

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

Приходько Андрій Олександрович

УДК 547.814.1, 547.814.5, 547.584

**ПОШУК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2
СЕРЕД ПОХІДНИХ 4H-4-ХРОМЕНОНУ**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата хімічних наук

Київ – 2016

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, с.н.с.
Смолій Олег Борисович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
завідувач відділу хімії білків та пептидів

доктор фармацевтичних наук, професор
Демченко Анатолій Михайлович,
Інститут фармакології та токсикології НАМН України,
завідувач відділу синтезу фізіологічно активних речовин

Захист дисертації відбудеться 28 жовтня 2016 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України за адресою: 02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України за адресою: 02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1.

Автореферат розіслано 27 вересня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради Д 26.220.01
к.х.н.

В. О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підвищена активність серин-треонінової протеїнкінази СК2 спостерігається в багатьох типах раку, що досліджувались [Guerra et al., 1999, Tawfic et al., 2001], власне тому СК2 є перспективною молекулярною мішенню для розробки протиракових препаратів.

На сьогодні відомо багато низькомолекулярних, високоспецифічних інгібіторів протеїнкінази СК2, які були знайдені серед похідних бензотриазолу, бензімідазолу, хромону, антрахінону, хіноксаліну, індолу та інших класів сполук. Серед похідних хромону найбільш активними інгібіторами є апігенін (IC_{50} 0.8 мкМ), кверцетин (IC_{50} 0.55 мкМ) і фізетин (IC_{50} 0.35 мкМ). Єдиним інгібітором СК2, який проходить клінічні випробування, є СХ-4945 (IC_{50} 0.38 нМ) [Chon et al., 2015].

Однак, фактично всі відомі інгібітори мають ті чи інші недоліки, і нині жоден із них не був упроваджений у клінічну практику як терапевтичний засіб. Таким чином, винайдення нових інгібіторів протеїнкінази СК2 є актуальним завданням для розробки нових протиракових ліків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота була виконана в рамках бюджетних тем Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (відділ біомедичної хімії): «Вивчення протеїнкіназ як молекулярних мішеней для розробки терапевтичних засобів методами комбінаторної хімії та комп'ютерного моделювання» (номер держ. реєстрації – 0107U003345, 2008–2012 рр.), «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер держ. реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.), конкурсної тематики «Оптимізація інгібіторів протеїнкінази СК2 та дослідження їхньої біологічної активності на культурах ракових клітин» (номер держ. реєстрації 0107U004939, 2007–2009 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи був пошук нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 4*H*-4-хроменону.

Для досягнення цієї мети було поставлено і розв'язано такі завдання:

1. Розробити методики та синтезувати відібрані методом молекулярного докінгу похідні 4*H*-4-хроменону.

2. Проаналізувати залежність інгібувальної активності синтезованих сполук щодо протеїнкінази СК2 від їх хімічної структури.

3. Запропонувати напрямки подальшої хімічної оптимізації активних сполук на основі аналізу моделі їх зв'язування з АТФ-акцепторним сайтом СК2 і даних біологічного тестування.

4. Синтезувати спрогнозовані інгібітори та проаналізувати дані їх інгібувальної активності щодо СК2.

Об'єкт дослідження: інгібувальна активність органічних сполук відносно протеїнкінази СК2 людини.

Предмет дослідження: інгібітори СК2 на основі похідних 4*H*-4-хроменону та їх комплекси із протеїнкіназою СК2.

Методи дослідження: лабораторний органічний синтез, фізико-хімічні методи аналізу органічних речовин (ЯМР-спектроскопія, хромато-мас-

спектрометрія, тонкошарова хроматографія), гнучкий молекулярний докінг, біохімічне тестування активності протеїнкіназ із використанням радіоактивно міченого ^{32}P -АТФ.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті виконання дисертаційної роботи синтезовано й досліджено фізико-хімічні властивості нових похідних 7-гідрокси-3-арилокси-4*H*-4-хроменону, флавону і тетрагалогенофталіміду як інгібіторів протеїнкінази СК2. Розроблено методики синтезу нових 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси) та 8-діалкіламінометильних похідних 3-арилокси-7-гідроксихромону.

Встановлено залежність інгібувальної активності щодо протеїнкінази СК2 синтезованих сполук від хімічної структури їх замісників.

Синтезовано 47 інгібіторів СК2, значення IC_{50} яких було в межах від 4 до 800 нМ, для шістьох з яких встановлено селективність інгібування щодо СК2 в порівнянні з іншими кіназами (ASK1, JNK3, Aurora A, ROCK1, FGFR1, Met, Tie2).

Знайдено новий клас низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 – тетрагалогенофталіміди – та досліджено механізми їх взаємодії з ензимом.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені інгібітори протеїнкінази СК2, зокрема сполуки **4.21** (IC_{50} 40 нМ), **4.26** (IC_{50} 9 нМ), **4.94** (IC_{50} 10 нМ), **4.102** (IC_{50} 40нМ), **4.104** (IC_{50} 18 нМ), **4.105** (IC_{50} 4 нМ), які пропонуються для використання в наукових дослідженнях з метою вивчення структури й особливостей функціонування СК2. Їх також можна розглядати як потенційні попередники лікарських препаратів, які при подальшій оптимізації можуть бути використані у клінічній практиці для лікування онкологічних і запальних захворювань. Запропоновані способи зв'язування з протеїнкіназою СК2 та встановлені залежності інгібувальної активності сполук від їх структури можуть бути використані під час розробки нових високоефективних інгібіторів протеїнкіназ.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором власноручно виконано органічний синтез близько 300 органічних сполук, відібраних методом молекулярного докінгу. Зроблено аналіз спектральних досліджень і встановлено структури синтезованих сполук. Проведено аналіз залежності біологічної активності сполук від їх хімічної структури. Запропоновано напрямки хімічної оптимізації знайдених інгібіторів СК2.

Молекулярний докінг та аналіз молекулярних комплексів інгібіторів із протеїнкіназою СК2 проведено спільно з к.б.н. А. Г. Голубом. Біологічне тестування сполук *in vitro* здійснено к.б.н. О. В. Остринською.

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

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на конференціях молодих вчених (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2003, 2013), на Міжнародній науково-практичній конференції (Алушта, Крим, 2002), на Третій молодіжній школі-конференції (Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2002), на Міжнародних конференціях з хімії азотовмісних гетероциклів «CNH-2003» і «CNCH-2006» (Харків, 2003, 2006),

Міжнародному симпозиумі «International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry» (Судак, 2006), 96 Канадській хімічній конференції та виставці (Квебек, Канада, 2013), на XXVIII Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (Київ, 2013), на XIV Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії (Дніпропетровськ, 2016).

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано 18 праць, з них 7 статей у провідних фахових журналах, 1 патент і 10 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у трьох розділах, аналізу й узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який нараховує 117 найменувань. Дисертація містить 32 рисунки, 14 таблиць, 6 схем та 3 додатки. Загальний обсяг дисертації становить 167 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури (розділ 1) присвячений інгібіторам протеїнкінази СК2, узагальнено дані стосовно понад 20 хімічних класів відомих інгібіторів СК2.

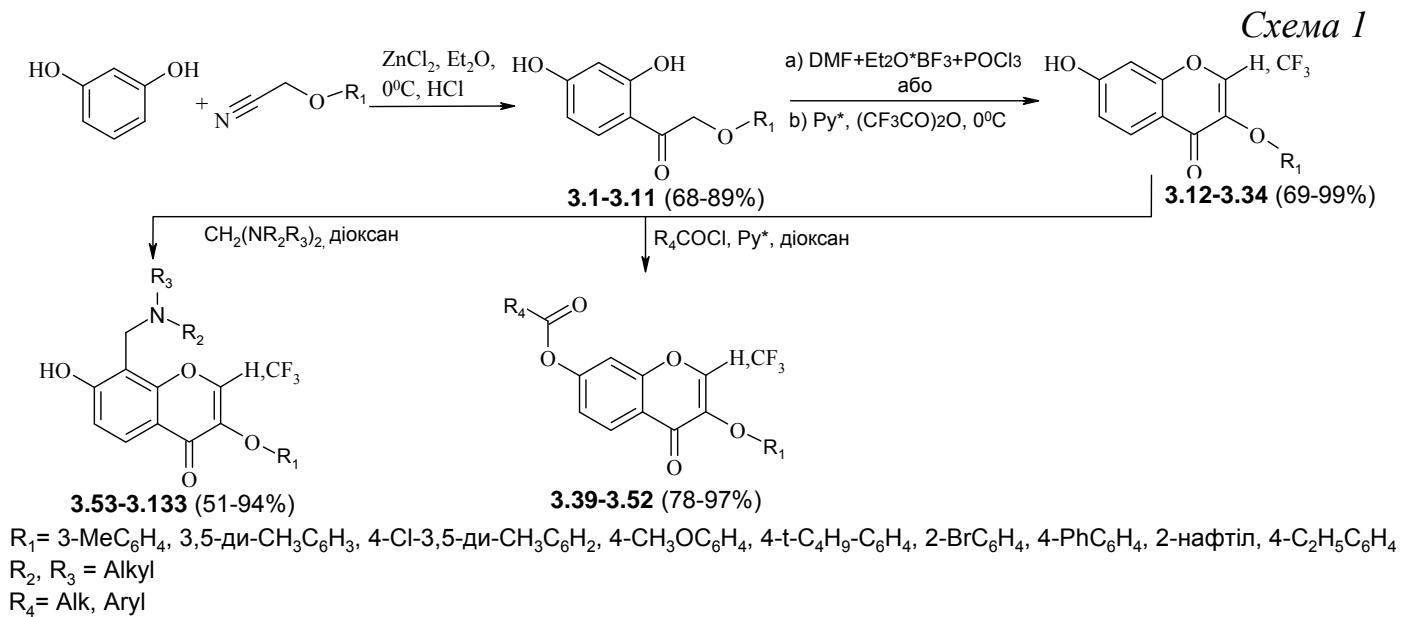
Матеріали і методи досліджень (розділ 2). Для попередньої підготовки віртуальних комбінаторних бібліотек низькомолекулярних органічних сполук було використано програмний пакет «Instant JChem 5.11.5». Молекулярний докінг проводили в АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази СК2 людини. Для докінгу та скорингу лігандів застосовували програмний пакет «DOCK 4.0». Візуальний аналіз взаємодії сполук з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази СК2 проводили у програмі «ViewerLite 4.2».

Температури плавлення синтезованих сполук визначали за допомогою прилада Кофлера. Спектри ¹H ЯМР вимірювали на спектрометрі «Varian VXR 300» при 300 МГц. Високоєфективна рідинна хроматографія (HPLC-MS) була виконана на приладі «Agilent 1100 LC/MSD SL» із розділювальним модулем та мас-детекторі «Mass Quad G1956B» з протонною іонізацією.

Біохімічне тестування проводили *in vitro* за допомогою радіоактивно міченого ³²P-АТФ, рекомбінантного білка протеїнкінази СК2 (гетеротетрамерний холоензим, New England Biolabs, Великобританія). Як субстрат був використаний синтетичний пептид RRRDDDSDDD (New England Biolabs, Великобританія). Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ.

Синтез похідних 3-арилокси-4H-4-хроменону та вивчення їх біологічної активності (розділ 3). Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки похідних 3-арилокси-7-гідроксихромонів, за результатами якого було синтезовано понад 90 сполук (схема 1). Для хімічного синтезу комбінаторних бібліотек використовували реакцію амінометилування похідними біс-діалкіламінометану (по положенню С-8

4*H*-4-хроменону) і реакцію ацилювання хлорангідрідами карбонових кислот (по фенольному гідроксилу в положенні С-7).



Результати попереднього скринінгу найбільш активних інгібіторів СК2 подано в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати попереднього скринінгу найбільш активних похідних 3-арилокси-хроменів (дані по залишковій активності СК2 (%) при концентрації сполук 33 мкМ)

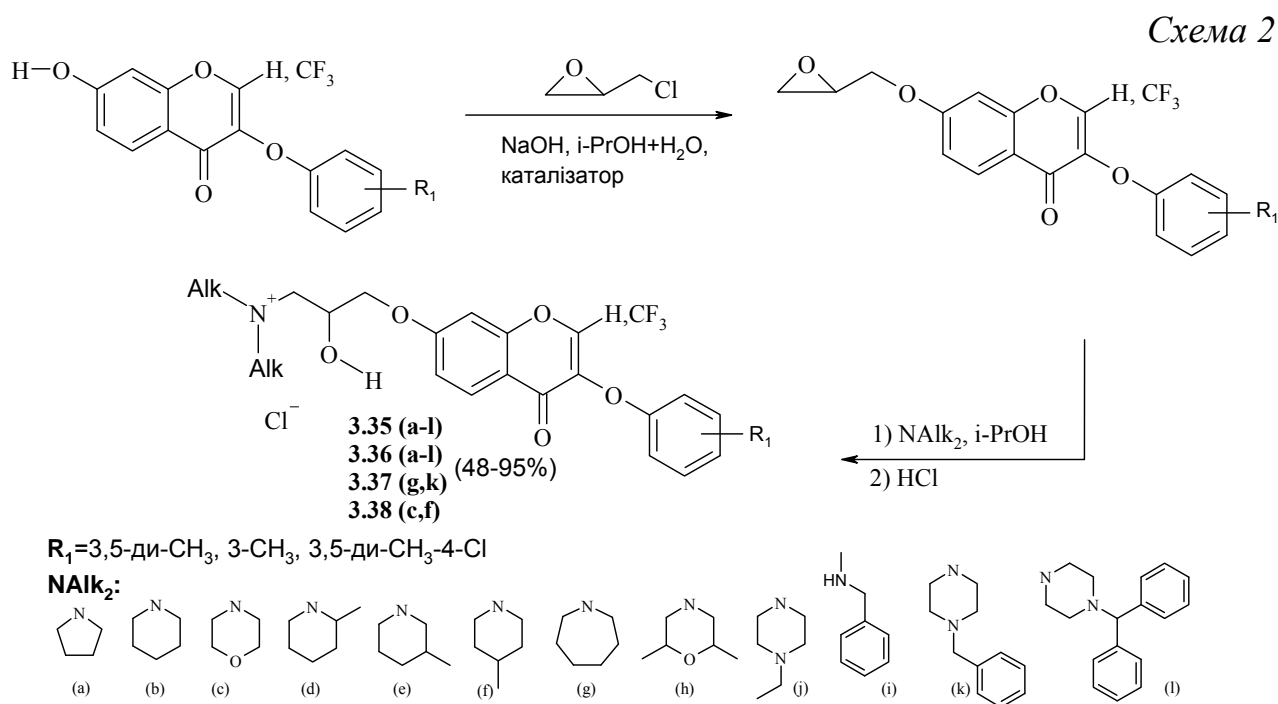
Хімічна структура	З.а.*	Хімічна структура	З.а.*	Хімічна структура	З.а.*
	32		33		35
	35		7		5

* З.а. – залишкова активність (%)

Оскільки сполуки 3-(4-хлоро-3,5-диметилфенокси)-7-(4-метокси-фенілкарбонілокси)-4-оксо-4*H*-хромен (**3.45**) і 7-(4-флуорофенілкарбонілокси)-4-оксо-3-(4-фенілфенокси)-4*H*-хромен (**3.46**) інгібували активність СК2 більш, ніж

на 90 %, то вони були відібрані для визначення IC_{50} . Встановлено, що сполука **3.45** мала IC_{50} 18.8 мкМ, а сполука **3.46** – 22.4 мкМ.

Однією з проблем, яка виникла під час біологічного тестування похідних 3-арилоксихромонів, була їх низька розчинність у воді. Було вирішено синтезувати більш водорозчинні сполуки шляхом уведення додаткових гідрофільних замісників у положення С-7 хромону. Так були синтезовані 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромони (схема 2).



Методику алкілування було розроблено спеціально для 7-гідроксихромонів, оскільки при алкілуванні у звичайних умовах [E. Wu et al., 1987] проходила побічна реакція розкриття циклу хромону, що значно ускладнювало подальшу очистку продуктів. Одержані епоксидні похідні вводили в реакцію з вторинними амінами, унаслідок чого відбувалося розкриття епоксидного циклу з утворенням відповідних 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромонів, які були виділені у вигляді гідрохлоридів.

Синтезовані похідні дійсно були добре розчинними у воді, але, на жаль, подальше біохімічне тестування не виявило активних сполук, які б інгібували протеїнкіназу СК2 із значенням IC_{50} менше 30 мкМ.

У співпраці з National Cancer Institute of the USA (<https://www.cancer.gov>) сполуки з вищеописаних комбінаторних бібліотек 3-арилоксихромонів були протестовані на протиракову активність *in cellulo*. Сім сполук (**3.51-3.53**, **3.68-3.71**, *рис. 1*) продемонстрували антипроліферативну активність (значення GI_{50} було в діапазоні від 3.44 до 41.1 мкМ) та проявляли цитотоксичну активність по відношенню до ракових клітинних ліній RPMI-8226 (лейкемія), SK-MEL-5 (меланома), T-47D (рак грудей) і HCT-116 (рак товстого кишечника) (LC_{50} від 49.6 мкМ). Хімічні структури найбільш активних сполук наведені на *рис. 1*.

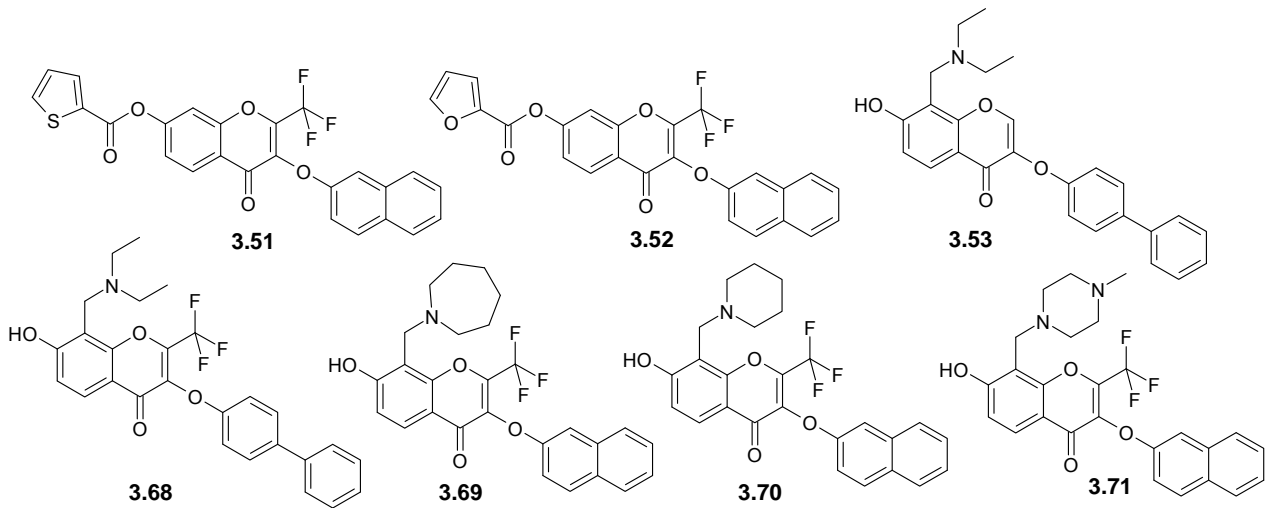
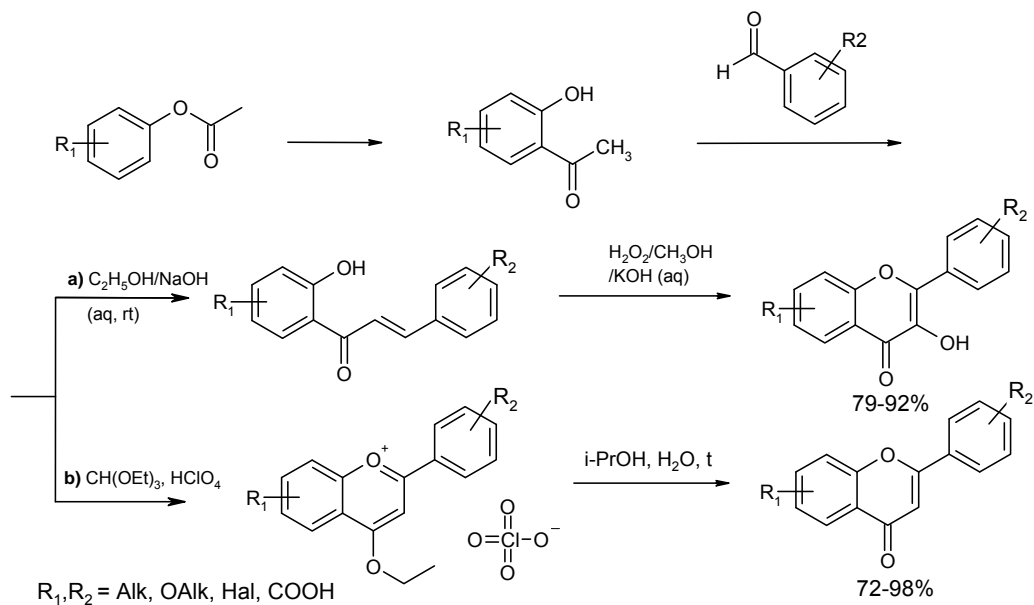


Рис. 1. Хімічні структури сполук **3.51-3.53**, **3.68-3.71**

Синтез похідних флавонів та дослідження їх інгібувальної активності щодо СК2 (розділ 4). Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки з близько тисячі карбоксилвмісних похідних флавонів. За результатами докінгу було синтезовано 13 похідних флавону за загальною методикою (схема 3, перелік замісників наведено в табл. 2). З вихідних 2'-гідроксиацетофенонів (одержаних за допомогою перегрупування Фріса) реакцією із карбоксибензальдегідами було синтезовано відповідні халкони, циклізацією яких (за допомогою пероксиду водню) були одержані похідні 3-гідроксифлавону. Відповідно, за двостадійною процедурою із 2'-гідроксиацетофенонів у триетилортоформіаті в присутності хлорної кислоти було одержано флавілієві солі, гідролізом яких було одержано незаміщені за третім положенням похідні флавонів.

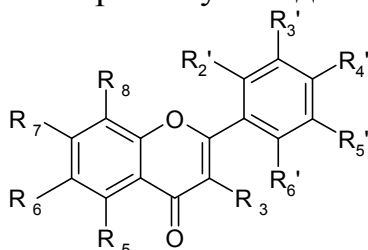
Схема 3



Результати тестування *in vitro* показали, що 5 карбоксилвмісних флавонів інгібували протеїнкіназу СК2 із значенням $IC_{50} < 10$ мкМ. Найбільш активні сполуки **4.4**, **4.6**, **4.7**, **4.9** мали карбоксильну групу в положенні С-4' флавонового циклу (табл. 2).

Таблиця 2

Результати первинного скринінгу похідних флавонів щодо СК2



№ сполуки/ замісники	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	IC ₅₀ , мкМ
4.1	OCH ₂ OCH ₂	H	COOH	H	H	H	H	H	OMe	H	8
4.2	COOH	H	H	H	H	H	H	Me	H	H	>40
4.3	COOH	H	H	H	H	H	H	Cl	H	H	>40
4.4	H	H	COOH	H	H	OH	H	H	H	H	1.3
4.5	COOH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	>40
4.6	H	H	COOH	H	H	H	H	Me	H	H	8
4.7	H	H	COOH	H	H	OH	H	Me	H	H	0.6
4.8	COOH	H	H	H	H	H	H	Me	H	Me	>40
4.9	H	H	COOH	H	H	H	H	Me	H	Me	5
4.10	COOH	H	H	H	H	H	H	H	Me	H	>40
4.11	COOH	H	H	H	H	H	H	Me	Me	H	35.0
4.12	COOH	H	H	H	H	H	H	Cl	Me	H	>40
4.13	COOH	H	H	H	H	H	H	OMe	H	H	>40

Досліджуючи залежність інгібувальної активності сполук цього класу від хімічної структури замісників, ми проаналізували комплекси 13 лігандів із АТФ-акцепторною кишенею протеїнкінази СК2 за допомогою молекулярного докінгу. Згідно з розробленою моделлю (рис. 2), флавони зв'язуються завдяки гідрофобним взаємодіям з амінокислотними залишками Phe113, Ile95 та Ile174. Також було виявлено три міжмолекулярні водневі зв'язки: перший з них формувався за участі атома Оксигену в положенні С-4 з атомом Нітрогену Val116, другий утворювався між гідроксильною групою в положенні С-3 і Glu114, до утворення третього водневого зв'язку залучена карбоксильна група в положенні С-4' (очевидно, цей водневий зв'язок може пояснити вищу активність тих сполук, що мають карбоксильну групу в положенні С-4', оскільки згідно з даними докінгу, сполуки, що мають карбоксильну групу в положенні С-2', не здатні формувати водневий зв'язок).

Найбільш важливими замісниками були гідроксильна група в положенні С-3 та карбоксильна група в положенні С-4'.

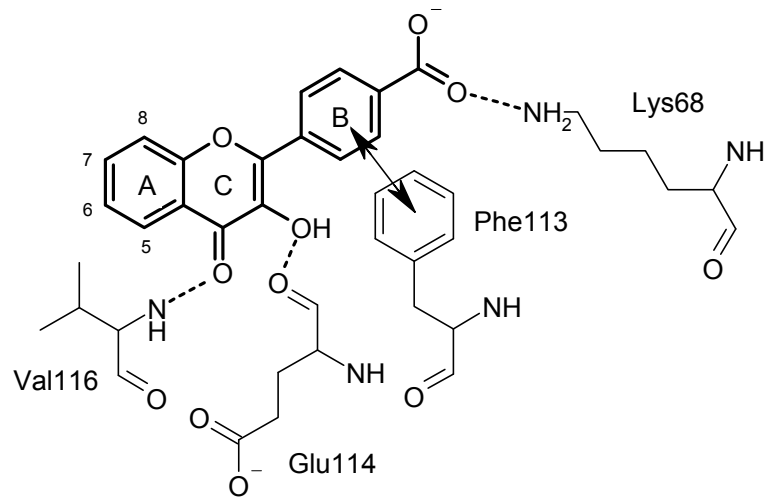


Рис. 2. Модель зв'язування активних похідних флавору в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази СК2

Розроблену модель зв'язування було використано для передбачення і синтезу нової серії більш активних інгібіторів на основі похідних флавору. Додатково було синтезовано 13 похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавору (схема 3, а) та протестовано *in vitro* по відношенню до СК2 (табл. 3).

Таблиця 3

Дані інгібувальної активності для додатково синтезованих похідних флаворів 4.14-4.26 щодо СК2 (після оптимізації)

№ сполуки/ замісники	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	IC ₅₀ , мкМ
4.14	H	H	COOH	H	H	OH	H	Me	Me	H	0.3
4.15	H	H	COOH	H	H	OH	H	OMe	H	H	0.25
4.16	H	H	COOH	H	H	OH	H	NHAc	H	H	0.72
4.17	H	H	COOH	H	H	OH	H	Cl	Me	H	0.17
4.18	H	H	COOH	H	H	OH	H	Cl	H	H	0.18
4.19	H	H	COOH	H	H	OH	H	Me	H	Me	0.07
4.20	H	H	COOH	H	H	OH	H	Et	H	H	0.16
4.21	H	H	COOH	H	H	OH	H	Cl	H	Cl	0.04
4.22	H	H	COOH	H	H	OH	H	H	Me	H	0.7
4.23	H	H	COOH	H	H	OH	H	Br	H	H	0.08
4.24	H	H	COOH	H	H	OH	H	H	OMe	H	0.29
4.25	H	H	COOH	H	H	OH	H	Cl	H	Me	0.05
4.26	H	H	COOH	H	H	OH	H	Br	H	Br	0.009

Аналізуючи дані тестування *in vitro* та моделі зв'язування інгібіторів з АТФ-акцепторним сайтом СК2, ми встановили деякі залежності інгібувальної активності сполук від хімічної структури замісників. Так, сполуки з карбоксильною групою в положенні С-4' були більш активними в порівнянні із сполуками з карбоксильною

групою в положенні С-2'. Уведення додаткової гідроксигрупи в положення С-3 також значно збільшувало інгібувальну активність. В залежності від гідрофобності замісників у положенні С-6 активність інгібіторів зростала в ряду: метил < метокси < хлор < етил < бром. Додаткове введення гідрофобного замісника у позицію С-8 циклу «А» також збільшувало інгібувальну активність флавонів щодо СК2, тобто 6,8-дизаміщені похідні були більш активними в порівнянні з моно 6-заміщеними похідними (рис. 3).

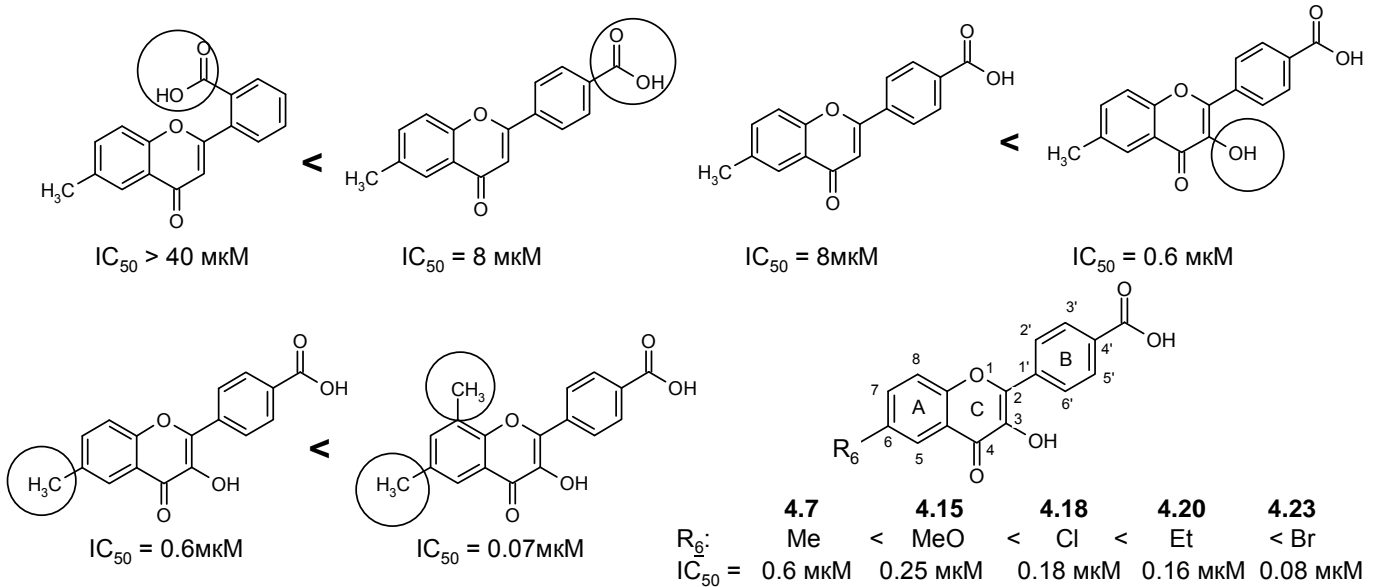


Рис. 3. Залежність інгібувальної активності похідних флавону від хімічної структури замісників

Дослідження специфічності інгібувальної дії найбільш активних похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонової – **4.21** та **4.26** – було проведено на п'яти серинтреонінових (СК2, ASK1, JNK3, Aurora A, ROCK1) і трьох тирозинових протеїнкіназах (FGFR1, Met, Tie2), за результатами якого була виявлена висока селективність інгібування щодо СК2.

Синтез 4'-гідроксифлавонів та дослідження їх інгібувальної активності щодо СК2. Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки з близько тисячі похідних некарбоксилвмісних флавонів. У результаті було відібрано 49 похідних флавонової для хімічного синтезу (схеми 3-5) і біохімічного тестування.

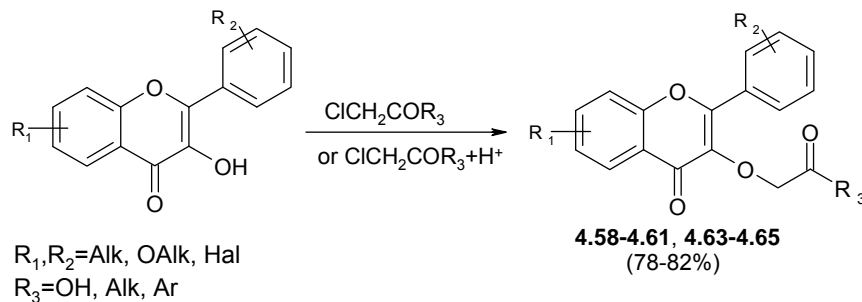
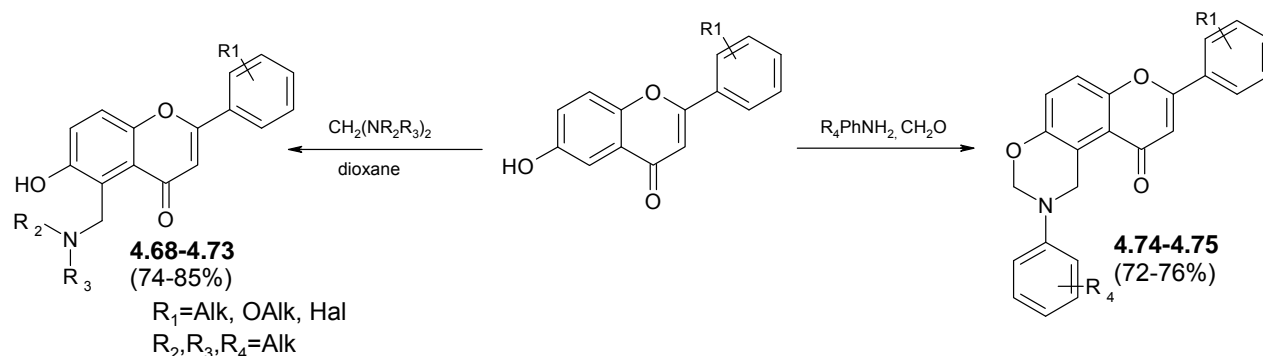


Схема 4

Реакцію амінометилювання проводили в абсолютному діоксані з відповідними похідними біс-діалкіламінометану. Було синтезовано основи Маніха по положенню С-5 (схема 5). Окрім того, з відповідними анілінами у спирті з надлишком формаліну було одержано [1,3]оксазинани.

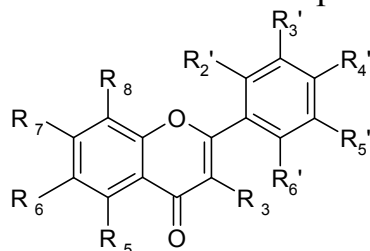
Схема 5



За результатами біологічного тестування *in vitro* 14 сполук інгібували СК2 зі значеннями IC_{50} менше 30 мкМ (табл. 4). Найактивнішою сполукою виявився 6,8-диметил-4'-гідрокси-3'-метоксифлавіон **4.54** (IC_{50} 100 мкМ).

Таблиця 4

Результати первинного скринінгу похідних флавінів щодо СК2
(для найбільш активних речовин)



№ сполуки/ замісники	R_2'	R_3'	R_4'	R_5'	R_6'	R_3	R_5	R_6	R_7	R_8	IC_{50} , мкМ
4.29	H	H	OMe	H	H	H	H	OH	H	H	30
4.38	H	OMe	OH	H	H	H	H	H	H	H	0.8
4.39	H	OEt	OH	H	H	H	H	H	H	H	7.5
4.42	H	OEt	OH	H	H	H	H	Me	H	H	8
4.43	H	H	Cl	H	H	OH	H	Me	H	H	23
4.46	H	H	i-Pr	H	H	OH	H	Me	H	H	26
4.47	OH	H	H	Br	H	OH	H	Me	H	H	28
4.48	H	H	OMe	H	H	OH	H	Me	H	H	28
4.49	H	OMe	H	H	H	OH	H	Me	H	H	25
4.54	H	OMe	OH	H	H	H	H	Me	H	Me	0.1
4.56	H	Br	H	H	H	H	H	OH	H	H	19
4.57	H	OMe	OMe	OMe	H	H	H	OH	H	H	26
4.62	H	H	Me	H	H	H	H	OH	H	H	19

Згідно з наведеними в *таблиці 4* даними, сполуки, що мають гідроксильну групу в положенні С-4' (**4.38**, **4.39**, **4.42** і **4.54**), демонстрували найвищу інгібувальну активність. Аналіз комплексів «СК2 – ліганд», отриманих методом молекулярного докінгу (рис. 4), виявив, що всі активні сполуки мають схожий тип взаємодії. Найбільший внесок у фіксацію інгібітора в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази СК2 відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій із залишками 7 амінокислот (Leu45, Val53, Val66, Ile 95, Phe113, Met163 і Ile174). Зв'язування фенольного кільця «В» ліганду із Phe113, Ile95 та Ile174 є надзвичайно важливим. Із Phe113 формується стекінг взаємодія. Крім того, утворюються два міжмолекулярні водневі зв'язки – із Val116 та Lys68. Однак, беручи до уваги, що формування водневого зв'язку з Lys68 є стерично можливим як для 4'-гідроксильної групи, так і для 3'-гідроксильної групи, було незрозумілим, яка з цих груп мала більший вплив на стабілізацію комплексу «інгібітор – кіназа».

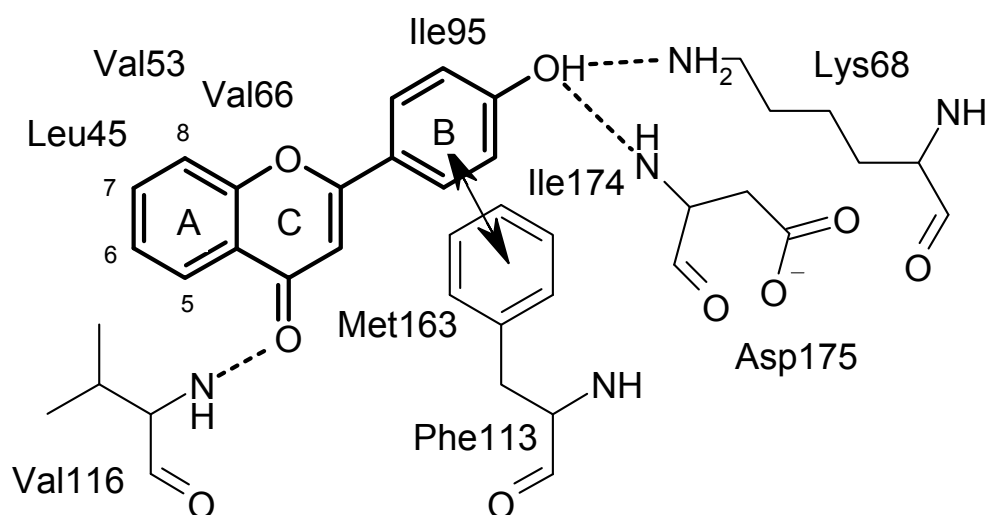


Рис. 4. Модель зв'язування активних похідних флавону в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази СК2

Для з'ясування цих структурних особливостей було синтезовано сполуки **4.76-4.109**, синтез проводили за двостадійною процедурою (*схема 3, b*). Взаємодією 2'-гідроксиацетофенонів та відповідних похідних бензальдегіду в триетилортоформіаті було одержано флавілієві солі, які було прогідролізовано до відповідних флавонів. Дані біохімічного тестування подано в *таблиці 5*. Було встановлено, що сполука **4.79**, яка містить 4'-гідроксильну групу є дещо активнішою, ніж сполука **4.78**, що має 3'-гідроксильну групу (IC_{50} 1.6 мкМ і 2.2 мкМ, відповідно). У той же час, активність флавону **4.81**, що містить обидві групи, є значно вищою (IC_{50} 0.45 мкМ). Це можна пояснити одночасним формуванням міжмолекулярних водневих зв'язків між 4'-гідроксигрупою та залишками Lys68 і/або Asp175 (*рис. 4*).

Дані інгібувальної активності додатково синтезованих похідних 4'-гідроксифлавонів щодо СК2 (після оптимізації)

№ сполуки/ замісники	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	IC ₅₀ , мкМ
4.76	H	OH	OMe	H	H	H	H	Me	H	Me	>30
4.77	OH	OMe	H	H	H	H	H	Me	H	Me	>30
4.78	H	OH	H	H	H	H	H	Me	H	Me	2.2
4.79	H	H	OH	H	H	H	H	Me	H	Me	1.6
4.81	H	OH	OH	H	H	H	H	Me	H	Me	0.45
4.83	H	OMe	OH	H	H	H	H	Me	H	H	0.32
4.84	H	OMe	OH	H	H	H	H	OMe	H	H	0.20
4.85	H	OMe	OH	H	H	H	H	Cl	H	H	0.24
4.86	H	OMe	OH	H	H	H	H	Et	H	H	0.12
4.87	H	OMe	OH	H	H	H	H	NAc	H	H	0.15
4.88	H	OMe	OH	H	H	H	H	Br	H	H	0.085
4.94	H	OMe	OH	H	H	H	H	Cl	H	Cl	0.01
4.96	H	NO ₂	OH	H	H	H	H	Me	H	Me	0.012
4.98	H	OMe	OH	NO ₂	H	H	H	Me	H	Me	0.066
4.100	H	Br	OH	H	H	H	H	Me	H	Me	0.05
4.102	H	OMe	OH	H	H	H	H	Cl	H	Me	0.04
4.104	H	OMe	OH	Cl	H	H	H	Br	H	Br	0.018
4.105	H	OMe	OH	H	H	H	H	Br	H	Br	0.004

Аналіз залежності інгібувальної активності похідних флавону від хімічної структури його замісників (рис. 5) показав, що збільшення гідрофобності замісника у положенні С-6 флавонів спричинює зростання інгібувальної активності. Така закономірність була встановлена в ряду: метил < хлор ≤ метокси < N-ацетил < етил ≤ бром. Також було виявлено, що введення додаткового гідрофобного замісника в положення С-8 позитивно впливає на активність, тобто 6,8-дизаміщені похідні виявилися більш активними інгібіторами, ніж моно 6-заміщені похідні.

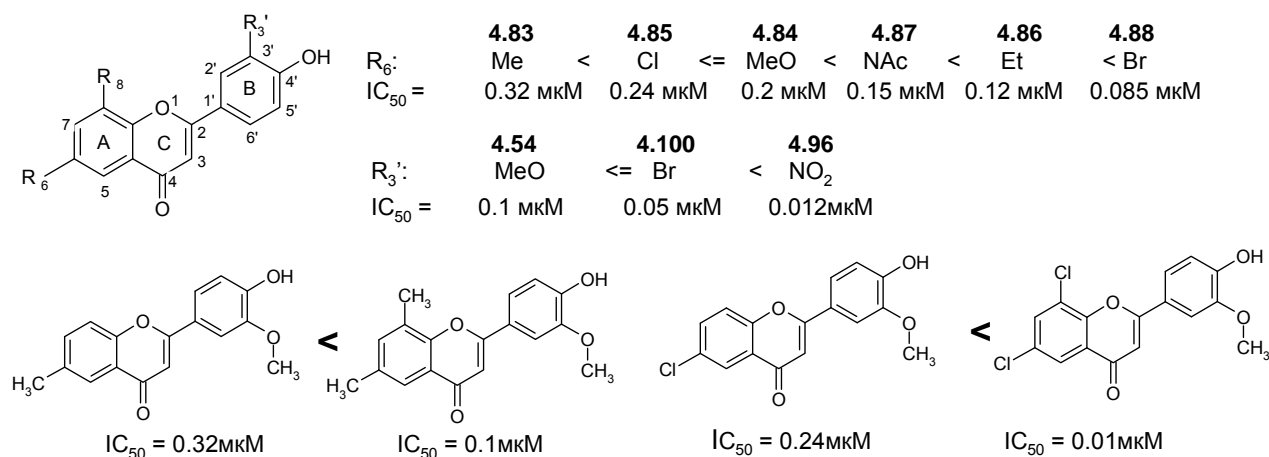


Рис. 5. Залежність інгібувальної активності похідних 4'-гідроксифлавонів від хімічної структури їхніх замісників

Селективність інгібувальної дії сполук **4.102**, **4.104**, **4.105** і **4.94** було досліджено на чотирьох серин-треонінових (ASK1, JNK3, Aurora A, ROCK1) та трьох тирозинових протеїнкіназах (FGFR1, Met, Tie2). За результатами біохімічного тестування ці сполуки виявили високу селективність інгібування щодо СК2 в порівнянні з іншими кіназами.

Таким чином, нами було розроблено нові інгібітори протеїнкінази СК2 – похідні 4'-гідроксифлавонів, що мали значно вищу інгібувальну активність, ніж їхні природні аналоги. Значення IC_{50} для 4'-гідроксифлавону **4.105** – 4 нМ, що у 100 разів нижче, ніж у фізетину (найбільш активного серед відомих природних флавонів, здатних інгібувати СК2).

Синтез похідних тетрагалогенофталіміду та дослідження їх інгібувальної активності щодо СК2 (розділ 5). З метою отримання більш активних інгібіторів, структурно подібних до відомого інгібітора ТВВ, було синтезовано 71 тетрагалогенофталімідів, серед яких було знайдено чотири високоефективні інгібітори, що пригнічували протеїнкіназу СК2 у наномолярному діапазоні концентрацій (рис. 6). Інгібувальна активність тетраїодофталімідів була значно вищою в порівнянні з тетрабромо- і тетрахлорофталімідами.

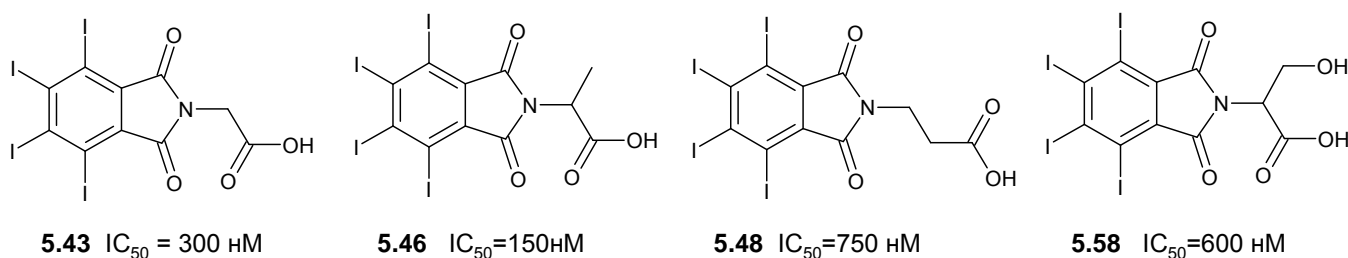


Рис. 6. Хімічні структури та значення IC_{50} для найбільш активних тетраїодофталімідів **5.43**, **5.46**, **5.48**, **5.58**

Отримані сполуки **5.43**, **5.46**, **5.48** і **5.58** показали кращі інгібувальні властивості щодо СК2 в порівнянні з описаним у літературі інгібітором ТВВ, але, на відміну від синтезованих нами інгібіторів у ряду флавонів, вони не підходять для розробки лікарських засобів за багатьма характеристиками ($\log P$, молекулярна вага, розчинність, наявність декількох атомів галогену) та мають перспективи використання тільки в наукових дослідженнях.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, біохімічного тестування та хімічної оптимізації розроблено нові інгібітори протеїнкінази СК2. Вивчено способи зв'язування цих сполук з АТФ-акцепторним сайтом фермента. Встановлено залежність інгібувальної дії інгібіторів від їх структурних особливостей.

1. Розроблено методики синтезу комбінаторних бібліотек на основі похідних 3-арилоксихромону і флавонону.

2. Синтезовано серію нових 8-діалкіламінометильних та 7-О-ацильних похідних 3-арилоксихромонів. Розроблено методику алкілювання 3-арилокси-7-гідроксихромонів епіхлоргідрином з подальшою взаємодією одержаних сполук із вторинними амінами. За результатами біологічного тестування дві найбільш активні сполуки інгібували протеїнкіназу СК2 зі значенням IC_{50} 18.8 та 22.4 мкМ.

3. Вивчено залежність інгібувальної активності синтезованих похідних 3-гідрокси-4'-карбоксифлавонолу від природи замісника в положенні С-6, яка зростала в ряду: метил < метокси < хлор < етил < бром. Виявлено визначальний вплив гідроксильної групи в положенні С-3 на активність інгібіторів.

4. У результаті проведеної хімічної оптимізації синтезовано 34 похідних флавонолу з гідроксильною групою, серед яких 27 сполук показали інгібувальну активність у наномолярному діапазоні концентрацій. Встановлено визначальний вплив 4'-гідроксильної групи флавонолу на інгібувальну активність щодо кінази СК2.

5. Серед похідних тетрагалогенофталімідів уперше знайдено інгібітори протеїнкінази СК2 (значення IC_{50} найактивнішого інгібітора **5.46** □ 150 нМ). Встановлено, що інгібувальна активність тетраїодофталімідів є значно вищою в порівнянні з тетрабромо- і тетрахлорофталімідами.

6. Розроблено 47 інгібіторів протеїнкінази СК2, величини IC_{50} яких знаходилися в межах від 4 до 800 нМ. Шість найбільш активних інгібіторів (**4.21, 4.26, 4.94, 4.102, 4.104, 4.105**) проявили високу селективність інгібування щодо СК2 в порівнянні з кіназами ASK1, Jnk3, FGFR1, Met, Aurora A, Tie2 та Rock 1.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Архипов В. В. Інгібітори циклін-залежних кіназ. Синтез комбінаторних бібліотек 8-алкіламінометильних похідних 3-арилокси-7-гідроксихромонів та вивчення їхньої протиракової активності / В. В. Архипов, А. О. Приходько, А. Г. Голуб, В. П. Хиля, С. М. Ярмолук // Біополімери і клітина. – 2003. – 19, № 2. – Р. 196-201. (<http://dx.doi.org/10.7124/bc.00064E>). (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез похідних 3-арилоксихромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук).
2. Prykhod'ko A. O. Antiproliferative activities of some 7-hydroxy-3-aryloxy-2-trifluoromethyl-4H-4-chromenone derivatives against 60 human cancer cell lines / A. O. Prykhod'ko, G. G. Dubinina, V. P. Khilya, S. M. Yarmoluk // Biopolymers and Cell. – 2004. – 20, № 1. – Р. 159–163. (<http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006A3>). (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез похідних 3-арилоксихромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, власноруч написано основну частину статті).
3. Prykhod'ko A. O. Evaluation of 4H-4-chromenone derivatives as inhibitors of protein kinase CK2 / A. O. Prykhod'ko, O. Ya. Yakovenko, A. G. Golub, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // Biopolymers and Cell. – 2005. – 21, № 3. – Р. 287–292. (<http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006F4>) (Особ. внесок – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез похідних хромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, власноруч написано основну частину статті).

4. Приходько А. О. Синтез 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромонів) / А. О. Приходько, С. П. Кобзєв, С. М. Ярмолук // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2005. – № 1. – С. 33–39. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, власноруч написано основну частину статті).
5. Golub A. G. Evaluation of 4,5,6,7-tetrahalogeno-1H-isoindole-1,3(2H)-diones as inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, O. Ya. Yakovenko, A. O. Prykhod'ko, S. S. Lukashov, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – № 1784. – P. 143–149. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез тетрагалогенофталімідів, аналіз спектральних властивостей і встановлення будови синтезованих сполук, власноруч написано основну частину статті).
6. Golub A. G. Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2 / A. G. Golub, V. G. Bdzhola, Y. V. Kyshenia, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, O. P. Kukharenko, O. V. Ostrynska, S. M. Yarmoluk // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011. – Vol. 356. – P. 107–115. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавонолів, аналіз спектральних властивостей і встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»).
7. Golub A. G. Discovery and characterization of synthetic 4'-hydroxyflavones – New CK2 inhibitors from flavone family / A. G. Golub, V. G. Bdzhola, O. V. Ostrynska, I. V. Kyshenia, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, O. P. Kukharenko, S. M. Yarmoluk // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21. – P. 6681–6689. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавононів, аналіз спектральних властивостей і встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»).
8. Приходько А. О. Пат. 69165 А, Україна, МКІ С07D215/00. Застосування 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів як інгібіторів протеїнкінази СК2 / А. О. Приходько (UA), А. Г. Голуб (UA), О. Я. Яковенко (UA), В. Г. Бджола (UA), Г. Г. Дубініна (UA), С. М. Ярмолук (UA). – № 20031211364 ; заявл. 10.12.2003 ; опублік. 16.08.2004, Бюл. № 8. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез тетрагалогенофталімідів, аналіз спектральних властивостей і встановлення будови синтезованих сполук).
9. Приходько А. О. Синтез та протиракова активність комбінаторних бібліотек 8-амінометильних похідних 3-арилокси-7-гідроксихромонів / А. О. Приходько, А. Г. Голуб, В. П. Хиля, С. М. Ярмолук // Міжн. наук.-практ. конф., Алушта, Крим, Україна, 20-25 травня 2002. – С. 49. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез 8-амінометильних похідних хромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук).
10. Prykhod'ko A. O. Synthesis and anticancer activity of combinatorial libraries 8-aminomethyl derivatives of 3-aryloxy-7-hydrohychromones / A. O. Prykhod'ko, A. G. Golub, V. P. Khilya, S. M. Yarmoluk // Third Youth School-Conference on Organic Synthesis, Saint-Petersburg, Russia, June 24-27, 2002. – P. 324. (Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез 8-амінометильних похідних хромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук).

11. Prykhod'ko A. O. Search of protein kinase CK2 inhibitors among combinatorial library of 4H-4-chromenone derivatives / A. O. Prykhod'ko, A. G. Golub, O. Ya. Yakovenko, V. G. Bdzhola, G. G. Dubinina, S. M. Yarmoluk // Conference for young scientists PhD students and students, Institute of Molecular Biology and Genetics, September 25–27, 2003, Kyiv, Ukraine. – P. 199. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез похідних хромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук*).
12. Prykhodko A. O. Development of protein kinase CK2 inhibitors among combinatorial library of 4H-4-chromone derivatives / A. O. Prykhodko, A. G. Golub, O. Ya. Yakovenko, V. G. Bdzhola, G. G. Dubinina, S. M. Yarmoluk // CNCH-2003, Kharkiv, Ukraine, September 30 – October 3, 2003. – P. 255. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літ-ри, розробка методів синтезу і синтез похідних хромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук*).
13. Prykhodko A. O. Synthesis 7-(3-dialkylamino-2-hydroxypropoxy)-3-aryloxychromones and their biological activity against protein kinase CK2 / A. O. Prykhodko, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // International Conference on Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles (October 2-7, 2006, Kharkiv, Ukraine). – P. 240. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук*).
14. Prykhodko A. O. Search of protein kinase CK2 inhibitors among 7-(3-dialkylamino-2-hydroxypropoxy)-3-aryloxychromones / A. O. Prykhodko, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk // International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry, 26-30 June, 2006, Sudak, Ukraine. – C-201. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, розробка методів синтезу і синтез 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипропокси)-3-арилоксихромонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук*).
15. Ostrynska O. V. 4'-hydroxyflavone, as inhibitors of protein kinase CK2. Search, optimization and biological testing // O. V. Ostrynska, V. G. Bdzhola, A. G. Golub, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, A. P. Kukharenko, S. M. Yarmoluk // Abstract of VII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to the 175 anniversary of O. Ya. Danylevsky // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29. Special Issue. – P. 15. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»*).
16. Golub A. G. Rational design of novel compounds inhibiting protein kinase CK2 / A. G. Golub, Y. Bilokin, S. M. Yarmoluk, V. G. Bdzhola, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhodko, O. P. Kukharenko, O.V. Ostrynska, N.V. Briukhovetska, I. M. Kotey, A. O. Balanda // Abstract of 96th Canadian Chemistry Conference and Exhibition, 26-30 May, 2013, Quebec City, Canada (<http://abstracts.csc2013.ca/00000930.htm>). (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»*).
17. Остринська О. В. 4'-Гідроксифлаволи як інгібітори протеїнкінази СК2: пошук, оптимізація та біологічна оцінка / О. В. Остринська, В. Г. Бджола,

- А. Г. Голуб, В. М. Сапелкін, А. О. Приходько, О. П. Кухаренко, С. М. Ярмолюк // Тези XXVIII Наукової конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України. Київ, 28-29 березня 2013 р. // Катализ и нефтехимия. – 2013. – № 22. – С. 66. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавонів, аналіз спектральних властивостей та встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»*).
18. Приходько А. О. Синтез похідних 4'-карбоксі- та 4'-гідроксифлавонів і оцінка їх біологічної активності / А. О. Приходько, О. В. Остринська, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолюк // Тези XIV Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії (Дніпропетровськ, 2016 р.). – 2016. – С. 48. (*Особ. внесок здобувача – аналіз літератури, синтез похідних флавонів, аналіз спектральних властивостей і встановлення будови синтезованих сполук, аналіз залежності «хімічна структура – інгібувальна активність»*).

АНОТАЦІЯ

Приходько А. О. Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 4H-4-хроменону. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена пошуку нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 за допомогою методів молекулярного моделювання, хімічного синтезу та біохімічного тестування.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторних бібліотек похідних 3-арилокси-7-гідроксихромену, флавону і тетрагалогенофталіміду. Синтезовано нові 8-амінометильні, 7-О-ацильні та 7-(3-діалкіламіно-2-гідроксипрокси) похідні 3-арилоксихромонів; 5-діалкіламінометильні похідні 6-гідроксифлавону, а також [1,3]оксазинани, конденсовані з кільцем флавону. Проведено модифікацію гідроксильної групи у положенні 3 перетворенням у заміщені алкоксипохідні.

Розроблені моделі зв'язування використано для передбачення і синтезу нових серій більш активних інгібіторів. Так, у результаті подальшої хімічної оптимізації синтезовано 40 високоактивних інгібіторів, значення IC_{50} яких було в межах від 4 до 790 нМ. Шість найбільш активних інгібіторів (**4.21**, **4.26**, **4.94**, **4.102**, **4.104**, **4.105**) проявили високу селективність інгібування щодо СК2 в порівнянні з кіназами ASK1, Jnk3, FGFR1, Met, Aurora A, Tie2 та Rock 1. Уперше знайдено інгібітори протеїнкінази СК2 серед похідних тетрагалогенофталіміду (значення IC_{50} найактивнішого інгібітора становило 150 нМ).

Синтезовані інгібітори протеїнкінази СК2 є зручним інструментом для вивчення структури й особливостей функціонування СК2 у наукових дослідженнях. Їх можна розглядати як потенційні попередники лікарських препаратів, які при подальшій оптимізації можуть бути використані в клінічній практиці для лікування онкологічних та запальних захворювань.

Ключові слова: 3-арилокси-4*H*-4-хроменон, хромон, флавоон, флавонол, тетрагалогенофталімід, 4,5,6,7-тетрагалогено-1*H*-ізоіндол-1,3(2*H*)-діон, протеїнкіназа СК2, казеїн кіназа, інгібітор, докінг, органічний синтез.

АННОТАЦІЯ

Приходько А. А. Поиск новых ингибиторов протеинкиназы СК2 среди производных 4*H*-4-хроменона. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. – Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена поиску новых низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназы СК2 с помощью методов молекулярного моделирования, химического синтеза и биохимического тестирования. Молекулярный докинг проводили в АТФ-акцепторный сайт протеинкиназы СК2 человека.

Для поиска ингибиторов протеинкиназы СК2 был проведен рецепторно-ориентированный виртуальный скрининг комбинаторных библиотек производных 3-арилокси-7-гидроксихромена, флавона и тетрагалогенфталимида. Синтезировано серию новых 8-диалкиламинометильных, 7-О-ацильных и 7-(3-диалкиламино-2-гидроксипропокси) производных 3-арилоксихромонов; 5-диалкиламинометильных производных 6-гидроксифлавона, а также [1,3]оксазинаны, конденсированные с кольцом флавона. Была проведена модификация гидроксильной группы в положении 3 превращением в замещенные алкоксипроизводные.

Разработанные модели связывания ингибиторов с СК2 были использованы для предсказания и синтеза новых серий более активных ингибиторов. Так, в результате дальнейшей химической оптимизации были синтезированы 40 высокоактивных ингибиторов, IC_{50} которых было в пределах от 4 до 790 нМ. Шесть наиболее активных ингибиторов (4.21, 4.26, 4.94, 4.102, 4.104, 4.105) проявили высокую селективность ингибирования по СК2 по сравнению с киназами ASK1, Jnk3, FGFR1, Met, Aurora A, Tie2 и Rock 1.

Впервые найдено ингибиторы протеинкиназы СК2 среди производных тетрагалогенфталимида (IC_{50} активного ингибитора 150 нМ). Изучена зависимость ингибиторной активности синтезированных производных от химической природы их заместителей.

Синтезированные ингибиторы протеинкиназы СК2 являются удобным инструментом для изучения структуры и особенностей функционирования СК2 в научных исследованиях и их можно рассматривать как потенциальные предшественники лекарственных препаратов, которые при дальнейшей оптимизации могут быть использованы в клинической практике для лечения онкологических и воспалительных заболеваний.

Ключевые слова: 3-арилокси-4*H*-4-хроменон, хромон, флавоон, флавонол, тетрагалогенфталимид, 4,5,6,7-тетрагалоген-1*H*-изоиндол-1,3(2*H*)-дион, протеинкиназа СК2, казеин киназа, ингибитор, докинг, органический синтез.

SUMMARY

Prykhod'ko A.O. The search of new protein kinase CK2 inhibitors among derivatives of 4*H*-4-chromenone. – Manuscript.

Thesis in candidacy for a Philosophy Doctor (PhD) degree in Chemistry, speciality 02.00.10 – bioorganic chemistry. – Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the finding of new low-molecule protein kinase CK2 inhibitors using methods of molecular modeling, chemical synthesis and biochemical testing.

Molecular docking was carried out into ATP-acceptor site of human protein kinase CK2. Program package «DOCK 4.0» was used for docking and scoring. Visual analyses of compounds' interaction with amino-acid residues of protein kinase CK2 ATP-binding pocket were carried out in «ViewerLite 4.2» program. Biochemical testings were carried out *in vitro* using radioactively labeled ³²P-ATP, recombinant protein of the CK2 protein kinase (heterotetrameric holoenzyme).

Receptor-oriented virtual screening of the combinatorial library of 3-aryloxy-7-hydroxychromones was carried out for the search of protein kinase CK2 inhibitors, and on the base of its results 90 compounds were synthesized. For the chemical synthesis of combinatorial libraries it was used the reaction of amino-methylation with derivatives of bis-dialkylaminomethane into C-8 position of 4*H*-4-chromone and the reaction of acylation with acid chlorides of carbon acids by phenolic hydroxyl in C-7 position. New 8-dialkylaminomethyl and 7-O-acetyl derivatives of 3-aryloxychromone were synthesized. We were developed a method for alkylation of 3-aryloxy-7-hydroxychromones epichlorohydrin with further interaction followed by reaction of compounds, obtained from secondary amines. As a result of biochemical testing the two most active compounds inhibited protein kinase CK2 with IC₅₀ 18.8 and 22.4 mM. It was studied the dependence of the activity of the synthesized compounds in terms of their chemical structure. It was considered that the main contribution to the stabilization of the most active inhibitors of **4.45** and **4.46** in the active site of protein kinase CK2 is made by hydrophobic interactions. Cooperating with National Cancer Institute of the USA (<http://dtp.nci.nih.gov/index.html>) the compounds from combinatorial libraries of 3-aryloxychromones, described above, were tested *in cellulo* for anti-tumor activity. Eight compounds (**3.31**, **3.51-3.53**, **3.68-3.71**) have demonstrated antiproliferative activity, the value of GI₅₀ was in the range from 3.44 up to 41.1 μM and revealed cytotoxic activity in the attitude to tumor cell lines RPMI-8226, SK-MEL-5, T-47D and HCT-116 (LC₅₀ from 49.6 μM).

For the search of new CK2 protein kinase inhibitors receptor-oriented virtual screening of combinatorial libraries from about a thousand carboxyl-containing flavone derivatives was carried out. In accordance with results of docking 13 flavone derivatives were synthesized and biochemical testing was carried out. Developed binding model were used for prediction and synthesis of new series of more active inhibitors on the base of flavone. Thereby 13 derivatives of 3-hydroxy-4'-carboxyflavone were additionally synthesized and tested *in vitro* in the attitude to CK2. It was studied the dependence of inhibitory activity of synthesized 3-hydroxy-4'-carboxyflavone from the nature of

substituting group in C-6 position, which grew in the sequence: methyl, methoxy, chlorine, ethyl and bromine derivatives. Additional inclusion of hydrophobic substituting group in C-8 position of cycle «A» also increased inhibitive activity of flavones in the attitude to CK2, i.e. 6,8-disubstituted derivatives were more active comparing with mono 6-substituted derivatives. The decisive influence of hydroxyl group in C-3 position on inhibitors' activity was revealed. The specificity study of inhibitive activity of the most active derivatives of 3-hydroxy-4'-carboxyflavone – **4.21** and **4.26** – was carried out for five serine/threonine (CK2, ASK1, JNK3, Aurora A, ROCK1) and for three tyrosine protein kinases (FGFR1, Met, Tie2), and by the results of which high CK2 inhibitive selectivity was revealed.

On the base of molecular docking results 49 derivatives of non-carboxyl-containing flavones were synthesized, including 2 compounds, which demonstrated inhibitory activity against CK2 in the nanomolar concentration range. A series of new 5-dialkylaminomethyl derivatives of 6-hydroxyflavones were synthesized. According to the reaction of 6-hydroxyflavones with anilines [1,3]-oxazinanes, condensed with ring flavones were synthesized. Chemical modification of C-3-hydroxy substituted reagents with active Cl was carried out. The dependence of the activity of the synthesized compounds is expressed in decisive influence of hydroxy group at position C-3, C-4 'on the activity of inhibitors and it was defined the dependent inhibitory activity of the synthesized flavones from hydrophobic substituent at position C-6, which grew in number: methyl < methoxy < <chlorine < ethyl < bromine derivatives. As a result of further chemical optimization 27 inhibitors of protein kinase CK2 have been developed, IC₅₀ for which were in the range of 4 to 790 nM. Most active 4 inhibitors (**5.94**, **5.102**, **5.104**, **5.105**) showed selectivity on CK2 kinases, comparing with ASK1, Jnk3, FGFR1, Met, Aurora A, Tie2 and the Rock 1. IC₅₀ value for the most active inhibitor **5.105** made 4nM, what is about 100 times lower than fisetin, the most active among the known natural flavones, which are able to inhibit CK2.

First inhibitors of protein kinase CK2 derivatives tetrahalogenphthalimides (IC₅₀ >=150 nM) were found. It was revealed that the inhibitory activity of tetraiodine phthalimides on CK2 is much higher in comparison with tetrabrom- and tetrachlor-derivatives. It was evidenced that tetrahalogenphthalimides have ATP-competitive type of inhibition. Received tetraiodine phthalimides **5.43**, **5.46**, **5.48** and **5.58** showed better inhibitive properties in the attitude to CK2 comparing with TBB inhibitor, which is described in literature, but differently from synthesized by us inhibitors in flavone series, they are not suitable for the development of medicines with multiple characteristics (logP, molecular weight, solubility, presence of multiple halogens).

The synthesized inhibitors of protein kinase CK2 can be regarded as potential precursors of drugs, which in case of further optimization can be used in clinical practice for the treatment of cancer and inflammatory diseases.

Keywords: tetrahalogenphthalimide, 4,5,6,7-tetrahalogen-1H-isoindole-1,3 (2H) – dione, 3-aryloxy-4H-4-chromone, chromone, flavone, flavonol, protein kinase CK2, casein kinase, inhibitor, docking, organic synthesis.