOC}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOC}_2\text{H}_5$   
 $R_4 = \text{CH}_2\text{COOH, CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH, CH(CH}_3\text{)COOH}$      $\text{Hal} = \text{Cl, Br}$



Таблиця 5

Хімічні структури похідних тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ону та їхня інгібувальна активність щодо протеїнкінази СК2



Сполука	$R_1$	$R_2$	$R_4$	$\text{IC}_{50}$ , мкМ
<b>4.2</b>	4-етилфеніл	H	$\text{CH}_2\text{COOH}$	15–20
<b>4.3</b>	4-бромфеніл	H	$\text{CH}_2\text{COOH}$	15–20
<b>4.4</b>	4-етоксифеніл	H	$\text{CH}_2\text{COOH}$	15–20
<b>4.5</b>	4-бромфеніл	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2\text{COOH}$	15–20
<b>4.6</b>	$\text{-(CH}_2)_3\text{-}$		$\text{CH}_2\text{COOH}$	3,5
<b>4.7</b>	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	15–20
<b>4.8</b>	3,4-диметилфеніл	$\text{CH}_3$	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	15–20
<b>4.9</b>	4-метилфеніл	$\text{CH}_3$	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	15–20
<b>4.10</b>	4-пропоксифеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	15–20
<b>4.11</b>	феніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	10,0
<b>4.12</b>	4-хлорофеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	5,2
<b>4.13</b>	4-метилфеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	5,0
<b>4.14</b>	3,4-диметилфеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	4,7
<b>4.15</b>	4-метоксифеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	2,9
<b>4.16</b>	4-етилфеніл	H	$4\text{-COOHNC}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	2,5

Усі сполуки одержували шляхом алкілування вихідних тієнопіримідинонів реагентами, що мають у своїй структурі естерну групу, гідролізом якої й отримували відповідні карбонові кислоти (схема 3).

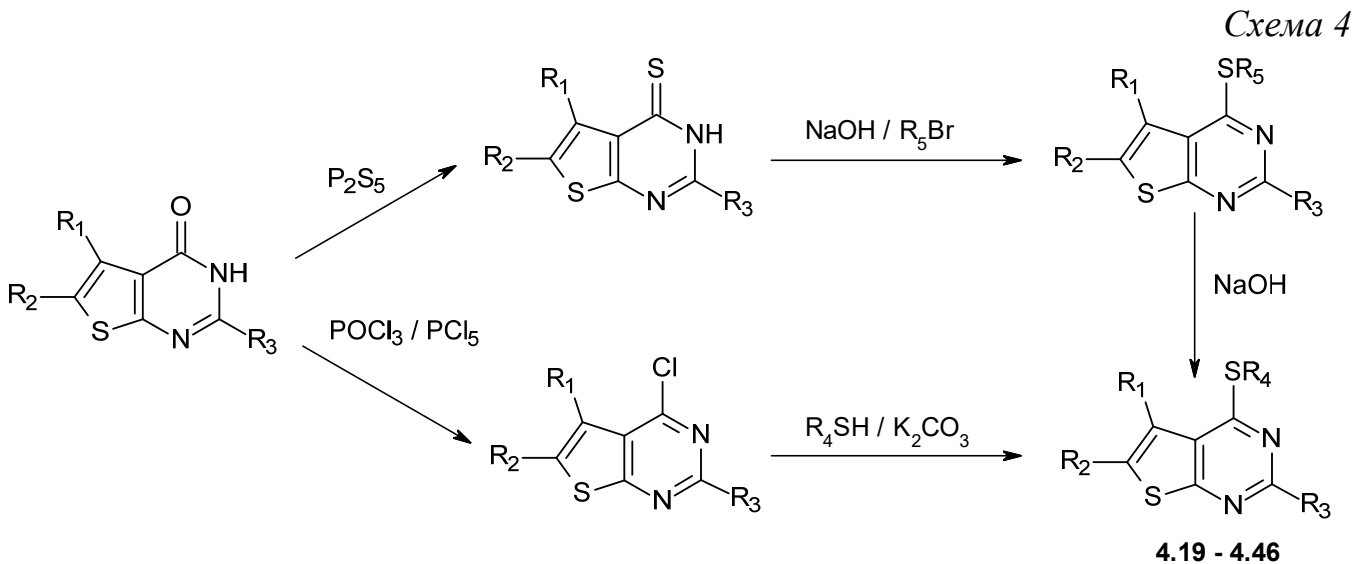
Результати біологічного тестування показали, що 15 із 50 речовин у концентрації 20 мкМ пригнічували активність СК2 більш ніж на 50 % (значення  $IC_{50}$  знаходилися в діапазоні від 2,5 до 20 мкМ).

Згідно з наведеними в табл. 5 даними, сполуки з фенільною групою в положенні 5 гетероциклу демонстрували найвищу інгібувальну активність. Показано, що їхня активність збільшується в залежності від зміни замісника в положенні 4 радикала  $R_1$ . Це спостерігається в ряду  $H < Cl \leq Me \leq 3,4-dMe < MeO \leq Et$ . Заміна карбоксилвмісного фрагмента в положенні 3 гетероциклу з аліфатичного на ароматичний суттєво збільшувала активність інгібіторів. Найбільш активною була сполука **4.16**, значення  $IC_{50}$  якої складає 2,5 мкМ.

### Синтез похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти і дослідження їхньої інгібувальної активності щодо протеїнкінази СК2.

Завданням подальших досліджень був пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти, оскільки методи одержання цих сполук вивчені недостатньо, а дослідження, пов'язані з ними, майже не представлені в науковій літературі.

Було синтезовано 28 похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти згідно зі схемою 4.



$R_1 = H, CH_3, C_6H_5, 4-CH_3C_6H_4, 3,4-(CH_3)_2C_6H_3, 4-FC_6H_4, 4-ClC_6H_4, 4-BrC_6H_4, 4-C_2H_5OC_6H_4$

$R_2 = H, CH_3, C_6H_5$      $R_1 + R_2 = -(CH_2)_2CH(CH_3)CH_2-$ ,  $-(CH_2)_4-$      $R_3 = H, CH_3$

$R_4 = CH_2COOH, CH(CH_3)COOH, CH(C_2H_5)COOH, (CH_2)_2COOH$

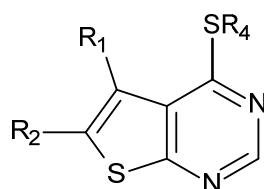
$CH_2C_6H_4COOH$

$R_5 = CH_2COOC_2H_5, CH(CH_3)COOC_2H_5, CH(C_2H_5)COOC_2H_5, CH_2C_6H_4COOC_2H_5$

Частину похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонових кислот отримували шляхом алкілування відповідних тієно[2,3-*d*]піримідин-4(3*H*)-тіонів естерами галогенкарбонових кислот із наступним гідролізом отриманих проміжних продуктів. Для решти сполук було використано інший метод синтезу, який полягав у взаємодії 4-хлоротієно[2,3-*d*]піримідинів і тіокарбонових кислот. Усі 28 похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти досліджено на інгібувальну активність щодо СК2. Дані тестування наведено в *табл. 6*. Результати експериментів продемонстрували, що 21 сполука цього класу пригнічує активність СК2 більш ніж на 50 % у діапазоні концентрацій від 0,1 до 33 мкМ.

Таблиця 6

Хімічні структури похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти та їхня інгібувальна активність щодо протеїнкінази СК2



Сполука	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (мкМ)
<b>4.19</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		CH(CH <sub>3</sub> )COOH	17,0
<b>4.23</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -		CH <sub>2</sub> COOH	1,78
<b>4.26</b>	феніл	H	CH(CH <sub>3</sub> )COOH	23,0
<b>4.27</b>	4-хлорофеніл	H	CH <sub>2</sub> COOH	32,0
<b>4.28</b>	4-хлорофеніл	H	CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )COOH	>33
<b>4.30</b>	4-метилфеніл	H	CH(CH <sub>3</sub> )COOH	31,0
<b>4.31</b>	4-метилфеніл	H	CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )COOH	>33
<b>4.32</b>	4-бромофеніл	H	CH <sub>2</sub> COOH	14,0
<b>4.34</b>	4-хлорофеніл	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	0,175
<b>4.40</b>	4-метилфеніл	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	0,1
<b>4.41</b>	3,4-диметилфеніл	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	0,175
<b>4.43</b>	4-етоксифеніл	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	0,125
<b>4.44</b>	4-флуорофеніл	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	1,2
<b>4.45</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	7,0

Для синтезованих похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти досліджено залежність інгібувальної активності від хімічної структури замісників у положеннях 4 і 5 гетероциклу (*рис. 2*). Було встановлено, що структура замісника R<sub>4</sub> найбільше впливає на інгібувальну активність сполук щодо протеїнкінази СК2. При зменшенні розгалуження та при подовженні ланцюга на одну метиленову групу спостерігається ріст активності інгібіторів. Замісники у *para*-положенні радикала R<sub>1</sub> зумовлюють збільшення активності сполук у ряду 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> < 3,4-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> = 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> < 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> < 4-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.

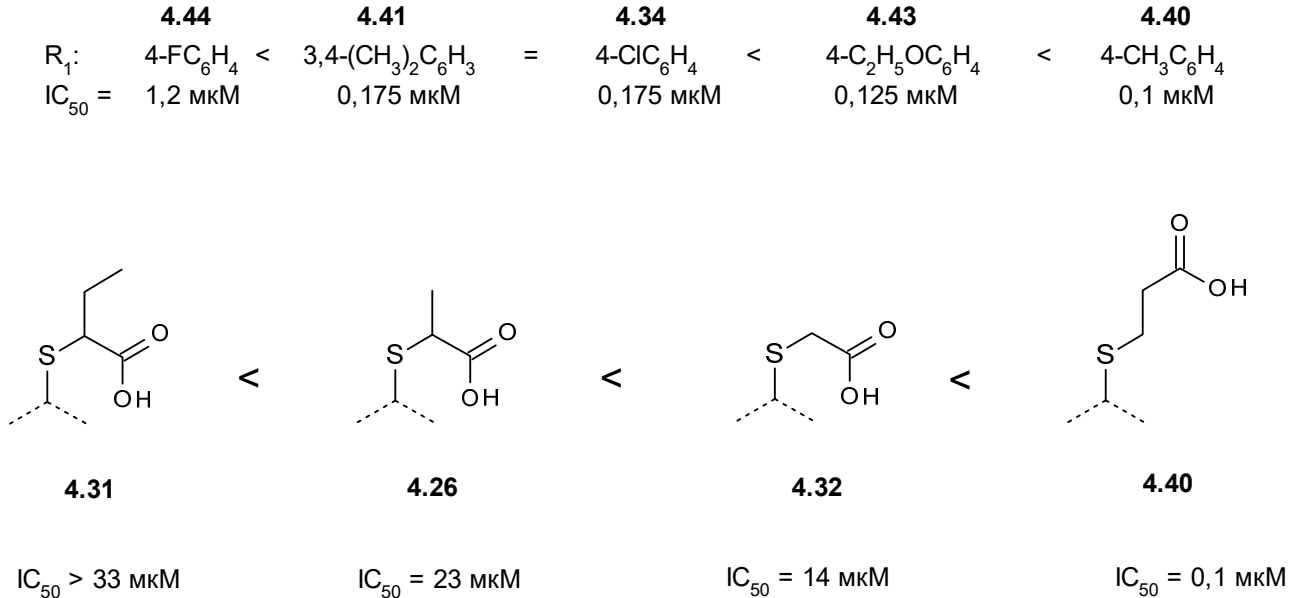
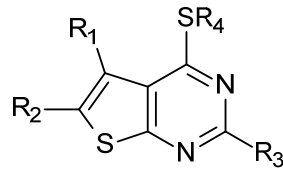


Рис. 2. Залежність інгібувальної активності похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти від хімічної структури замісників

Результати кінетичних експериментів продемонстрували, що найбільш активна сполука – 3-{[5-(4-метилфеніл)тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл]тіо}пропанова кислота (**4.40**) (IC<sub>50</sub> = 0,1 мкМ) – є АТФ-конкурентним інгібітором протеїнкінази СК2 (рис. 3, а). Максимальну швидкість реакції (v<sub>max</sub>) і константу Міхаеліса (K<sub>m</sub>) визначали графічно методом подвійних обернених величин Лайнуївера-Берка. Із графіка видно, що сполука знижує спорідненість ензиму до субстрату і не впливає на v<sub>max</sub>. Константа інгібування становить 40 нМ.

З метою передбачення міжмолекулярних взаємодій, які можуть бути важливими для інгібувальної активності тієнопіримідинів щодо протеїнкінази СК2, було проведено дослідження комплексів похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені СК2 за допомогою молекулярного докінгу. Було встановлено, що для формування ліганд-протеїнових комплексів ключовими є ван-дер-ваальсові взаємодії тієно[2,3-*d*]піримідинового гетероциклу й ароматичного замісника в 5 положенні із гідрофобними амінокислотними залишками Leu45, Val53, Val66, Val116 та Ile174 в активному сайті протеїнкінази СК2 (рис. 4).

Крім того, ці сполуки утворюють три міжмолекулярні водневі зв'язки в АТФ-зв'язувальній кишені протеїнкінази СК2. Один із водневих зв'язків формується з Val116, що знаходиться в шарнірній ділянці СК2. Два інші водневі зв'язки утворюються за участі замісника в 4 положенні з бічним ланцюгом Lys68 та

основним ланцюгом Asp175, які локалізовані в гідрофобній кишені I активного сайту.

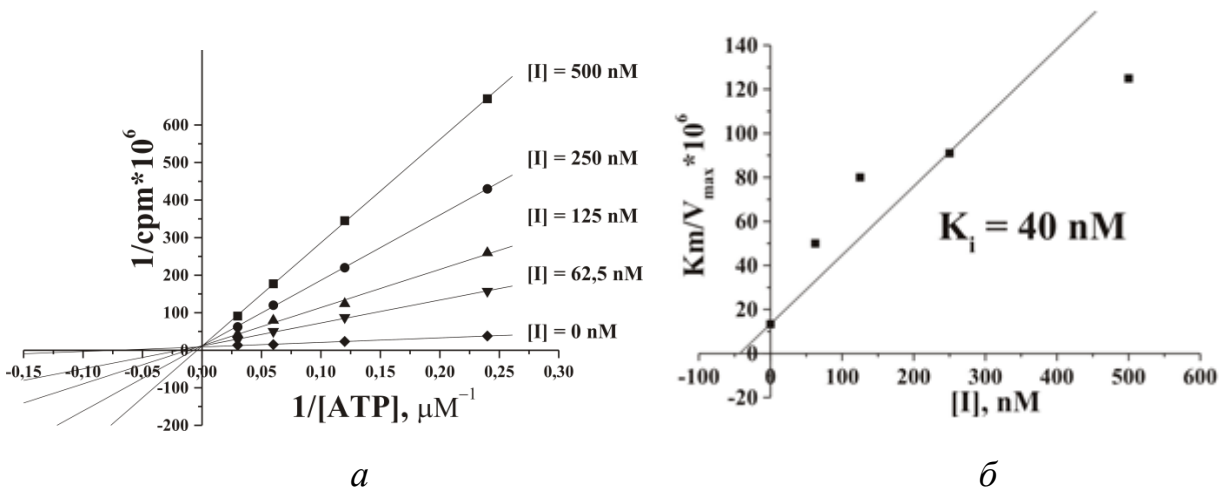


Рис. 3. Кінетичний аналіз утворення комплексу протеїнкінази СК2 із сполукою **4.40**: *a* – визначення  $K_m$  і  $v_{\text{max}}$  в обернених координатах Лайнуївера-Берка. Концентрацію інгібітора змінювали від 0 до 500 нМ; *б* – розрахунок значення  $K_i$

Найбільш перспективні інгібітори **4.40** і **4.43** досліджували також на інгібувальну активність щодо чотирьох серин/треонінових протеїнкіназ (ASK1, JNK3, Aurora A та ROCK1) і трьох тирозинових протеїнкіназ (FGFR1, HGFR1 та Tie2).

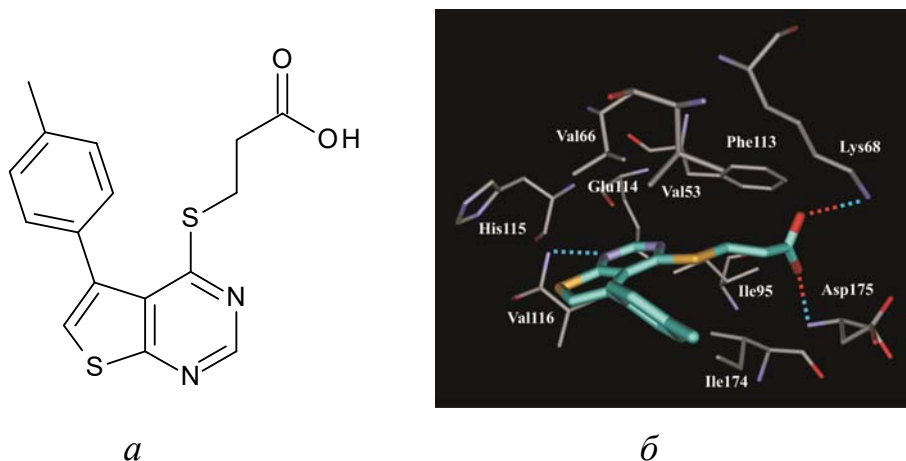


Рис. 4. Хімічна структура сполуки **4.40** (*a*) і спосіб зв'язування її з активним центром протеїнкінази СК2. Водневі зв'язки показано пунктирними лініями (*б*)

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при додаванні в середовище інкубації інгібітора **4.40** або **4.43** в концентрації 10 мкМ

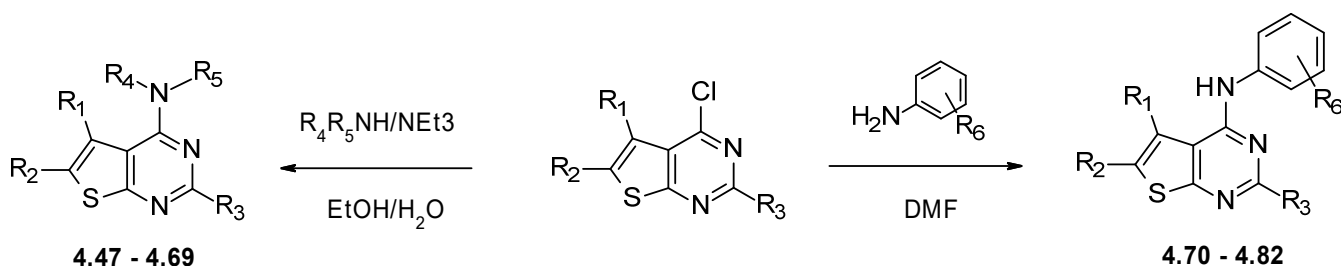
Протеїнкіназа	Залишкова активність протеїнкіназ (%) за присутності 10 мкМ інгібітора <b>4.40</b>	Залишкова активність протеїнкіназ (%) за присутності 10 мкМ інгібітора <b>4.43</b>
CK2	0,72	0,86
JNK3	104	94
ROCK1	126	115
Tie2	70	76
ASK1	92	100
Aurora A	23	48
HGFR1	114	115
FGFR1	92	99

Як видно з *табл. 7*, досліджувані сполуки виявляють селективність щодо протеїнкінази CK2.

#### Дизайн і синтез інгібіторів протеїнкінази CK2 на основі похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину.

З метою отримання нових інгібіторів CK2 було синтезовано аналоги активних похідних (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбоксильної кислоти з атомом Нітрогену в положенні 4 гетероциклу замість атома Сульфуру. Нові сполуки повинні були б демонструвати кращу метаболічну стабільність. Усього було одержано 18 похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину (*схема 5*).

Схема 5



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5, 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4, 3,4\text{-(CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3, 4\text{-FC}_6\text{H}_4, 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$

$\text{R}_2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5, \text{COOH}, \text{COOC}_2\text{H}_5$   $\text{R}_1 + \text{R}_2 = \text{-(CH}_2)_2\text{CH(CH}_3)_3\text{CH}_2\text{-}, \text{-(CH}_2)_4\text{-}$

$\text{R}_3 = \text{H}, \text{CH}_3$   $\text{R}_4 = \text{CH}_2\text{COOH}, (\text{CH}_2)_2\text{COOH}, \text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CONH}_2$   $\text{R}_5 = \text{H}$

$\text{R}_4 + \text{R}_5 = \text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{COOH})\text{-}, \text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{-}, \text{-(CH}_2)_5\text{-}, \text{-(CH}_2)_2\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{-}$

$\text{R}_6 = \text{COOH}$



Отримані сполуки (4.47–4.69) було досліджено на інгібувальну активність щодо протеїнкінази СК2. Однак за результатами тестування *in vitro* було встановлено, що лише дві з 18 сполук – N-(5,6,7,8-тетрагідробензотієно[2,3-*d*]-піримідин-4-іл)-β-аланіну гідрохлорид і N-(7-метил-5,6,7,8-тетрагідробензотієно[2,3-*d*]-піримідин-4-іл)-β-аланіну гідрохлорид – виявляли інгібувальну активність щодо протеїнкінази СК2 зі значеннями IC<sub>50</sub> = 9,5 та 16 мкМ відповідно.

Щоб пояснити, чому надзвичайно близькі аналоги раніше ідентифікованих ефективних інгібіторів СК2 не виявили активності, було досліджено комплекси цих речовин із протеїнкіназою СК2. Порівняння комплексів похідних тієно[2,3-*d*]-піримідин-4-ілію)карбонової кислоти в АТФ-акцепторному сайті СК2 з відповідними комплексами 4-амінотієно[2,3-*d*]-піримідину не дало змоги пояснити втрату активності.

Ймовірною причиною такої втрати активності є формування міцного внутрішньомолекулярного водневого зв'язку в сполуці 4.53 між донором водневого зв'язку і карбоксильною групою (рис. 5), що призводить до зменшення загальної довжини ліганду та нездатності формувати високоафінні комплекси із СК2 у зв'язку з втратою міжмолекулярних водневих зв'язків із Lys68 і Asp175.

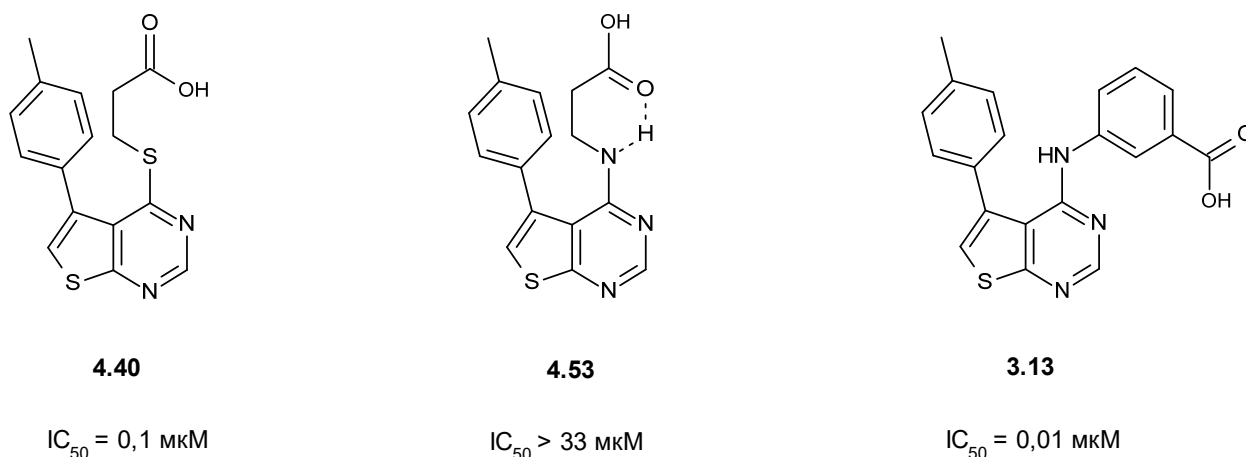
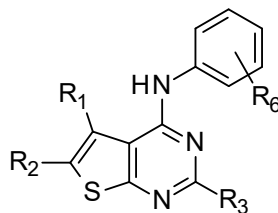


Рис. 5. Хімічні структури сполук 4.40, 4.53 і 3.13

Грунтуючись на результатах, одержаних для першої низки досліджуваних сполук, для подальшого дослідження були взяті раніше отримані сполуки 3.13, 3.14 та 3.15, а також синтезована наступна низка речовин (4.70–4.82) (схема 5). У цих сполуках карбоксильна група знаходиться на оптимальній відстані від гетероциклічного кільця для формування водневих зв'язків з амінокислотними залишками в глибині АТФ-акцепторного сайту протеїнкінази СК2, проте вона не здатна до утворення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку. Дані тестування цих похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]-піримідину наведено в табл. 8.

Хімічні структури похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину після хімічної оптимізації та їхня інгібувальна активність щодо СК2



Сполука	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>6</sub>	IC <sub>50</sub> , мкМ
<b>3.13</b>	4-метилфеніл	H	H	3-COОН	0,01
<b>3.14</b>	CH <sub>3</sub>	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	3-COОН	6,5
<b>3.15</b>	4-метилфеніл	H	H	4-COОН	0,65
<b>4.70</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> -		H	4-COОН	>33
<b>4.71</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	3-COОН	3,8
<b>4.72</b>	H	феніл	H	3-COОН	0,26
<b>4.73</b>	феніл	H	H	4-COОН	1,1
<b>4.74</b>	феніл	H	H	3-COОН	0,065
<b>4.75</b>	4-хлорофеніл	H	H	4-COОН	0,83
<b>4.76</b>	H	феніл	CH <sub>3</sub>	4-COОН	>33
<b>4.77</b>	H	феніл	CH <sub>3</sub>	3-COОН	1,5
<b>4.78</b>	феніл	CH <sub>3</sub>	H	4-COОН	1,5
<b>4.80</b>	феніл	CH <sub>3</sub>	H	3-COОН	0,008
<b>4.82</b>	CH <sub>3</sub>	COОН	H	3-COОН	>33

Було встановлено, що більше половини синтезованих сполук інгібують активність СК2 в діапазоні від 0,008 до 10 мкМ. До найактивніших інгібіторів СК2 належать сполуки 3-{[5-(4-метилфеніл)тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл]аміно}бензойна кислота (**3.13**, IC<sub>50</sub> = 0,01 мкМ), 3-(5-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)бензойна кислота (**4.74**, IC<sub>50</sub> = 0,065 мкМ) і 3-(6-метил-5-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)бензойна кислота (**4.80**, IC<sub>50</sub> = 0,008 мкМ).

Як і передбачалося, заміна аліфатичного ланцюга в структурі ліганду на ароматичний фрагмент приводить до покращення інгібувальної активності щодо СК2.

Хімічні структури замісників у положеннях 5 та 6 гетероциклу меншим чином впливають на інгібувальну активність похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину щодо протеїнкінази СК2. Замісники в *para*-положенні фенільного радикала, розміщеного в положенні 5 гетероциклу, обумовлюють збільшення активності в ряду C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> < 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> < 4-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.

Три найбільш перспективні інгібітори СК2 – сполуки **3.13**, **4.74** і **4.80** – досліджували на інгібувальну активність щодо семи інших протеїнкіназ, а саме: FGFR1, Tie-2, HGFR1, Aurora A, JNK3, ROCK1 і ASK1.

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при додаванні в середовище інкубації інгібіторів **3.13**, **4.74** або **4.80** в концентрації 10 мкМ

Сполука/Кіназа	CK2	FGFR1	Tie-2	HGFR1	Aurora A	JNK3	ROCK1	ASK1
<b>3.13</b>	1,14	80,5	109	53,7	36,2	85,7	105,8	122
<b>4.74</b>	1,51	78,9	119,7	71,5	38,9	89,5	88,6	122
<b>4.80</b>	0,91	73,9	84,2	87,2	15,3	70,3	101,5	112

Як видно з *табл. 9*, досліджувані сполуки є селективними інгібіторами CK2.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, біохімічного тестування і хімічної оптимізації розроблено нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та CK2 на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину. Вивчено способи зв'язування похідних цього класу з АТФ-акцепторними сайтами ферментів. Встановлено залежність інгібувальної дії інгібіторів від їхньої хімічної структури.

1. Синтезовано 33 нових похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну, для яких визначено інгібувальну активність щодо протеїнкінази FGFR1. Встановлено, що наявність гідроксильної групи в положенні 3 N-фенільного кільця суттєво збільшує інгібувальну активність. 23 сполуки продемонстрували значення IC<sub>50</sub> у межах від 18,2 до 0,16 мкМ.

2. Вивчено залежність інгібувальної активності 23 синтезованих похідних 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину щодо протеїнкінази FGFR1 та виявлено, що інгібувальну активність сполук збільшують акцептори водневих зв'язків у положеннях 3 і 4 фенольного замісника. Значення IC<sub>50</sub> найактивніших сполук знаходиться в межах 5,6–0,9 мкМ.

3. Оптимізовано методики комбінаторного синтезу й одержано серію із 50 3-заміщених похідних тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ону. Показано, що серед них 15 сполук пригнічують активність CK2 зі значенням IC<sub>50</sub> у діапазоні концентрацій від 20 до 2,5 мкМ. Встановлено, що інгібувальна активність залежить від хімічної природи замісника у *пара*-положенні фенольного радикалу і збільшується в ряду H < Cl ≤ Me ≤ 3,4-dMe < MeO ≤ Et.

4. Отримано нові похідні (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти, серед яких 21 сполука виявила інгібувальні властивості щодо протеїнкінази CK2 (IC<sub>50</sub> = 30–0,1 мкМ). У результаті проведених кінетичних досліджень встановлено, що похідні (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти є АТФ-конкурентними інгібіторами CK2.

5. У результаті проведення хімічної оптимізації синтезовано 39 нових сполук, серед яких ідентифіковано 7 високоактивних інгібіторів протеїнкінази CK2

(IC<sub>50</sub> = 0,83–0,008 мкМ).

6. Розроблено 17 нових інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 і СК2, величини IC<sub>50</sub> яких знаходилися в межах від 900 до 8 нМ. Серед них найактивнішим інгібітором FGFR1 є 3-[(6-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]фенол із IC<sub>50</sub> = 160 нМ, а найактивнішим інгібітором СК2 – 3-{[6-метил-5-(4-метилфеніл)тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл]аміно}бензойна кислота із IC<sub>50</sub> = 8 нМ.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Gryshchenko A.A. Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-amines as inhibitors of FGFR1 / A.A. Gryshchenko, V.G. Bdzhola, A.O. Balanda, N.V. Briukhovetska, I.M. Kotey, A.G. Golub, T.P. Ruban, L.L. Lukash, S.M. Yarmoluk // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – 23, № 9. – P. 2287–2293.
2. Kotey I.M. Identification of 4-methoxythieno[2,3-*d*]pyrimidines as FGFR1 inhibitors / I.M. Kotey, M.V. Protopopov, S.A. Starosyla, A.O. Balanda, L.V. Pletnova, A.O. Prykhod'ko, V.G. Bdzhola, S.M. Yarmoluk // *Biopolym. Cell.* – 2019. – 35. – P. 152–162.
3. Котей І.М. 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. Ярмолук // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2008. – С. 3–9.
4. Golub A.G. Synthesis and biological evaluation of substituted (thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acids as inhibitors of human protein kinase CK2 / A.G. Golub, V.G. Bdzhola, N.V. Briukhovetska, A.O. Balanda, O.P. Kukharenko, I.M. Kotey, O.V. Ostrynska, S.M. Yarmoluk // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – 46. – P. 870–876.
5. Пат. на корисну модель 86041 UA, МПК А61Р 35/00 (2013.01) Низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази СК2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-*d*]піримідинового гетероциклу / О.В. Остринська, А.О. Баланда, В.Г. Бджола, І.М. Котей, О.П. Кухаренко, С.М. Ярмолук; заявник та власник Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України. – № u201307516; заявл. 13.06.2013; опубл. 10.12.2013, Бюл. № 23, 2013 р.
6. Ostrynska O.V. Design and synthesis of novel protein kinase CK2 inhibitors on the base of 4-aminothieno[2,3-*d*]pyrimidines / O.V. Ostrynska, A.O. Balanda, V.G. Bdzhola, A.G. Golub, I.M. Kotey, O.P. Kukharenko, A.A. Gryshchenko, N.V. Briukhovetska, S.M. Yarmoluk // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – 115. – P. 148–160.
7. Kotey I.M. Thienopyrimidinone derivatives as a new class of protein kinase CK2 inhibitors / I.M. Kotey, A.O. Balanda, S.S. Lukashov, S.M. Yarmoluk // II Конференція молодих вчених, присвячена 35-річчю Інституту молекулярної

біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2008): *Biopolym. Cell.* – 2008. – 24, № 5. – Р. 356.

8. Остринська О.В. Розробка нових інгібіторів СК2 за допомогою методів комп'ютерного моделювання, комбінаторної хімії та тестів *in vitro* / О.В. Остринська, О.П. Кухаренко, В.Г. Бджола, А.О. Баланда, І.М. Котей, Н.В. Брюховецька, С.М. Ярмолюк // II Міжнародна науково-практична конференція «Комп'ютерне моделювання в хімії та технологіях і сталий розвиток». – Київ. – 2010. – С. 59–60.
9. Ostrynska O.V. Search and design of novel protein kinase CK2 inhibitors / O.V. Ostrynska, O.P. Kukharenko, V.G. Bdzhola, A.O. Balanda, I.M. Kotey, N.V. Briukhovetska, S.M. Yarmoluk // IV Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 165-й річниці від дня народження І.І. Мечникова (18–19 травня 2010 року, Київ, Україна): *Biopolym. Cell.* – 2010. – 26, № 5. – Р. 418.
10. Остринська О.В. Застосування методів віртуального скринінгу для розробки біологічно активних сполук / О.В. Остринська, О.П. Кухаренко, А.О. Баланда, І.М. Котей, Н.В. Брюховецька, В.Г. Бджола, С.М. Ярмолюк // I Всеукраїнський з'їзд «Медична та біологічна інформатика і кібернетика» з міжнародною участю. – Київ. – 2010. – С. 188.
11. Golub A.G. Rational design of novel compounds inhibiting protein kinase CK2 / A.G. Golub, Y.V. Bilokin, S.M. Yarmoluk, V.G. Bdzhola, V.M. Sapelkin, A.O. Prykhod'ko, O.P. Kukharenko, O.V. Ostrynska, N.V. Briukhovetska, I.M. Kotey, A.O. Balanda // Abstract of 96<sup>th</sup> Canadian Chemistry Conference and Exhibition. – Quebec City, Canada – 2013. – Р. 316.
12. Пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 4-аміно-тієно[2,3-*d*]піримідину / І.М. Котей, М.В. Протопопов, А.О. Баланда, В.Г. Бджола, С.М. Ярмолюк // XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії. – Дніпропетровськ. – 2016. – С. 40.

## АНОТАЦІЯ

**Котей І.М.** Нові інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та СК2 на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 02.00.10 – «Біоорганічна хімія». – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена пошуку низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 і СК2 на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину.

Синтезовано й досліджено на інгібувальну активність щодо FGFR1 два класи сполук – похідні N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну та 4-фенокситієно[2,3-*d*]піримідину. Найперспективніші інгібітори FGFR1

пригнічують активність протеїнкінази зі значеннями  $IC_{50} = 0,16$  і  $0,18$  мкМ і мають антипроліферативну активність стосовно пухлинної клітинної лінії людини KG1 з величинами  $IC_{50} = 16,2$  та  $26,2$  мкМ відповідно.

Ідентифіковано три нові класи інгібіторів протеїнкінази CK2 – похідні тієно[2,3-*d*]піримідину, (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтіо)карбонової кислоти і 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину. Із застосуванням методу гнучкого докінгу для інгібіторів запропоновано моделі взаємодії з активним центром CK2 та встановлено залежність активності від хімічної структури замісників. Найперспективніший інгібітор – 3-{[6-метил-5-(4-метилфеніл)тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл]аміно}бензойна кислота – пригнічує активність CK2 зі значенням  $IC_{50} = 8$  нМ, що є близьким до відомого інгібітора CX-4945, який проходить клінічні випробування ( $IC_{50} = 1$  нМ).

**Ключові слова:** протеїнкіназа FGFR1, CK2, тієно[2,3-*d*]піримідин, інгібітор.

## SUMMARY

**Kotey I.M.** New inhibitors of protein kinases FGFR1 and CK2 based on the derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidine. – Qualitification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of a Candidate of Chemical Sciences (Doctor of Philosophy) speciality 02.00.10 – «Bioorganic chemistry». – V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Thieno[2,3-*d*]pyrimidine is very promising scaffold for medicinal chemistry. The derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidine possess anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, neuroprotective activities, etc. Anticancer activity is associated with various mechanisms of action, including inhibition of protein kinases, inhibition of tubulin polymerization and with non-specific antiproliferative activity.

A number of experimental investigations demonstrate that protein kinases FGFR1 and CK2 are overexpressed and/or overactivated in various types of tumor, including lung cancer, head and neck cancer, breast cancer, prostate cancer, myeloproliferative disorders, glioblastoma, melanoma, renal carcinoma et al.

Taking into account significant role of protein kinases FGFR1 and CK2 in tumorigenesis, these protein kinases are promising molecular targets for cancer treatment. However, for the best of our knowledge none of small-molecular inhibitors based on thieno[2,3-*d*]pyrimidine scaffold, which is characterized by significant anticancer potential, were reported in scientific literature. It is ground for the search of inhibitors for protein kinases FGFR1 and CK2 among the derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidine.

In order to discover novel FGFR1 inhibitors we have performed molecular docking of chemical library containing about 2000 ligands and selected 35 compounds for *in vitro* testing. We have synthesized 32 derivatives of N-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine and tested for inhibitory activity toward FGFR1. Among these compounds we have identified 23 inhibitors of FGFR1 with  $IC_{50}$  values in the range from  $0,16$   $\mu$ M to  $18,2$   $\mu$ M. It was established that hydroxyl group in 3-position of N-phenyl ring is very important for inhibitory activity toward FGFR1. Three the most active compounds were investigated for

antiproliferative activity in human tumor cell line KG1 ( $IC_{50} = 16,2\text{--}33,9 \mu\text{M}$ ).

Further, we synthesized 23 derivatives of 4-phenoxythieno[2,3-*d*]pyrimidine and tested for inhibitory activity toward FGFR1. Among them we identified 9 compounds inhibiting FGFR1 with  $IC_{50}$  values in the range from 0,9  $\mu\text{M}$  to 5,6  $\mu\text{M}$ . It was revealed that inhibitory activity of compounds from this chemical class depends on chemical structure of substituents in 5-position of thieno[2,3-*d*]pyrimidine heterocycle and the order of potency for the substituent in this position could be proposed as following: 4-methoxyphenyl < 4-chlorophenyl < 4-methylphenyl.

In order to identify the inhibitors of protein kinase CK2 we have synthesized 50 derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidinone. Among these compounds we have found 15 inhibitors of CK2 with  $IC_{50}$  values in the range from 2,5  $\mu\text{M}$  to 20  $\mu\text{M}$ . The most efficient inhibitors contain phenyl in 5-position of heterocycle. It was revealed that the chemical structure of para-substituted of phenyl has influence on inhibitory activity toward CK2 and the order of potency for the substituent in this position could be proposed as following: H < Cl  $\leq$  Me  $\leq$  3,4-dMe < MeO  $\leq$  Et.

Since a number of efficient CK2 inhibitors contain carboxyl group, we have synthesized 28 derivatives of (thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acid and tested for inhibitory activity toward CK2. Among these compounds we have identified 21 inhibitors of protein kinase CK2 with  $IC_{50}$  values in the range from 0,1  $\mu\text{M}$  to 30  $\mu\text{M}$ . Kinetic studies demonstrated that derivatives of (thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acid are ATP-competitive inhibitors of protein kinase CK2. It was revealed that the inhibitory activity of compounds depends on chemical structure of substituents in 4-position of heterocycle and increases in the following order:  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} = \text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{COOH} < \text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH} < \text{CH}_2\text{COOH} < \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ . The order of potency for the substituent in 5-position of heterocycle could be proposed as following: 4- $\text{FC}_6\text{H}_4 < 3,4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_3 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4 < 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_4 < 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$ .

At the next step we have synthesized 18 derivatives of 4-aminothieno[2,3-*d*]pyrimidine and studied for inhibitory activity toward CK2. Among them only two compounds inhibit CK2 with  $IC_{50}$  values of 9,5  $\mu\text{M}$  and 16  $\mu\text{M}$ . It was found that derivatives of 4-aminothieno[2,3-*d*]pyrimidine can form intramolecular hydrogen bond between amino group and carbonyl group, which may be the reason for the loss of activity due to loss of intermolecular hydrogen bonds with CK2 and destabilization of "inhibitor-CK2" complexes. In order to optimize inhibitory activity of 4-aminothieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives toward CK2, we have synthesized 21 derivatives of this chemical class which are not able to form intramolecular hydrogen bonds and investigated *in vitro*. Accordingly to biochemical screening we have found 7 highly effective nanomolar CK2 inhibitors with  $IC_{50}$  values in the range from 0,008 to 0,83  $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** protein kinase FGFR1, CK2, thieno[2,3-*d*]pyrimidine, inhibitor.