

Пропонований винахід стосується винайдення нового класу інгібіторів протеїнкінази СК2-4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів.

Протеїнкіназа СК2 (казеїн кіназа II) задіяна в багатьох сигнальних шляхах клітинного росту та проліферації. СК2 кіназа виявляє інгібуючий вплив на певні клітинні механізми контролю апоптозу і вносить позитивний внесок у формування онкогенного потенціалу клітини, гіперекспресія цієї кінази у швидко проліферуючих тканинах та в багатьох пухлинах дозволяє розглядати СК2 як суттєвий фактор процесів пухлиноутворення. СК2 кіназа -перспективна мішень для створення протиракових ліків, а інгібітори СК2 кінази можуть використовуватися у терапії раку (1: Pinna L. Protein Kinase CK2 // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* - 1997. - 29. - P.551-554); (2: Ravi R., Bedi A. Sensitization of Tumor Cells to Apo2 Ligand/TRAIL-induced Apoptosis by Inhibition of Casein Kinase II // *Cancer Res.* - 2002. - 62. - P.4180-4185); (3: Samo S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistuta R., Zanotti G., Pinna L. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors (In Process Citation) // *Pharmacol Ther.* - 2002. - 93(2-3). - P.159).

Відомо, що механізм дії деяких противірусних препаратів проти людського цитомегаловірусу (HCMV) та HIV-1 полягає у інгібуванні СК2-кінази, яка опосередковано спричиняє підсилення експресії гену HIV-1 або HCMV на транскрипційному рівні. Таким чином, інгібітори СК2 є інгібіторами транскрипції HIV-1 і можуть бути використані як противірусні препарати (4: Critchfield J. W., Coligan J. E., Folks T. M., Butera S. T. Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors // *Biochem.* - 1997. - 94. - P.6110-6115); (5: De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immune-deficiency virus (HIV-1) infection // *Med. Res. Rev.* - 2000. - 20(5). - P.323-349).

Серед відомих інгібіторів СК2-кінази є поліпептиди (6: Meggio F., Pinna L. A., Marchiori F., Borin G. Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases // *FEBS Lett.* - 1983. - 162(2). - P.235-238), похідні бензімідазолу (7: Szyszka R., Grankowski N., Felczak K., Shugar D. Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK1 and CK2 from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - 208. - P.418-424) та бензотриазолу (8: Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M., Davies S. P., Donella-Deana A., Shugar D., Pinna L. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ("casein kinase") // *FEBS Lett.* - 2001. - 496. - P.44-48); (9: Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L. A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetrabromobenzotriazole // *Protein Sci.* - 2001. - 10. - P.2200-2206), флавоноїди, похідні антрахінону, нафталіну, ксантену та флуорену (3), хіназоліну (10: Liu XG., Liang NC. Inhibitory effect and its kinetic analysis of tyrphostin AG1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme // *Acta Pharmacol Sin.* - 2002. - 23(6). - P.556-561), ізохіноліну (11: Chijiwa T., Hagiwara M., Hidaka H. A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis // *J. Biol. Chem.* - 1989. - 264(9). - P.4924-4927).

Але, ефективність та специфічність згаданих інгібіторів, особливо флавоноїдів, є недостатньою для застосування в клінічній фазі досліджень.

Отже, пошук високоспецифічних інгібіторів СК2, що пригнічували б активність СК2 у низьких концентраціях є актуальним завданням.

Авторами цієї заявки встановлено, що серед похідних 1,3-ізоіндоліндіону (фталіміду) інгібіторів СК2-кінази раніше знайдено не було.

В основу пропонованого винаходу поставлена задача: синтез 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів, визначення їх інгібіторних властивостей щодо СК2 кінази та селективності по відношенню до інших протеїнкіназ.

Поставлена задача вирішується пропонованим винаходом, а саме, застосуванням 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів як інгібіторів протеїнкінази СК2.

Суть винаходу пояснюється за допомогою графічних матеріалів:

На фіг.1 показано загальну структуру ряду 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів.

На фіг.2 показано залежність активності СК2 кінази від концентрації інгібіторів 3.1(б), 3.2(а), 3.6(г), 3.9(в).

Авторами проведено синтез ряду 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів та виявлено інгібіторні властивості щодо СК2 кінази. Серед тестованих 49 похідних найвищу активність показали: 2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1Н-2-ізоіндоліл)пропанова кислота (а) ($IC_{50}=0,15 \mu M$); 2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1Н-2-ізоіндоліл)оцтова кислота (б) ($IC_{50}=0,39 \mu M$); 3-гідроксиб-тетрайодо-1,3-діоксо-3-дігідро-1А'-2-ізоіндоліл)пропанова кислота (в) ($IC_{50}=0,41 \mu M$); 3-феніл-2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1/2-ізоіндоліл)пропанова кислота (г) ($IC_{50}=1,1 \mu M$) (загальну структуру ряду 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів наведено на фіг.1, хімічні структури сполук а, б, в, г - в таблиці 2).

Матеріали і методи. Контроль за проходженням реакції та чистотою синтезованих сполук здійснювався хроматографічне на пластинках "Silufol UV-254", елюент: хлороформ - метанол (9:1). Структуру одержаних сполук доведено за допомогою ПМР-спектрів. Спектри ПМР записані в ДМСО- D_6 на приладі "Varian" з робочою частотою 300МГц і внутрішнім стандартом -тетраметилсиланом. Величини хімічних зсувів визначались з точністю до 0.001м.ч.

Синтез 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів (1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10) 4,5,6,7-Тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіони (1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10) були синтезовані модифікацією методів (12-14).

Розчин 0.01моль 4,5,6,7-тетрагалогенфталевого ангідриду і 0.011моль відповідної амінокислоти у 5мл диметилформаміду кип'ятили 5 хвилин, охолоджували, виливали у воду, фільтрували. Виходи сполук 1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10; 85-93%.

4,5,6,7-Тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіони були тестовані на інгібування активності CK2 кінази *in vitro*. Об'єм реакційної суміші був 30мкл. Для буферу використовувалось 20μM Tris-HCl, pH7,5 при 25°C; 50 μM KCl; 10μM MgCl. Для кожної реакції брався: 1 мікрограм пептидного субстрату (~500μM; England Biolabs); 10 одиниць (0.02мкл при концентрації 500000/мл у водному буферному розчині) рекомбінантної людської CK2 кінази (England Biolabs).

Реакційна суміш готувалася без додавання АТФ при кімнатній температурі, була поділена на аліквоти по 1,5мл. До реакційної суміші додавали 1-0,5мкл стокового розчину інгібітору у 100% ДМСО з концентрацією 5μM. Кожна реакція повторювалася двічі, одержаний результат не відрізнявся більш, ніж на 10-15%.

Розчин АТФ готувався окремо. Для кожної реакції бралось 0,05mCi γ-P³² АТФ. Фінальна концентрація АТФ була 33μM, загальна концентрація міченої та неміченої АТФ-40μM. Реакція починалася після додавання до суміші АТФ. Час реакції - 20 хвилин при Т30°C (у знайдених умовах експотенційна фаза реакції закінчується за 25-30 хвилин). Реакцію зупиняли додаванням 20мкл 5% фосфорної кислоти і переносили продукти реакції на 20мм фільтр із целюлозо-фосфатного паперу (Whatman). Фільтр промивали тричі 0,5% фосфорною кислотою на шейкері в 200мм чашці Петрі при кімнатній температурі і висушували при 36°C.

Для детекції мічених продуктів використовували LKB γ-лічильник Черенкова. Для позитивного контролю використовували ДМСО без інгібітора у тій же кількості - 1мкл, що і у досліді з розчином інгібітора в ДМСО. Негативний контроль проводився з використанням відомого інгібітора CK2 кінази - кверцитину, що при концентрації 0,8-0,5μM інгібував активність CK2 кінази на 70-50%. Контроль над неспецифічною адсорбцією (без додавання ензиму) проводився час від часу і не перевищував 5%.

На першому етапі здійснювався прескринінг сполук при концентрації досліджуваної речовини-інгібітора 10μM.

Результати і обговорення. Нами синтезовано та тестовано на інгібування активності CK2 кінази *in vitro* 49 похідних 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіону (1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10) (фіг.1). Результати прескринінгу, хімічні структури (або назви) замісників R; Hal сполук 1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10 наведені в Таблиці 1 та на фіг.1. Дані прескринінгу свідчать про те, що сполуки 1.7, 1.9, 2.14-2.16, 2.32 інгібують активність CK2 кінази при концентрації 10μM більше, ніж на 60%, вони були відібрані для більш детального дослідження при декількох концентраціях. Знайдені для сполук 3.1-3.6, 3.9, 3.10 величини IC₅₀ та хімічні структури наведено у Таблиці 2. Найбільш активними інгібіторами виявилися сполуки: 3.2 (IC₅₀=0.15 μM), 3.1 (IC₅₀=0.39 μM), 3.9 (IC₅₀=0.41 μM), 3.6 (IC₅₀=1.1 μM). З метою дослідження селективності інгібіторів 3.1, 3.2, 3.6, 3.9 по відношенню до CK2 кінази було проведено біологічні тести на інгібування інших протеїніназ:

GSK3 та CDK5. Встановлено, що для цих кіназ IC₅₀>10 μM для всіх чотирьох сполук 3.1, 3.2, 3.6, 3.9, тобто ці дані дають можливість говорити про селективну дію сполук 3.1, 3.2, 3.6, 3.9 на CK2 кіназу.

Для тестованого ряду 49 похідних 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіону можна зробити деякі висновки стосовно залежності інгібіторної активності від структури сполуки. Серед 19 похідних 4,5,6,7-тетрафлоро-1,3-ізоіндоліндіону (1.1-1.19) значного інгібування CK2-кінази не виявлено. Сполука 1.17 (Hal=Cl; R=CH(COOH)CH₂-(3-індоліл)) при концентрації 10μM інгібує CK2-кіназу на 33% (табл.1). Заміна атомів хлору на бром сприяє невеликому підвищенню інгібіторних властивостей. Так, для сполук 1.1 та 2.2 інгібування збільшується на 17%, сполука 2.2 при концентрації 10μM інгібує CK2-кіназу на 46% (сполука 1.1 - на 29%). В середньому при заміні атомів хлору на бром інгібування CK2-кінази підвищується на 19.3%. Заміна бром на йод ще більше підвищує інгібіторні властивості сполук. Всі протестовані похідні 4,5,6,7-тетрайодо-1,3-ізоіндоліндіону (3.1-3.10) інгібують CK2-кіназу з IC₅₀ від 0.15 до 12μM. Таким чином, для 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіонів інгібіторна активність збільшується в залежності від галогенів-замісників у такій послідовності: J>>Br>Cl.

Отже, знайдено новий клас інгібіторів CK2 кінази - 4,5,6,7-тетрагалогено-1,3-ізоіндоліндіони. Серед тестованих 49 похідних найвищу активність показали: 2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1-Н-2-ізоіндоліл)пропанова кислота (а) (IC₅₀=0.15 μM); 2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1/2-ізоіндоліл)оцтова кислота (б) (IC₅₀=0.39 μM); 3-гідрокси-2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1/2-ізоіндоліл)пропанова кислота (в) (IC₅₀=0.41 μM); 3-феніл-2-(4,5,6,7-тетрайодо-1,3-діоксо-2,3-дігідро-1/2-ізоіндоліл)пропанова кислота (г) (IC₅₀=1.1 μM), що може бути використано для подальшої оптимізації активних структур і використанні їх для терапії раку та противірусних захворювань.

Таблиця 1

Результати прескринінгу сполук 1.1-1.19; 2.1-2.20; 3.1-3.10
(концентрація потенційного інгібітора - 10μM)

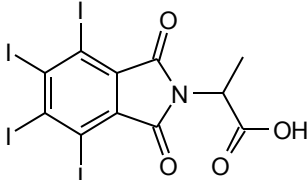
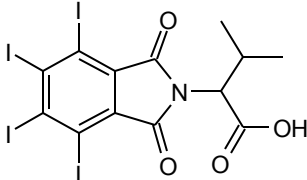
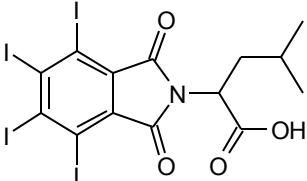
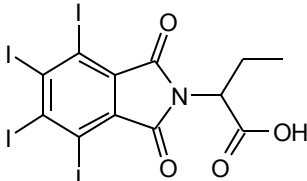
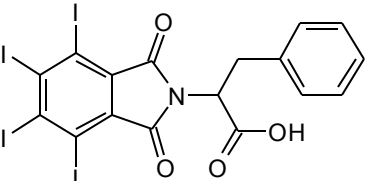
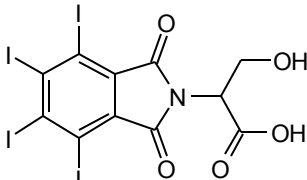
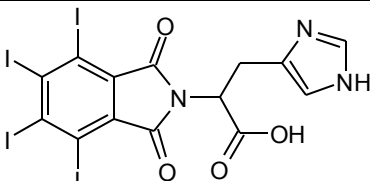
№	Замісники		Залишкова активність CK2 кінази, %
	Hal	R	
1.1	Cl	-CH ₂ COOH	71
1.2	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH(CH ₃) ₂	112

1.3	Cl	-CH(COOH)CH ₂ Ph	91
1.4	Cl	-CH(COOH)CH ₃	98
1.5	Cl	-CH(COOH)CH(CH ₃) ₂	103
1.6	Cl	-CH ₂ CH ₂ COOH	100
1.7	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH ₃	101
1.8	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ COOH	89
1.9	Cl	-(3-COOH-C ₆ H ₄)	108
1.10	Cl	-(2-COOH-C ₆ H ₄)	95
1.11	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	104
1.12	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ CH ₃	117
1.13	Cl	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ COOMH ₂	94
1.14	Cl	-CH(COOH)CH ₂ OH	103
1.15	Cl	-CH(COOH)CH(OH)CH ₃	104
1.16	Cl	-CH(COOH)CH ₂ -(4-імідазоліл)	115
1.17	Cl	-CH(COOH)CH ₂ -(3-індоліл)	67
1.18	Cl	-CH ₂ -CONH-CH ₂ COOH	104
1.19	Cl	-CH(COOH)CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	80
2.1	Br	-CH(COOH)CH ₃	70
2.2	Br	-CH ₂ COOH	54
2.3	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH(CH ₃) ₂	80
2.4	Br	-CH(COOH)CH ₂ Ph	80
2.5	Br	-CH(COOH)CH(CH ₃) ₂	97
2.6	Br	-CH ₂ CH ₂ COOH	78
2.7	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH ₃	82
2.8	Br	-CH(COOH)CH ₂ COOH	89
2.9	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ COOH	100
2.10	Br	-(3-COOH-C ₆ H ₄)	73
2.11	Br	-(2-COOH-C ₆ H ₄)	95
2.12	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	63
2.13	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ CH ₃	71
2.14	Br	-CH(COOH)CH ₂ CH ₂ COOMH ₂	88
2.15	Br	-CH(COOH)CH ₂ OH	75
2.16	Br	-CH(COOH)CH(OH)CH ₃	69
2.17	Br	-CH(COOH)CH ₂ -(4-імідазоліл)	81
2.18	Br	-CH(COOH)CH ₂ -(3-індоліл)	94
2.19	Br	-CH ₂ -CONH-CH ₂ COOH	71
2.20	Br	-CH(COOH)CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	92
3.1	J	-CH ₂ COOH	15
3.2	J	-CH(COOH)CH ₃	3
3.3	J	-CH(COOH)CH(CH ₃) ₂	23
3.4	J	-CH(COOH)CH ₂ CH(CH ₃) ₂	28
3.5	J	-CH(COOH)CH ₂ CH ₃	31
3.6	J	-CH(COOH)CH ₂ Ph	8.5
3.7	J	-CH(COOH)CH ₂ COOH	58
3.8	J	-(3-COOH-C ₆ H ₄)	59
3.9	J	-CH(COOH)CH ₂ OH	26
3.10	J	-CH(COOH)CH ₂ -(4-імідазоліл)	36

Таблиця 2

Хімічні структури та IC₅₀ активних сполук
3.1-3.6, 3.9, 3.10

№	Хімічна структура	IC ₅₀ , μM
3.1(б)		0,39

3.2(a)		0.15
3.3		1.4
3.4		7.15
3.5		1.8
3.6(r)		1.1
3.9(b)		0.41
3.10		6.02

Література:

1. Pinna L. Protein Kinase CK2 // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* - 1997. - 29. - P.551-554.
2. Ravi R., Bedi A. Sensitization of Tumor Cells to Apo2 Ligand/TRAIL-induced Apoptosis by Inhibition of Casein Kinase II // *Cancer Res.* - 2002. - 62. - P.4180-4185.
3. Sarno S., Moro S., Meggio F., Zagotto G., Dal Ben D., Ghisellini P., Battistuta R., Zanotti G., Pinna L. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors (In Process Citation) // *Pharmacol Ther.* - 2002. - 93(2-3). - P.159.
4. Critchfield J. W., Coligan J. E., Folks T. M., Butera S. T. Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors // *Biochem.* - 1997. - 94. - P.6110-6115.
5. De Clercq E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immune-deficiency virus (HIV-1) infection // *Med. Res. Rev.* - 2000. - 20(5). - P.323-349.
6. Meggio F., Pinna L. A., Marchiori F., Borin G. Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases // *FEBS Lett.* - 1983. - 162(2). - P.235-238.
7. Szyszka R., Grankowski N., Felczak K., Shugar D. Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK1 and CK2 from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - 208. - P.418-424.

8. Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M., Davies S. P., Donella-Deana A., Shugar D., Pinna L. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ("casein kinase") // FEBS Lett. - 2001. - 496. - P.44-48.

9. Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L. A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetrabromobenzotriazole // Protein Sci. - 2001. - 10. - P. 2200-2206.

10. Liu XG., Liang NC. Inhibitory effect and its kinetic analysis of tyrphostin AG1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme // Acta Pharmacol Sin. - 2002. - 23(6). - P.556-561.

11. H.Chijiwa T., Hagiwara M., Hidaka H. A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis // J. Biol. Chem. - 1989. - 264(9). - P.4924-4927.

12. Синтези органічних препаратів, Сбірник 12. - М.: Мир, 1964. - С.165-167.

13. Гринштейн Дж., Виноц М. Хімія амінокислот і пептидів. - М.: Мир, 1965. - С.406-407.

14. Фізер Л., Фізер М. Реагенти для органічного синтезу. - М.: Мир, Т.4. - 1971 - С115-116.

