

Хіназолінові інгібітори протеїнкінази FGFR1

А.А. Грищенко¹, В.Г. Бджола¹, С.С. Лукашов¹, Л.В. Плетньова¹,
Р.В. Чепурна¹, І.В. Житнецький², С.М. Ярмолук^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

² Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

Резюме. Протеїнкіназа FGFR1 відіграє ключову роль у процесі пухлинної трансформації тканин і онко-васкулогенезу. Препарати на основі інгібіторів цієї кінази можуть використовуватися для лікування пухлин. Нами проведено пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних хіназолінів. З 1256 похідних хіназоліну методом віртуального скринінгу було відібрано 40 сполук. З них найбільш активним за результатами біологічного тестування виявився 4-хлор-2-(6,7-диметоксихіназолін-4-аміно)-фенол зі значенням IC₅₀ 0,1 мкМ. Вивчено взаємозв'язок «структура—активність» досліджених сполук і запропоновано модель зв'язування сполук цього класу з АТФ-зв'язувальним сайтом FGFR1.

Ключові слова: протеїнкіназа FGFR1, хіназоліни, докінг.

Вступ. Рецептор фактора росту фібробластів 1 (FGFR1) — трансмембранний білок, що відноситься до групи рецепторних тирозинових протеїнкіназ [1]. Фактори росту фібробластів — група структурно споріднених білків, що мають мітогенний вплив на велику кількість типів клітин і є важливою ланкою в механізмі проліферації клітин [2]. Передачу сигналу від факторів росту фібробластів у середину клітин забезпечує FGFR1. Її екстрацелюлярна частина зв'язується з факторами росту, що спричиняє димеризацію рецептора й аутофосфорилування цитоплазматичного кіназного домену і через ряд адапторних білків активує кілька сигнальних каскадів у клітині (RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, PLCγ, JAK/STAT) [3]. Дослідниками показано роль FGFR1 в утворенні мезенхімальної тканини в процесі ембріогенезу, ангиогенезі, диференціації м'язових і жирових клітин, в ембріонально-

му розвитку деяких органів [8]. Мутації FGFR1 призводять до порушень розвитку, таких як синдроми Пфайфера і Каллмана [4]. Основна роль FGFR1 у дорослому організмі — участь у процесі ангиогенезу [5]. У нормі ангиогенез протікає під час вагітності, менструального циклу, заживання ран. Також утворення нових кровоносних судин є необхідною умовою росту солідних пухлин. Доведено участь FGFR1 у процесі онкогенного ангиогенезу [6]. FGFR1 також може брати безпосередню участь в онкогенезі завдяки своїй проліферативній дії [7]. Підвищена активність FGFR1 відмічена при таких онкологічних захворюваннях, як лімфома, рак простати, рак сечового міхура, гліобластома, меланома та ін. [9].

Інгібітори FGFR1 можуть бути використані для лікування деяких онкогенних захворювань, при яких спостерігається підвищена активність цієї кінази. На сьогодні знайдено кілька інгібіторів FGFR1, деякі з них знаходяться на стадії клінічних випробувань [10]. В основному це інгібітори рецепторних тирозинових протеїнкіназ VEGFR, EGFR і PDGFR, що одночасно інгібують структурно і функціонально

*Corresponding author.
Tel./fax: +38044-5222458
E-mail address: yarmoluksm@gmail.com

близьку до них FGFR1. Нині існує лише один клас селективних інгібіторів FGFR1, але через високу токсичність вони не придатні для введення в клінічну практику. Тому пошук селективних інгібіторів FGFR1 з метою розробки протипухлинних препаратів продовжується.

Сполуки класу хіназолінів відомі як сильні інгібітори рецепторної тирозинової протеїнкінази EGFR [11]. Гефетиніб та ерлотиніб — інгібітори EGFR, що використовуються як протипухлинні препарати в клінічній практиці. Протеїнкіназа VEGFR, яка разом із EGFR і FGFR також належить до родини рецепторних тирозинових протеїнкіназ та має високий процент гомології і структурної подібності з ними, також має досить багато активних інгібіторів серед сполук класу хіназолінів [18]. Ученими також показано інгібування хіназолінами деяких інших протеїнкіназ — MNK1, Src, erbB-4. Метою нашої роботи був пошук активних інгібіторів FGFR1 серед сполук класу хіназолінів і спроба знайти особливості структури, які забезпечують селективне інгібування FGFR1 з метою використання цих результатів під час оптимізації інших класів інгібіторів цієї кінази.

Методи. Сполуки із загальної бази даних відбирали методом пошуку субструктур хіназолінового гетероциклу. За допомогою програми VEGA ZZ 2.4 для відібраних сполук отримано трьохвимірні мінімізовані структури з емпіричними частковими зарядами Гастейгера [12]. Ці структури були використані для докінгу в АТФ-зв'язувальний центр кінази FGFR1 (код 3GQI на www.rcsb.org). Докінг проводився програмою Autodock 4.2 [13], конвертацію лігандів і приготування рецептора зроблено за допомогою скриптів Autodock-Tools [13]. Використано такі параметри докінгу: розмір популяції збільшено до 300, число циклів мінімізації — 100000, кількість вихідних позицій ліганду — 20, алгоритм кросінг-оверу — arithmetic, інші параметри залишено без змін. Позицію ліганду з мінімальною енергією зв'язування з рецептором застосовували для аналізу зв'язування з кіназою. Для оцінки енергії зв'язування ліганду з рецептором було використано консенсусний скоринг оцінки енергії зв'язування, визначеної внутрішньою функцією Autodock і програмою XScore [14]. На основі консенсусної оцінки енергії зв'язу-

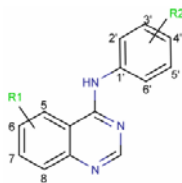
вання лігандів з АТФ-зв'язувальним центром FGFR1 і візуальної інспекції відбиралися сполуки для тестів інгібування кіназної активності FGFR1 *in vitro*.

Для біологічних тестувань *in vitro* використовували кіназний домен людської FGFR1. Для інгібування FGFR1 застосовували метод визначення фосфорилування синтетичного пептидного субстрату кіназою в присутності γ - ^{32}P -АТФ [15]. Концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Як негативний контроль використовували пробу, до якої замість сполук-інгібіторів вносили розчинник ДМСО. Концентрація сполук становила 33 мкМ.

Для сполук, які зменшували активність кінази більш ніж до 30 % від контролю, будували титрувальні криві залежності активності ферменту від концентрації інгібітору і за цими кривими визначали значення IC_{50} .

Обговорення. Для тестування інгібіторної активності сполук класу хіназолінів із загальної бібліотеки сполук відділу комбінаторної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України було відібрано 1256 сполук класу хіназолінів. Для більшості активних інгібіторів кіназ показано наявність водневого зв'язку із шарнірним регіоном. Для структури комплексу хіназолінового інгібітору ерлотинібу зі структурно схожою на FGFR1 тирозиновою протеїнкіназою EGFR (код 1M17 на www.rcsb.org) показано наявність водневого зв'язку між N1 хіназоліну та групою NH основного ланцюга амінокислотного залишку Met769. Оскільки АТФ-зв'язувальні кишені рецепторних тирозинових кіназ мають високий ступінь гомології, то одним із критеріїв відбору лігандів для тестування була наявність водневого зв'язку між N1 хіназоліну та групою NH основного ланцюга залишку Ala564 на шарнірному регіоні кінази FGFR1. Для тестування інгібування фосфорилування FGFR1 було відібрано 40 сполук. Сполуки 3-(6-бромхіназолін-4-аміно)пропіонова кислота і 3-(6-бромхіназолін-4-аміно)1-пропанол за результатами докінгу показують утворення водневих зв'язків із консервативними залишками Ліз514, Глу531 та Асп641, як і найбільш активні 4-анілінхіназоліни. Але незважаючи на це ці сполуки не інгібують FGFR1. Очевидно,

Структури похідних 4-анілінхіназоліну та інгібіторний вплив на протеїнкіназу FGFR1



№	R1	R2	Залишкова активність кінази, %	IC ₅₀ , мкМ
1	6-CH ₃		73	
2		2'-OCH ₃	101	
3		2'-OCH ₂ CH ₃	98	
4		3'-NH ₂	120	
5		4'-OH	92	
6		3'-OH		1,4
7	7-COOH	3'-OH		1,6
8	6-Br	2'-OH, 5'-CH ₃	82	
9	6-Br	3'-OCOCH ₃	77	
10	6-Br	4'-OH		2,3
11	6,7-OCH ₃	4'-OCH ₃	88	
12	6,7-OCH ₃	2'-OH, 5'-SO ₂ C ₂ H ₅	83	
13	6,7-OCH ₃	2',6'-CH ₃	78	
14	6,7-OCH ₃	3'-COOH	70	
15	6,7-OCH ₃	2'-CH ₃ , 4'-OH	72	
16	6,7-OCH ₃	4'-CH ₂ COOH	58	
17	6,7-OCH ₃	4'-COCH ₃		20
18	6,7-OCH ₃	4'-N(CH ₂ CH ₃) ₂ O	72	
19	6,7-OCH ₃	2'-N(CH ₂ CH ₃) ₂ O		17,8
20	6,7-OCH ₃	3'-OCH ₂ CH ₂ O-4'		5
21	6,7-OCH ₃	3'-NHN=CH-4'		3,8
22	6,7-OCH ₃	3',5'-Cl	61	
23	6,7-OCH ₃	3'-Cl, 4'-F	57	
24	6,7-OCH ₃	3'-F		0,6
25	6,7-OCH ₃	3'-OH		0,2
26	6,7-OCH ₃	2'-OH, 5'-Cl		0,1

досить великий внесок у зв'язування з кіназою роблять гідрофобні взаємодії між фенільним циклом 4-анілінохіназолінів і залишками Вал561, Лей630, Вал492 та Ліз514.

Також важливу роль відіграє довжина спейсерної групи між фенілом і хіназоліном. Сполуки з гідразонметеновим та імінометильним спейсером мали дуже слабку інгібіторну активність, на відміну від сполук з іміногрупою як спейсером. Високу інгібіторну активність проявили лише сполуки підкласу 4-анілінхіназолінів. Їх структури і дані тестування наведено в таблиці 1.

На основі даних докінгу та відомої структури комплексу ерлотинібу з EGFR було прийнято модель зв'язування анілінхіназолінів з FGFR1 (рис. 1).

Згідно з цією моделлю хіназоліновий гетероцикл займає в сайті зв'язування положення, аналогічне до положення пуринового гетеро-

циклу АТФ, утворюючи водневий зв'язок між N1 хіназоліну та групою NH основного ланцюга залишку Ала564. Не виключене формування слабкої взаємодії по типу водневого зв'язку між атомом водню при C2 хіназоліну і карбонільною групою основного ланцюга залишку Глу562. Гетероцикл також бере участь у гідрофобних взаємодіях з амінокислотними залишками, що оточують АТФ-зв'язувальний сайт, — Лей630, Вал561, Лей484, Ала512. Замісники в 6 і 7 положеннях хіназоліну при цьому орієнтовані в бік кишені 2 кінази, тоді як замісники у 2 і 8 положеннях будуть перешкоджати гетероциклу зайняти описане положення. Аніліновий радикал направлений углиб сайту зв'язування в бік гідрофобної кишені 1, де входить у контакт із гідрофобними залишками Лей647, Мет535, Іле545. Гідрофобна кишеня 1 з одного боку обмежена залишком Вал561, з іншого — консервативними залишками Ліз514 та Асп641

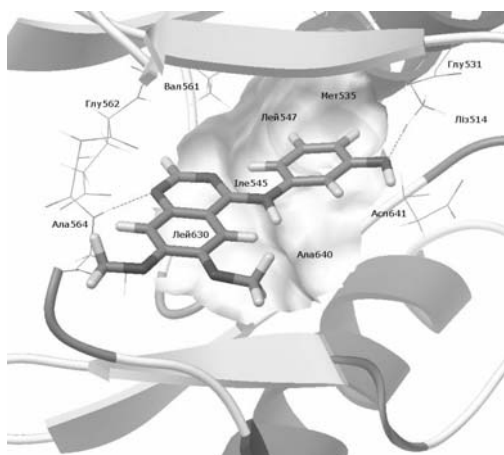


Рис. 1. Комплекс FGFR1 зі сполукою 25 за даними докінгу.

і має досить невеликий об'єм. Її наявність є специфічною ознакою кіназ. Залишки, що її утворюють, і, як наслідок, її об'єм та форма специфічні для кожної кінази. Тому від положення та об'єму замісників в аніліновому кільці хіназолінових інгібіторів залежить специфічність взаємодії інгібітору з кіназою. У роботах з оптимізації хіназолінових інгібіторів EGFR показано, що інгібіторну активність збільшують замісники в 6 і 7 положеннях гетероциклу й аніліновому радикалі, тоді як замісники у 2, 5 та 8 положеннях зменшують інгібіторний вплив [16, 17]. Тому в нашій роботі досліджено вплив на активність інгібування кінази FGFR1 анілінхіназолінових сполук із замісниками в 6 і 7 положеннях гетероциклу й аніліновому радикалі.

Сполуки, в яких відсутні замісники у 6 і 7 положеннях хіназоліну, мали меншу інгібіторну активність. Це добре помітно на парах аналогічних сполук 5 і 10, 6 і 25, які відрізняються лише замісниками в цих положеннях. Уведення карбоксильної групи в 7 положення не збільшувало інгібіторної активності (сполуки 6 і 7). Але, як і в інших хіназолінових інгібіторах протеїнкіназ, найбільший ефект мали сполуки із 6,7-диметокси замісниками. Тому подальші спроби оптимізації структури хіназолінів були пов'язані із замісниками в амінофенільному кільці.

Уведення об'ємних замісників в аніліновому кільці, таких як 3 і 4 морфолін (сполуки 18 і 19), діоксан (20) та аміноіндазол (21), не призвело до значного збільшення інгібування

FGFR1. Найбільш активними були сполуки 20 та 21 з IC_{50} 5 і 3,8 мкМ відповідно. Сполуки з карбонільними групами (14, 16) не мали вираженого інгібіторного ефекту на кіназу. Сполука з гідрофобним диметильним замісником (13) також не інгібувала активності кінази. Аналогічно до хіназолінових інгібіторів VEGFR і EGFR інгібіторну активність проявили сполуки з галогеновими замісниками (сполуки 22-24). Особливо ефективним було введення фтору в пара-положення аніліну (24), IC_{50} цієї сполуки становить 0,6 мкМ. Сполука 25 є активним інгібітором VEGFR з IC_{50} 0,05 мкМ при 2 мкМ АТФ [18]. FGFR1 вона інгібує з IC_{50} 0,2 мкМ, але за більшої концентрації АТФ. За прийнятою моделлю зв'язування анілінохіназолінів з АТФ-зв'язувальним сайтом FGFR1 гідроксильна група утворює водневий зв'язок з аміногрупою бічного ланцюга Ліз514. Гідроксильна група більш ефективна для проявлення інгібування в пара-положенні, ніж у мета- (сполуки 5 і 6). Уведення більших за розміром замісників замість гідроксигрупи призводить до значного падіння активності (сполуки 2, 3, 9, 17). На прикладі сполук 10 та 11 помітно, що заміна гідроксигрупи на метокси в пара-положенні аніліну також значно зменшує активність інгібування. Такий же ефект має заміна гідроксилу на амін (сполуки 4 і 6). Сполука 26 з комбінацією гідроксильної групи з хлором в орто- та пара-положеннях аніліну виявилася найбільш ефективним інгібітором FGFR1 у дослідженій серії і мала IC_{50} 0,1 мкМ. Аналогічні сполуки (8, 12, 15) з різними гідрофобними замісниками замість хлору майже не інгібували кіназу. Хоча за даними докінгу в комплексі сполуки 26 із FGFR1 водневий зв'язок між 2'-гідроксилем і NH_3 Ліз514 не утворюється, але можливе формування водневого зв'язку з карбоксигрупою бічного ланцюга залишку Асп641. Хлор при цьому направлений углиб гідрофобної кишені 1, де тісно контактує із залишком Вал561.

У проведеному нами віртуальному скринінгу всієї бази хімічних сполук показано поширеність типу позиції лігандів у сайті зв'язування з гетероциклом, який утворює водневий зв'язок із шарнірним регіоном і вступає в гідрофобні взаємодії з амінокислотами, що оточують АТФ-зв'язувальний сайт. Але високі

інгібіторні властивості такі інгібітори проявляють за умови наявності фенольного кільця, приєднаного до основного гетероциклу гнучким спейсером і направлено вглиб гідрофобної кишені 1 FGFR1. Від природи замісників у фенольному кільці досить сильно залежить міцність зв'язування ліганду з кіназою. Описаний у цій роботі процес підбору замісників в аніліновому кільці можна застосовувати для інших класів інгібіторів FGFR1, що мають схожу позицію в сайті зв'язування. Отримані на класі хіназолінів дані було успішно застосовано для оптимізації інгібіторів FGFR1 з класу тієнопіримідинів і деяких інших, що знаходяться в розробці. Також у роботі описано новий активний інгібітор FGFR1 класу 4-анілінохіназолінів.

Висновки. У роботі досліджено інгібіторні

властивості ряду сполук класу хіназолінів по відношенню до протеїнкінази FGFR1. Методом рецептор-орієнтованого віртуального скринінгу перевірено 1256 сполук класу оксіндолів і відібрано 40 сполук для тестів *in vitro*. Найбільш активним інгібітором серед досліджуваних сполук виявився 4-хлор-2-(6,7-диметоксихіназолін-4-аміно)-фенол із IC_{50} 0,1 мкМ. Встановлено, що сполуки цього класу є активними інгібіторами не тільки VEGFR та EGFR, а й FGFR1. Також показано необхідність наявності гідроксилу або галогену в аніліновому кільці анілінохіназолінів для проявлення максимального інгібіторного ефекту на досліджувану кіназу. Отримані дані застосовано для оптимізації інших класів інгібіторів FGFR1.

Надійшла в редакцію 12.11.2010 р.

Quinazoline inhibitors of protein kinase FGFR1

A.A. Gryshchenko¹, V.G. Bdzholia¹, S.S. Lukashov¹, L.V. Pletnyova¹,
R.V. Chepurina¹, I.V. Zhitnetsky², S.M. Yarmoluk¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03680, Ukraine

² National University of Food Technologies
68 Volodymirs'ka Str., Kyiv, 01601, Ukraine

Summary. Protein kinase FGFR1 plays a key role in oncogenic transformation and oncovasculogenesis. Inhibitors of this kinase can be used as anticancer drugs. Protein kinase FGFR1 inhibitors searching were performed among quinazoline derivatives. 40 compounds from 1256 quinazolone derivatives have been chosen using virtual screening. The most active compound was 4-chloro-2-(6,7-dimethoxy-quinazolin-4-ylamino)-phenol (IC_{50} 0.1 μ M). Structure-activity relationship of tested compounds was investigated and binding mode for this compounds class in FGFR1 ATP-site was proposed.

Keywords: protein kinase FGFR1, quinazoline, docking.

Перелік літератури

1. Groth C., Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1 // *Int. J. Dev. Biol.* — 2002. — 46(4). — P. 393-400.
2. Turner N., Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer // *Nat. Rev. Cancer.* — 2010. — Feb, 10(2). — P. 116-129.
3. Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2005. — Apr, 16(2). — P. 139-149.
4. Wilkie A.O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2005. — Apr, 16(2). — P. 187-203.
5. Murakami M., Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization // *Curr Opin Hematol.* — 2008. — May, 15(3). — P. 215-220.
6. Tímár J., Döme B. Antiangiogenic drugs and tyrosine kinases // *Anticancer Agents Med. Chem.* — 2008. — Jun, 8(5). — P. 462-469.
7. Acevedo V.D., Ittmann M., Spencer D.M. Paths of FGFR-driven tumorigenesis // *Cell Cycle.* — 2009. — Feb 15, 8(4). — P. 580-588.
8. Coumoul X., Deng C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases // *Birth Defects Res. C Embryo Today.* — 2003. — Nov, 69(4). — P. 286-304.
9. Wesche J., Haglund K., Haugsten E.M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer // *Biochem. J.* — 2011. — Jul 15, 437(2). — P. 199-213.
10. Laird A.D., Vajkoczy P., Shawver L.K. *et al.* SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors // *Cancer Res.* — 2000. — 60 (15). — P. 4152-4160.
11. Rewcastle G.W., Denny W.A., Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., McMichael A., Fry D.W. Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor // *J. Med. Chem.* — 1995. — Sep 1, 38(18). — P. 3482-3487.

12. <http://www.ddl.unimi.it/>
13. <http://autodock.scripps.edu/>
14. <http://sw16.im.med.umich.edu/software/xtool/>
15. *Hastie C.J., McLauchlan H.J., Cohen P.* Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol // *Nature protocols*. — 2006. — Vol. 1, No. 2. — P. 968-971.
16. *Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., Rewcastle G.W., McMichael A., Showalter H.D., Fry D.W., Kraker A.J., Denny W.A.* Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor // *J. Med. Chem.* — 1996. — Jan 5, 39(1). — P. 267-276.
17. *VanBrocklin H.F., Lim J.K., Coffing S.L., Hom D.L., Negash K., Ono M.Y., Gilmore J.L., Bryant I., Riese D.J.* 2nd. Anilinoalkoxyquinazolines: screening epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for potential tumor imaging probes // *J. Med. Chem.* — 2005. — Nov 17, 48(23). — P. 7445-7456.
18. *Hennequin L.F., Thomas A.P., Johnstone C., Stokes E.S., Plé PA, Lohmann J.J., Ogilvie D.J., Dukes M., Wedge S.R., Curwen J.O., Kendrew J., Lambert-van der Brempt C.* Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors // *J. Med. Chem.* — 1999. — Dec 30, 42(26). — P. 5369-5389.