



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86041** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**C07D 215/00**  
**A61P 35/00**

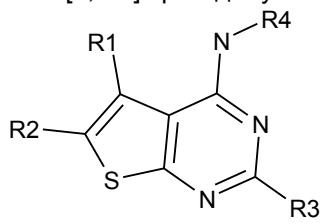
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки:	u 2013 07516	(72) Винахідник(и):	Остринська Ольга Василівна (UA), Баланда Анатолій Олексійович (UA), Бджола Володимир Григорович (UA), Котей Ігор Михайлович (UA), Кухаренко Олександр Петрович (UA), Ярмолюк Сергій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки:	13.06.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.12.2013	(74) Представник:	Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.12.2013, Бюл.№ 23		

**(54) НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ ОРГАНІЧНІ АТФ-КОНКУРЕНТНІ ІНГІБІТОРИ СЕРИН/ТРЕОНІНОВОЇ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 НА ОСНОВІ 4-АМІНО-ТІЄНО[2,3-d]ПІРИМІДИНОВОГО ГЕТЕРОЦИКЛУ****(57) Реферат:**

Низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази СК2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу, отримані шляхом взаємодії 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідину із амінокислотами, загальної формули:

**UA 86041 U**



Пропонована корисна модель належить до інгібіторів протеїнкіназ, які призначені для використання в наукових цілях та фармацевтиці, у моно- або комбінованій терапії для лікування, профілактики або пригнічення захворювань і станів у ссавців та рослин, виникнення яких пов'язане із функціонуванням протеїнкінази CK2, а більш конкретно до

Відомі високоактивні інгібітори протеїнкінази CK2 серед похідних флавону. Серед них кверцетин ( $IC_{50}=0,55 \mu M$ ), апігенін ( $IC_{50}=0,80 \mu M$ ), фізетин ( $IC_{50}=0,35 \mu M$ ), лютеолін ( $K_i=0,50 \mu M$ ) та інші (Lolli G, Cozza G, Mazzorana M, Tibaldi E, Cesaro L, Donella-Deana A, Meggio F, Venerando A, Franchin C, Samo S, Battistutta R, Pinna LA. Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. *Biochemistry*, 2012, 51(31), 6097-6107.). Недоліком даних інгібіторів є їх здатність інгібувати широке коло інших протеїнкіназ та білків.

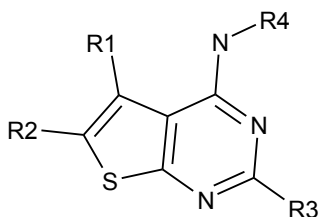
Інші відомі високоактивні інгібітори протеїнкінази CK2 належать до класу антрахінонів (Meggio, F.; Pagano, M.A.; Moro, S.; Zagotto, G.; Ruzzene, M.; Sarno, S.; Cozza, G.; Bain, J.; Elliott, M.; Donella-Deana, A.; Brunati, A.M.; Pinna, L.A. Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An in vitro and in vivo study. *Biochemistry*, 2004, 43, 12931-12936). Першим дослідженим інгібітором з даного класу сполук є Емодин (Emodin) із константою інгібування  $K_i=1,25 \mu M$ . З метою покращити активність Емодину було зроблено ряд модифікацій його scafoldу та отримано інгібітори із субмікромольними величинами  $IC_{50}$ . Серед них MNA ( $K_i=0,78 \mu M$ ), MNX ( $K_i=0,80 \mu M$ ), Хіналізарин (Quinalizarin) ( $K_i=0,055 \mu M$ ) тощо. Зокрема MNA був успішно використаний для залучення CK2 в резистентність до ліків на СЕМ клітинах. Хіналізарин - 1,2,5,8-тетрагідрокси-антрахінон пригнічував ендogenous активність CK2 в НЕК293Т клітинах та індукував апоптоз в клітинах Юрката. Недоліком даних сполук є невисока селективність по відношенню до протеїнкінази CK2. Зокрема Емодин є доволі специфічним інгібітором деяких рецептор-тирозинових протеїнкіназ.

Найбільш успішним низькомолекулярним високоактивним інгібітором протеїнкінази CK2 є 5-(3-хлор-феніламіно)-бензо[с][2,6]нафтіридин-8-карбоксильна кислота (CX-4945). Він має активність  $K_i=0,38 \text{ nM}$  та є селективним і АТФ-конкурентним інгібітором обох ізоформ каталітичної субодиниці CK2 (CK2 $\alpha$  і CK2 $\alpha'$ ) з величиною  $IC_{50} 1 \text{ nM}$ . CX-4945 пригнічує здатність до виживання та ангіогенний сигналінг в лініях ракових клітин, а також проявляє протипухлинну активність на мишачих ксенотрансплантах. Протипухлинний механізм дії інгібітору пов'язаний з пригніченням внутрішньо і зовнішньо-клітинних CK2-залежних процесів, які необхідні для підтримання фенотипу ракових клітин. CX-4945 є єдиним оральним біодоступним низькомолекулярним інгібітором протеїнкінази CK2, який перебуває на першій стадії клінічних випробувань і використовується для лікування прогресуючих солідних пухлин, захворювання Кастельмана та множинної мієломи. (CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy). Недоліком даного інгібітору є недостатня вивченість його побічних ефектів на організм людини.

Жоден з відомих інгібіторів протеїнкінази CK2 не вийшов на фармацевтичний ринок, окрім того, створені на їх основі препарати можуть мати негативну побічну дію. Тому, пошук нових низькомолекулярних селективних інгібіторів даного ензиму залишається актуальним.

В основу корисної моделі поставлена задача винайти нові низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази CK2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу, які б були низькомолекулярними високоактивними органічними АТФ-конкурентними інгібіторами серин/треонінової протеїнкінази CK2 та мали б більшу активність та селективність по відношенню до протеїнкінази CK2.

Поставлена задача вирішується пропонованими низькомолекулярними органічними АТФ-конкурентними інгібіторами серин/треонінової протеїнкінази CK2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу, що отримані шляхом взаємодії 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідину з амінокислотами:



де  $R^1$  - водень, метил,  $R^1=R^2$  - бутилен,  $R^1=R^2$  - бутилен, заміщений  $-CH_3$ , феніл, феніл, заміщений  $-CH_3$ , феніл, заміщений  $-Cl$ , феніл, заміщений  $-F$ , феніл, заміщений діоксиметилом;

$R^2$  - водень, метил, етил, карбоксил, етил-карбоксил, феніл,  $R^1=R^2$  - бутилен,  $R^1=R^2$  - бутилен, заміщений  $-CH_3$ ;

$R^3$  - водень, метил;

$R^4$  - оцтова кислота; пропанова кислота; бутанова кислота; феніл, заміщений 1-2 залишками карбоксилу; феніл, одночасно заміщений карбоксильною та гідроксильною групами; 2-заміщена 3-гідроксипропанова кислота; 2-моноамід бурштинової кислоти; 2-карбоксил- $C_4$ -алкіл; 3- або 4-карбоксил- $C_5$ -алкіл;  $C_5$ -алкіл.

Суть корисної моделі пояснюється за допомогою схематичних креслень, де:

- на фіг. 1 показано графік Лайнуївера-Берка, який зображує пригнічення активності СК2 інгібітором NHTP23. Константа інгібування дорівнює 0,0045 nM;

- на фіг. 2 показано графік Лайнуївера-Берка, який зображує пригнічення активності СК2 інгібітором NHTP25. Константа інгібування дорівнює 0,03 nM;

- на фіг. 3 показано графік Лайнуївера-Берка, який зображує пригнічення активності СК2 інгібітором NHTP33. Константа інгібування дорівнює 0,005 nM;

- на фіг. 4 показано схему синтезу похідних тієно[2,3-d]піримідин-4-аміну.

Запропоновані низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази СК2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу одержували шляхом синтезу з відповідних карбонільних сполук. Спочатку отримували заміщені 2-аміно-3-карбетокситієфени за реакцією Гевальда (у випадку ацетофенонів синтез проводили у дві стадії: спочатку конденсували ціаноцтовий ефір з відповідним ацетофенолом, а далі одержаний продукт циклізували з сіркою). Далі шляхом конденсації з формамідом чи ацетонітрилом було отримано тієнопіримідинони, взаємодією яких з п'ятихлористим фосфором було синтезовано низку 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідинів, що слугували синтонами для подальшого формування комбінаторних рядів. Кінцеві сполуки отримували заміщенням хлору на аміногрупу відповідної амінокислоти.

Контроль за протіканням реакції і чистотою одержаних низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2 проводили за допомогою методу ТШХ на пластинах "Kieselgel 60 F 254" (Merck). Структуру синтезованих речовин встановлювали за допомогою спектрів  $^1H$ -ЯМР, записаних у ДМСО- $D_6$  на приладі "Varian MercuryVRX-400" з робочою частотою 400 МГц і внутрішнім стандартом - ТМС. Одержані результати свідчать про відповідність синтезованих низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2 заявленим.

Визначення інгібувальної активності низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2

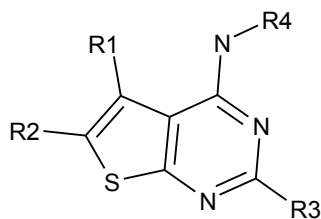
Здатність похідних аміно-тієно[2,3-d]піримідину пригнічувати активність протеїнкінази СК2 була досліджена *in vitro* методом із використанням радіоактивно міченого фосфору (Golub AG, Bdzhola VG, Briukhovetska NV, Balanda AO, Kukharenko OP, Kotey IM, Ostrynska OV, Yarmoluk SM. Synthesis and biological evaluation of substituted (thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ylthio)carboxylic acids as inhibitors of human protein kinase CK2. Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 870-876). Для початку було проведено прескринінг низькомолекулярних органічних інгібіторів на холодензимі СК2 із використанням лише однієї концентрації інгібітору (33 мкМ). Кожен тест проводився у подвійному повторі. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 3 мкл буфера для СК2 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM KCl; 10 mM  $MgCl_2$ ); 3 мкл (6 мкг) пептидного субстрату RRRDDSDDDD (New England Biolabs); 0,02 мкл (10 одиниць) рекомбінантної протеїнкінази СК2 (New England Biolabs); 14,5 мкл дистильованої води. Аліквоту реакційної суміші 19 мкл/пробу поміщали в епендорф об'ємом 1,5 ml. До кожної проби додавали 1 мкл розчину інгібітору попередньо розчиненого в DMSO у необхідній концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші  $Mg^{2+}$ /ATP (150 мкМ ATP, 10 mM  $MgCl_2$ , 15 mM MOPS; pH 7,2) з додаванням ATP, міченого ізотопом фосфору  $^{32}P$ , розведеного до активності 100 мкCi/мкМ. Кінцева концентрація ATP у реакційній суміші становила 50 мкМ. Час інкубації становив 25 хв. при 30 °C. Реакцію зупиняли додаючи 8 мкл 5 % розчину ортофосфорної кислоти, після чого реакційна суміш наносилась на 20 мм диск фосфоцелюлозного паперу (Whatman). Диски відмивались тричі з використанням 0,75 % розчину ортофосфорної кислоти та просувувались при кімнатній температурі. Рівень радіоактивного сигналу вимірювали по методиці Черенкова, використовуючи сцинтиляційний лічильник (Rack Beta, Pharmacia). Як негативний контроль, замість розчину інгібітору додавали DMSO в об'ємі, що дорівнював об'єму розчину інгібітору в DMSO (3,8 %). Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням включення  $^{32}P$  при додаванні інгібітору та за його відсутності. Для інгібіторів, які пригнічували активність СК2 більше ніж на 50 % проводили визначення  $IC_{50}$  за різних концентрацій інгібіторів. Діапазон концентрації сполуки для встановлення  $IC_{50}$  вибирали залежно від залишкової

- активності ензиму. Інгібітор перевіряли при 10 концентраціях, отриманих шляхом двократного розведення. Визначали показники лічильника для кожної концентрації інгібітору та будували залежність в координатах десяткового логарифму концентрації інгібітору ( $\lg[I]$ ) та cps (counts per second). Для середнього значення cps знаходили обернений логарифм концентрації, який дорівнював  $IC_{50}$ .

Хімічні структури замісників та активність низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2 наведено в таблиці 1.

Таблица 1

Хімічні структури замісників 4-аміно-тіено[2,3-d]піримідину їх  $IC_{50}$  ( $\mu M$ )



№	R1	R2	R3	R4	$IC_{50}$ , ( $\mu M$ )
NHTP1	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -		H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP2	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -		H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	9,5
NHTP3	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP4	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -		H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP5	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -		H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	16
NHTP6	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP7	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP8	Ph	H	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP9	CH <sub>3</sub>	COO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP10	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP11	3,4-(CH <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP12	3,4-(CH <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP13	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP14	H	Ph	H	CH-(CH <sub>2</sub> OH)(COOH)	>33
NHTP15	H	Ph	H	CH-(CH <sub>2</sub> ONH <sub>2</sub> )(COOH)	>33
NHTP16	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP17	4,5-(O-CH <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH	>33
NHTP18	H	Ph	CH <sub>3</sub>	CH-(CH <sub>2</sub> NO)(COOH)	>33
NHTP19	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -		H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	>33
NHTP20	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	3,8
NHTP21	H	Ph	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	0,26
NHTP22	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	0,65
NHTP23	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	0,01
NHTP24	Ph	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	1,1
NHTP25	Ph	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	0,065
NHTP26	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	0,83
NHTP27	H	Ph	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	>33
NHTP28	H	Ph	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	1,5
NHTP29	CH <sub>3</sub>	COO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	6,5
NHTP30	Ph	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-p	1,5
NHTP31	H	CH <sub>3</sub>	H	3,5-(COOH)C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	>33
NHTP32	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	0,02
NHTP33	Ph	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	0,008
NHTP34	Ph	CH <sub>3</sub>	H	3-COOH-4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	0,31
NHTP35	H	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-	>33
NHTP36	H	Ph	CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-	>33
NHTP37	H	Ph	CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	>33
NHTP38	H	Ph	CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	>33
NHTP39	CH <sub>3</sub>	COOH	CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	>33
NHTP40	CH <sub>3</sub>	COOH	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH-m	>33

Вивчення кінетичних характеристик низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2

Для трьох низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази СК2, що виявили найбільшу інгібувальну активність по відношенню до протеїнкінази СК2 визначали константу інгібування  $K_i$ . Спочатку за допомогою графічного методу подвійних обернених величин Лайнуївера-Берка знаходили максимальну швидкість реакції ( $v_{\max}$ ) і константу Міхаеліса ( $K_m$ ). Графік залежності будувався в координатах  $1/v_{\text{спт}} \cdot 10^5$  (приймали за  $1/v_0$ ) від  $1/[ATP]$  ( $1/S$ ). Точки перетину ліній із віссю абсцис відповідали  $1/K_m$ , а на осі ординат -  $v_{\max}$ . Будували графік залежності величини  $K_m/v_{\max} \cdot 10^4$  від концентрації інгібітора [I]. Екстраполюючи графік на вісь абсцис, визначали точку перетину з віссю, що чисельно дорівнювала  $K_i$  (Фіг. 1 а, б, в).

Встановлено, що інгібітори NHTP23, NHTP25 та NHTP33 є АТФ-конкурентними інгібіторами протеїнкінази СК2. Константи інгібування дорівнюють 0,0045 нМ, 0,03 нМ та 0,005 нМ, відповідно.

Визначення селективності низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів по відношенню до протеїнкінази СК2.

Селективність низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів по відношенню до протеїнкінази СК2 було перевірено на чотирьох серин/треонінових (ASK1, JNK3, Aurora A та Rock 1) і трьох тирозинових протеїнкіназах (FGFR1, Met і Tie2).

Процедура встановлення величини  $IC_{50}$  інгібіторів на інших протеїнкіназах проводилась аналогічно до методики визначення концентрації інгібування для протеїнкінази СК2 *in vitro*. Відмінним для усіх кіназ був склад суміші для проведення реакції та час інкубації проб.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі ASK1.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (25 мМ MOPS; рН 7,2, 2,5 мМ EGTA, 2,5 мМ EDTA, 0,5 мМ DTT, 0,25 мг/мл BSA, 20 мМ  $\beta$ -гліцерофосфат), 3 мкл розчину пептидного субстрату MBP (концентрація 5 мг/мл), 0,3 мкл розчину протеїнкінази (концентрація 0,1 мкг/мл), 10,3 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші  $Mg^{2+}/ATP$  (150 мкМ АТФ, 10 мМ  $MgCl_2$ , 15 мМ MOPS; рН 7,2) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}P$  розведеного до активності 100 мкСі/мкМ. Час інкубації становив 25 хв. при 30 °С.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі JNK3.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 2,5 мкл 10X-кратного реакційного буферу (500 мМ Tris-HCl; рН 7,5, 1 мМ EGTA, 1 %  $\beta$ -меркаптоетанол), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату (ATF2, амінокислотні залишки 19-96) (концентрація 5 мг/мл), 2,5 мкл розчину протеїнкінази (Upstate/Millipore) (концентрація 10-60 нг/мл), 7,5 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші  $Mg^{2+}/ATP$  (50 мкМ АТФ, 75 мМ  $MgCl_2$ , 20 мМ MOPS; рН 7,2, 1 мМ DTT, 25 мМ  $\beta$ -гліцерофосфат, 1 мМ  $Na_3VO_4$ ) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}P$  розведеного до активності 100 мкСі/мкМ. Час інкубації становив 10 хв. при 30 °С.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі Aurora A.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (75 мМ MOPS; рН 7,1, 1,25 мМ EDTA, 0,5 мг/мл BSA, 0,05 %  $\beta$ -меркаптоетанол, 0,015 % Brij 35), 3 мкл розчину пептидного субстрату Kemptide (концентрація 1,4 мг/мл), 0,02 мкл розчину протеїнкінази (Upstate/Millipore) (концентрація 0,2 мкг/мл), 10 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші  $Mg^{2+}/ATP$  (150 мкМ АТФ, 50 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ MOPS; рН 7,2, 3 мМ EGTA, 0,6 мМ DTT, 0,6 мМ  $Na_3VO_4$ , 15 мМ  $\beta$ -гліцерофосфат) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}P$ , розведеного до активності 100 мкСі/мкМ. Час інкубації становив 20 хв. при 30 °С.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі ROCK1.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 5 мкл 5X-кратного реакційного буферу (40 мМ MOPS; рН 7,0, 1 мМ EDTA), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату Long S6 Kinase substrate (концентрація 1,96 мг/мл), 0,3 мкл розчину протеїнкінази (концентрація 1 мкг/мл), 12,2 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші  $Mg^{2+}/ATP$  (1:1) з додаванням АТФ, міченого ізотопом фосфору  $^{32}P$  розведеного до активності 100 мкСі/мкМ. Час інкубації становив 30 хв. при 30 °С.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі FGFR1.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (50 mM MOPS; pH 7,1, 1 mM EDTA, 1 мг/мл BSA, 0,1 % β-меркаптоетанол, 0,01 % Brij 35, 0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату IGR-IRtide (концентрація 4 мг/мл), 0,01 мкл розчину протеїнкінази (UpstateXMiUpore) (концентрація 0,2 мкг/мл), 10,5 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg<sup>2+</sup>/ATP (150 мкМ ATP, 35 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1,5 mM HEPES; pH 7,5) з додаванням ATP, міченого ізотопом фосфору <sup>32</sup>P розведеного до активності 100 мкCi/мкМ. Час інкубації становив 25 хв. при 30 °C.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі c-MET.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5X-кратного реакційного буферу (50 mM MOPS; pH 7,1, 0,6 mM EDTA, 0,5 мг/мл BSA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 mM β-гліцерофосфат, 0,05 % β-меркаптоетанол), 3 мкл розчину пептидного субстрату KKKSPGEYVNIIEFG (концентрація 4 мг/мл), 0,3 мкл розчину протеїнкінази (Upstate\Millipore) (концентрація 1 мкг/мл), 9,8 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg<sup>2+</sup>/ATP (150 мкМ ATP, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS; pH 7,2, 3 mM EGTA, 0,5 mM DTT) з додаванням ATP, міченого ізотопом фосфору <sup>32</sup>P розведеного до активності 100 мкCi/мкМ. Час інкубації становив 30 хв. при 30 °C.

Склад суміші та час інкубації проб для визначення ефективності інгібіторів на протеїнкіназі Tie2.

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 5 мкл 5X-кратного реакційного буферу (50 mM MOPS/NaOH; pH 7,0, 1 mM EDTA), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату Poly(Glu<sub>4</sub>-Tyr) (Upstate\Millipore) (концентрація 1 мг/мл), 1,25 мкл 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл розчину протеїнкінази (концентрація 35,8-71,5 нг), 3,75 мкл дистильованої води. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали 10 мкл суміші Mg<sup>2+</sup>/ATP (150 мкМ ATP, 10 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>) з додаванням ATP, міченого ізотопом фосфору <sup>32</sup>P, розведеного до активності 100 мкCi/мкМ. Час інкубації становив 10 хв. при 30 °C.

Результати тестів показали, що запропоновані низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази CK2 на основі 4-аміно-тіено[2,3-d]піримідинового гетероциклу при концентрації 10 μM незначно пригнічують активність кіназ (табл. 2). Найбільшу інгібувальну активність виявлено проти Aurora A. Проте у порівнянні із ступенем пригнічення активності CK2 нею можна знехтувати.

Таблиця 2

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при додаванні інгібітору в концентрації 10 μM

№	CK2	ASK1	Jnk3	FGFR	Met	Aurora A	Tie 2	Rock 1
NHTP23	1,14	122	85,7	80,5	53,7	36,2	109	105,8
NHTP25	1,51	122	89,5	78,9	71,5	38,9	119,7	88,6
NHTP33	0,91	112	70,3	73,9	87,2	15,3	84,2	101,5

Таким чином, похідні 4-аміно-тіено[2,3-d]піримідину проявляють високу інгібувальну активність по відношенню до протеїнкінази CK2 та є її АТФ-конкурентними і селективними інгібіторами. Це дозволяє використовувати винайдені низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази CK2 на основі 4-аміно-тіено[2,3-d]піримідинового гетероциклу, а також композиції, що містять їх, в наукових цілях та фармацевтиці, а саме: для встановлення ролі протеїнкінази CK2 в сигнальних шляхах клітини, для визначення впливу на активність інших серин/протеїнових та тирозинових протеїнкіназ, для пригнічення активності протеїнкінази CK2 в експериментах на клітинних лініях, а також як фармацевтичний препарат у моно- та комбінованій терапії для лікування, профілактики або пригнічення захворювань і станів у ссавців та рослин, виникнення яких пов'язане із функціонуванням протеїнкінази CK2.

Детальні методики одержання низькомолекулярних органічних АТФ-конкурентних інгібіторів серин/треонінової протеїнкінази CK2.

Всі похідні тіено[2,3-d]піримідинів синтезували з відповідних карбонільних сполук згідно з Схемою 1 (Фіг. 2). Спочатку отримували заміщені 2-аміно-3-карбетокситіофени за реакцією Гевальда (у випадку ацетофенонів синтез проводили у дві стадії: спочатку конденсували

ціаноцтовий ефір з відповідним ацетофеноном, а далі одержаний продукт циклізували з сіркою) (методика 1). Далі шляхом конденсації з формамідом чи ацетонітрилом було отримано тієнопіримідинони (методики 2, 3), взаємодією яких з п'ятихлористим фосфором було синтезовано низку 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідинів (методика 4), що слугували синтонами для

подальшого формування комбінаторних рядів. Кінцеві сполуки отримували заміщенням хлору на аміногрупу відповідної амінокислоти (Методики 5, 6).

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

Методика 2. До 1 моля отриманого амініотієну приливали еквімолярну кількість формаміду і витримували отриманий розчин 24 год. при температурі 160-170 °С. Контроль за протіканням реакції вели за допомогою тонкошарової хроматографії (рухома фаза - хлороформ - метиловий спирт (9:1)). По закінченні конденсації гарячий розчин реакційної суміші розбавляли ізопропіловим спиртом, охолоджували, отримані кристали відфільтровували, промивали ізопропанолом, водою та висушували в шафі-термостаті (60 °С). Вихід 85-90 %.

Методика 3. До 0,01 моля відповідного амініотієну приливали 30 мл діоксану, 0,85 мл ацетонітрилу та 30 мл діоксану насиченого хлороводнем. Отриману суміш перемішували 12 год. при кімнатній температурі та нейтралізовували розчином аміаку. Отримані кристали відфільтровували, промивали ізопропанолом та водою. Вихід 85-90 %.

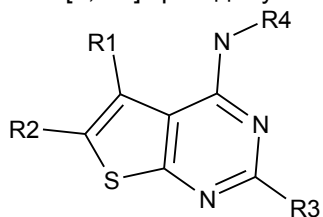
Методика 4. До 0,01 моля отриманого тієнопіримідинону додають 11 мл оксихлориду фосфору і 1,5 г п'ятихлористого фосфору, суміш швидко доводять до кипіння і кип'ятять 5-6 год. Розчинник ретельно випаровують до сухого залишку, який розчиняють в хлористому метilenі і вливають в охолоджений розчин 0,5н лугу. Суміш розділяють, органічний шар обезводнюють і випаровують розчинник. Залишок за необхідності перекристалізують з ізопропілового спирту. Вихід 70-80 % від теоретичного.

Методика 5. До 0,011 моля амінокислоти, розчиненої у мінімальній кількості води, додають 15 мл етанолу, 0,5 мл триетиламіну та 0,01 моля вихідної сполуки, отриману суміш нагрівають при кипінні 24 год., розчинник випаровують, залишок послідовно перекристалізують з етилового спирту та води. Вихід 30-80 %.

Методика 6. Суміш 0,01 моля 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідину, 0,011 моля амінобензойної кислоти та 2 мл ДМФА кип'ятять 6 годин. Осад, що утворюється після охолодження фільтрували та промивали ацетоном. Для отримання речовин у вигляді основ виділений гідрохлорид розчиняли у спирті та додавали триетиламін. Вихід 60-80 %.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Низькомолекулярні органічні АТФ-конкурентні інгібітори серин/треонінової протеїнкінази СК2 на основі 4-аміно-тієно[2,3-d]піримідинового гетероциклу, отримані шляхом взаємодії 4-хлоро-тієно[2,3-d]піримідину із амінокислотами, загальної формули:



де  $R^1$  - водень; метил;  $R^1=R^2$  - бутилен;  $R^1=R^2$  - бутилен, заміщений  $-CH_3$ ; феніл; феніл, заміщений  $-CH_3$ ; феніл, заміщений  $-Cl$ ; феніл, заміщений  $-F$ ; феніл, заміщений діоксиметилом;  
 $R^2$  - водень; метил; етил; карбоксил; етилкарбоксил; феніл;  $R^1=R^2$  - бутилен;  $R^1=R^2$  - бутилен, заміщений  $-CH_3$ ;  
 $R^3$  - водень; метил;  
 $R^4$  - оцтова кислота; пропанова кислота; бутанова кислота; феніл, заміщений 1-2 залишками карбоксилу; феніл, одночасно заміщений карбоксильною та гідроксильною групами; 2-заміщена 3-гідроксипропанова кислота; 2-моноамідбурштинової кислоти; 2-карбоксил- $C_4$ -алкіл; 3- або 4-карбоксил- $C_5$ -алкіл;  $C_5$ -алкіл.



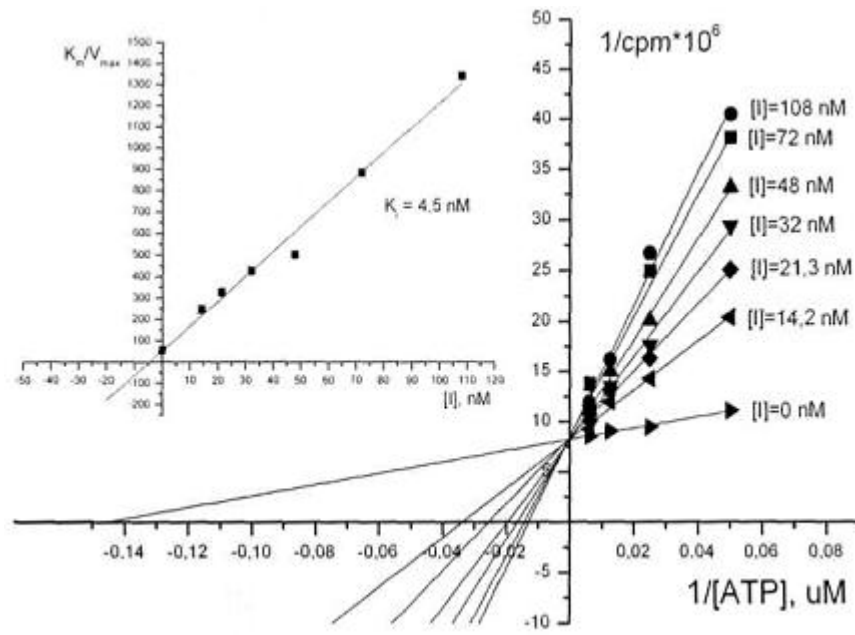


Fig. 1

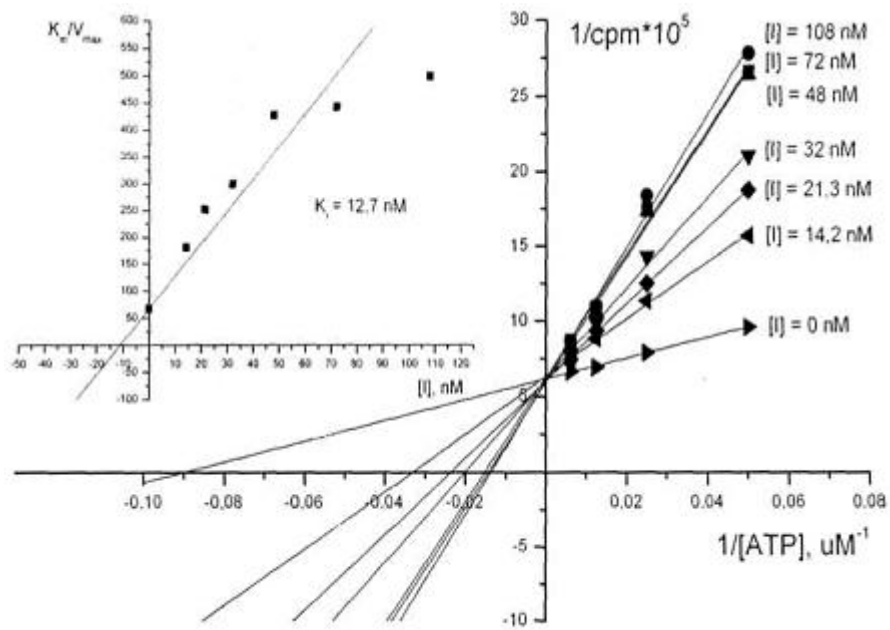
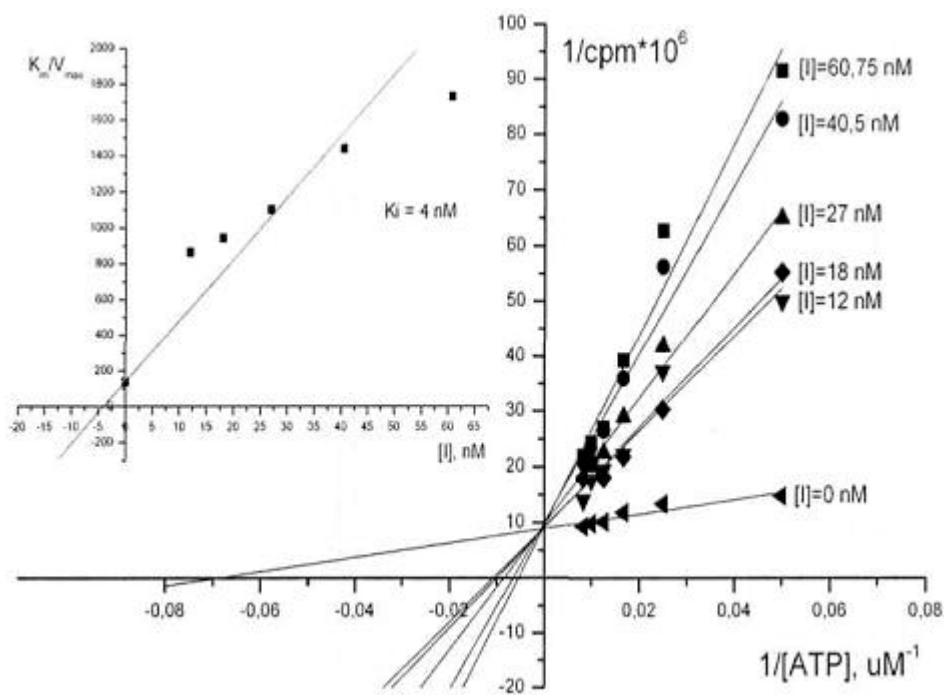
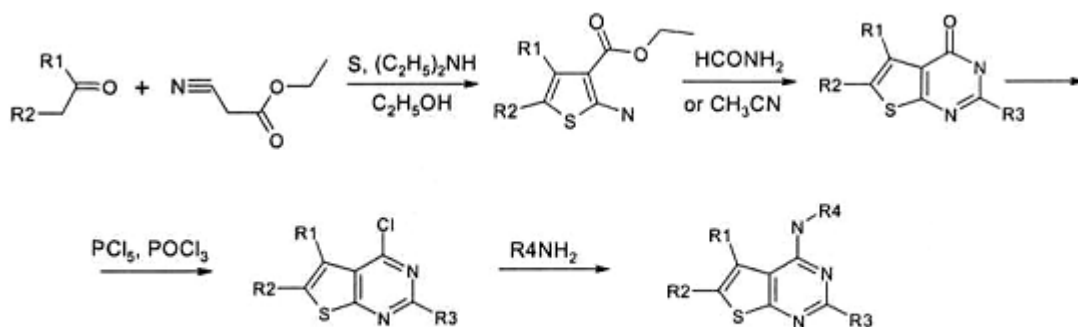


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4