

СИНТЕЗ ПИРАЗОЛО[1,5-А]ПИРИДИНОВ – ИНГИБИТОРОВ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ КИНАЗ

Х. С. Шихалиев, А. Ю. Потапов, Г. М. Манахелохе, Д. Ю. Вандышев

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 10.02.2014 г.

Аннотация. Разработан метод синтеза производных пиразоло[1,5-а]пиримидина и изучена их ингибирующая способность в отношении ряда серин-треониновых киназ.

Ключевые слова: пиразоло[1,5-а]пиримидин, енаминон, иммониевый ион, ингибиторы серин-треониновых киназ.

Abstract. Developed a method of synthesis of derivatives of pyrazolo [1,5-a] pyrimidine and studied for their inhibitory effect on a number of serine-threonine kinases.

Keywords: pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, enamionone, immonium ion, inhibitors serine-threonine kinases.

Одним из этапов создания лекарственных препаратов является биологический скрининг, позволяющий выявить перспективные вещества для дальнейших исследований [1]. В последние годы, в связи с картированием генома человека, установлены гены, обеспечивающие экспрессию различных ферментов, среди которых на долю киназ приходится более 20% [2]. Нарушения нормального протекания процессов фосфорилирования обуславливает многие патологии, например, онкологические, воспалительные, сердечно-сосудистые заболевания, различные формы диабета и др. [3]. Поэтому поиск новых ингибиторов протеинкиназ рассматривается как наиболее перспективное направление создания новых лекарственных средств. К настоящему времени существует весьма незначительное количество введенных в клиническую практику лекарственных препаратов ингибирующих протеинкиназы, которые применяются для лечения различных заболеваний (противоопухолевые, противовоспалительные средства) [4,5]. Следует отметить, что все эти препараты содержат один или несколько азатетрациклических фрагментов, причем в большинстве случаев таковым является пиримидиновый цикл [6-8].

Цель работы - разработка методов синтеза функционально замещенных пиразолопиримидинов и тестирование полученных веществ на ингибирующую активность серин-треониновых киназ.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Контроль за ходом реакций и индивидуальностью синтезированных веществ осуществляли методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254. Спектры ЯМР ^1H регистрировали на приборе Bruker AC-300 (300 МГц) в DMSO-d_6 , внутренний стандарт - Me_4Si . Ингибирующая активность определялась методом иммуноферментного анализа – ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), для которого единственным ограничением является достаточная растворимость образцов.

Синтез 2- R^1 -3- R^2 -7- R^3 -пиразоло[1,5-а]пиримидинов 4 (общая методика. Смесь 0.005 моль аминопиразола **1** и 0.005 моль соответствующего енаминона **2** кипятили в уксусной кислоте в течение 10-50 мин. Образующийся осадок **4** отфильтровывали и перекристаллизовывали из диметилформамида.

7-(4-бензилоксифенил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 а. Выход 1.13 г (75%), т.пл. 211-213°C. Найдено, %: С 74.98, Н 5.05, N 14.02. $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$. Вычислено, %: С 75.73, Н 5.02, N 13.94. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., J/Гц): 6.81 (1H, д., СН-пиримидин, J=8.0), 6.87-7.89 (10H, м., аром.+СН-пиразол),

8.04 (1H, д., СН-пиразол, $J=2.1$), 8.74 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$). Масс-спектр, m/z 301[M]⁺.

7-[4-(4-хлорбензил)оксифенил]пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 б. Выход 1.36г (81%), т.пл. 220-222°C. Найдено, %: С 68.47, Н 4.16, N 12.57. $C_{19}H_{14}ClN_3O$. Вычислено, %: С 67.96, Н 4.20, N 12.51. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 6.90 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 6.95 (1H, д., СН-пиразол, $J=2.1$), 6.99-7.98 (8H, м., аром.), 8.05 (1H, д., СН-пиразол, $J=2.1$), 8.76 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$). Масс-спектр, m/z 335[M]⁺.

7-(3-нитрофенил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 в. Выход 1.03г (86%), т.пл. 185-187°C. Найдено, %: С 60.34, Н 3.31, N 23.39. $C_{12}H_8N_4O_2$. Вычислено, %: С 60.00, Н 3.36, N 23.32. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 6.98 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 7.02 (1H, д., СН-пиразол, $J=2.1$), 7.13 (1H, м., аром.), 7.92-8.18 (2H, м., аром.), 8.66 (1H, с., аром), 8.05 (1H, д., СН-пиразол, $J=2.1$), 8.76 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$). Масс-спектр, m/z 240[M]⁺.

3-(4-фторфенил)-7-(4-хлорфенил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 г. Выход 1.15г (71%), т.пл. 199-201°C. Найдено, %: С 66.19, Н 3.45, N 12.93. $C_{18}H_{11}ClFN_3$. Вычислено, %: С 66.78, Н 3.42, N 12.98. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 6.89 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 6.97-7.65 (8H, м., аром.), 8.05 (1H, с., СН-пиразол), 8.72 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$). Масс-спектр, m/z 323[M]⁺.

3-(4-фторфенил)-7-(пиридин-3-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 д. Выход 1.02г (70%), т.пл. 203-205°C. Найдено, %: С 70.86, Н 3.78, N 19.24. $C_{17}H_{11}FN_4$. Вычислено, %: С 70.34, Н 3.82, N 19.30. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 6.94 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 7.15-7.27 (6H, м., аром.+2CH-пиридин), 8.09 (1H, с., СН-пиразол), 8.33 (1H, с., СН-пиридин), 8.81 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 8.89 (1H, д., СН-пиридин, $J=8.1$). Масс-спектр, m/z 290[M]⁺.

7-(фуран-2-ил)-3-(4-хлорфенил)-2-метилпиразоло[1,5-а]пиримидин 4 е. Выход 1.07г (69%), т.пл. 185-187°C. Найдено, %: С 66.33, Н 3.86, N 13.62. $C_{17}H_{12}ClN_3O$. Вычислено, %: С 65.92, Н 3.90, N 13.57. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 2.55 (3H, с., CH₃), 6.04 (1H, д., СН-фуран, $J=4.1$), 6.68 (1H, д., СН-фуран, $J=4.1$), 6.81 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 7.10-7.19 (5H, м., аром.+фуран), 8.68 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$). Масс-спектр, m/z 309[M]⁺.

2-этил-3-(4-фторфенил)-7-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 4 ж. Выход 1.07г (76%), т.пл. 177-179°C. Найдено, %: С 71.40, Н

4.79, N 17.53. $C_{19}H_{15}FN_4$. Вычислено, %: С 71.68, Н 4.75, N 17.60. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., J/Гц): 1.25 (3H, т., CH₃, $J=7.8$), 2.94 (2H, кв., CH₂, $J=7.8$), 6.95 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 7.08-7.24 (6H, м., аром.+2CH-пиридин), 8.68 (1H, д., СН-пиримидин, $J=8.0$), 8.75 (2H, д., 2CH-пиридин, $J=7.2$). Масс-спектр, m/z 309[M]⁺.

Общая методика определения ингибирующей активности по отношению к серин-треониновым киназам по методу ELISA. Реакцию по определению киназной активности проводили в полипропиленовых планшетах (Costar, 3363) в реакционном буфере (20 mM HEPES, pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.005% Triton X-100) в течение 60 минут при 30°C и интенсивном перемешивании. Конечная концентрация компонентов реакции: 0.05 мкг/мл соответствующей киназы, 5 нМ биотинилированный субстрат Histon H3 (1-21) (Anaspec, 61702), 150 мкМ АТР (Sigma, A6419), 10 мкМ анализируемое соединение, 5% ДМСО.

Ферментативную реакцию останавливали буфером, содержащим 20 mM HEPES (Sigma, H4034), pH 7.5 и 150 mM EDTA (Sigma, E5513).

Далее для детекции фосфорилированного субстрата реакционную смесь переносили в заранее подготовленные планшеты (Nunc, 468667), покрытые нейтравидином (1 нг/лунку; Pierce, 31000) и обработанные бычьим сывороточным альбумином (BSA) для блокирования мест неспецифического связывания. Инкубацию проводили в течение часа при комнатной температуре. После трехкратной отмывки планшетов фосфатно-солевым буфером (PBS) с Tween-20, последовательно проводили инкубацию с anti-phospho-Histon H3 антителами (0.3 нг/мкл; Millipore, 04-746), и со специфическими антителами, конъюгированными ферментом-меткой (пероксидаза) Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (титр 1/5000; Cell Signaling, 7074). После завершения каждой стадии инкубации (60 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании) платы трижды отмывали от несвязавшихся молекул антител раствором PBS с Tween-20 и добавляли по 100 мкл субстрата ТМБ (Sigma, T8768), приготовленного по инструкции производителя.

Перед измерением оптической плотности проводили остановку реакции с помощью 0.5 М H₂SO₄. Оптическую плотность раствора определяют при λ=450 нм с использованием планшетного спектрофотометра (TECAN Safire). Полученные данные обрабатывали и импортировали в программу HTSCalc.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таблица 1

Результаты первичного биологического скрининга

Одним из стратегических подходов к формированию пиримидинового цикла является взаимодействие 1,3-N,N-бинуклеофилов с различными енаминами. Нами установлено, что енамины линейного строения **2 а-ж** реагируют с аминопиразолами **1 а-г** региоселективно, с образованием соответствующих пиразолопиримидинов. Предполагается, что данное взаимодействие включает стадию замещения диметиламиногруппы фрагментом аминопиразола с образованием промежуточного енаминона **3** (схема 1), после чего следует внутримолекулярное замыкание пиримидинового цикла с отщеплением молекулы воды, приводящее к образованию конечных 2-R¹-3-R²-7-R³-пиразоло[1,5-а]пиримидинов **4 а-ж**. Оптимальными условиями проведения реакции является нагревание в среде уксусной кислоты, причём в большинстве случаев продолжительность реакции составляла 10-15 минут. Применение других полярных растворителей (спирты, диоксан) увеличивало время реакции до нескольких часов и снижало выход целевых пиразоло[1,5-а]пиримидинов **4**. Каталитические свойства уксусной кислоты можно объяснить протонированием енамина **2** по β-положению винильной группы с образованием высокоэлектрофильного иммониевого иона **I**, взаимодействующего далее с нуклеофильной аминогруппой пиразола **1**.

В качестве модельных объектов для тестирования синтезированных соединений на ингибирование ферментной активности были выбраны следующие серин-треониновые киназы: Aurora A, Cdc7, JNK3, p38alpha, LCK, PIM1.

Ингибирующая активность определялась методом иммуноферментного анализа – ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), для которого единственным ограничением является достаточная растворимость образцов.

В таблице 1 приведены результаты первичного биологического исследования для синтезированных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что синтезированные 2-R¹-3-R²-7-R³-пиразоло[1,5-а]пиримидины **4 а-ж** обладают средней активностью при ингибировании большого числа серин-треониновых киназ. Максимальной ингибирующей активностью в отношении JNK3 обладает соединение **4б** с 4-Cl-бензилоксифенильным заместителем в пиримидиновом цикле, а в отношении LCK – соединение **4г** с 4-Cl-фенильным заместителем в пиримидиновом цикле и 4-F-фенилзамещенным пиразольным кольцом.

№ соединения	Киназа	Ингибирующая активность, %
4а	Aurora A	9
	Cdc7	13
	JNK3	4
	p38alpha	-2
	LCK	23
	PIM1	-4
4б	Aurora A	2
	Cdc7	19
	JNK3	38
	p38alpha	-31
	LCK	5
	PIM1	12
4в	Aurora A	27
	Cdc7	6
	JNK3	3
	p38alpha	0
	LCK	-
	PIM1	-9
4г	Aurora A	-3
	Cdc7	9
	JNK3	21
	p38alpha	13
	LCK	45
	PIM1	4
4д	Aurora A	-6
	Cdc7	5
	JNK3	7
	p38alpha	12
	LCK	4
	PIM1	-7
4е	Aurora A	8
	Cdc7	11
	JNK3	2
	p38alpha	13
	LCK	6
	PIM1	-11
4ж	Aurora A	-15
	Cdc7	2
	JNK3	31
	p38alpha	16
	LCK	25
	PIM1	-9

диновом цикле, а в отношении LCK – соединение **4г** с 4-Cl-фенильным заместителем в пиримидиновом цикле и 4-F-фенилзамещенным пиразольным кольцом.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014-2016 годы, проект № 1546.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Солдатенков А.Т. Основы органической химии лекарственных средств / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, Н.В. Шендрик. — М. : Химия, 2001. — 192 с.
 2. Muller G. Medicinal chemistry of target family – directed masterkeys / G. Muller // Drug discovery today. — 2003. — V.8. — P. 681-691.
 3. Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs medical lecture / P. Cohen // Eur. J. Biochem. — 2001. — V.268. — P.5001–5010.
 4. Margutti S. Are MAP kinase drug target? Yes, but difficult ones / S. Margutti, S.A. Laufer // ChemMedComm. — 2007. — Vol.2. — P.1116-1140.
 5. Paul F. Jackson and James L. Bullington Pyridinylimidazole Based p38 MAP Kinase Inhibitors / Paul F. Jackson and James L. Bullington // Curr. Top. Med. Chem. — 2002. — V.2, N 9. — P. 1011-1020.
 6. A class of 2,4- bisanilinopyrimidine Aurora A inhibitors with unusually high selectivity against Aurora B / I. Aliagas-Martin [et al] // J. Med. Chem. — 2009. — V. 52. — P. 3300–3307.
 7. N-Phenyl-4- pyrazolo[1,5-b]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy / F. X. Tavares [et al] // J. Med. Chem. — 2004. — V. 47. — P. 4716–4730.
 8. Discovery of a new class of 4-anilinopyrimidines as potent c-Jun N-terminal kinase inhibitors: synthesis and SAR studies / M. Lui [et al] // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2007. — V. 17. — P. 668–672.
-
- Шихалиев Хидмет Сафарович* — д.х.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии, Воронежский государственный университет; тел. (4732)208433; e-mail: chocd261@chem.vsu.ru
- Шихалиев Khidmet S.* — Dr. Sci., professor, Head of the department of organic chemistry, Voronezh State University; tel.: (4732)208433; e-mail: chocd261@chem.vsu.ru
- Потапов Андрей Юрьевич* — старший научный сотрудник, Воронежский государственный университет; тел. (910)3464169; e-mail: piston@piston@mail.ru
- Potapov Andrey Yu.* — senior researcher, Voronezh State University; tel.: (910)3464169; e-mail: piston@piston@mail.ru
- Манахелохе Гизачеу Мулугета* — аспирант, Воронежский государственный университет; тел. (960)1299727; e-mail: gizachewm75@gmail.com
- Manahelohe Gizachew M.* — PhD student, Voronezh State University; tel.: (960)1299727; e-mail: gizachewm75@gmail.com
- Вандышев Дмитрий Юрьевич* — магистр, Воронежский государственный университет; тел. (960)1093856; e-mail: francy_2007@mail.ru
- Vandyshv Dmitriy Yu.* — master, Voronezh State University; tel.: (960)1093856; e-mail: francy_2007@mail.ru