

На правах рукописи



Дарвиш Футун

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МИШЕНЬ-СПЕЦИФИЧНЫМ
МОДИФИКАЦИЯМ ДОРСОМОРФИНА

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Научный руководитель: **Трибулович Вячеслав Генрихович**, кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Кинжалов Михаил Андреевич**, доктор химических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра физической органической химии, доцент

Криворотов Денис Викторович, кандидат химических наук, федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» федерального медико-биологического агентства России, лаборатория «Химического моделирования», заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена**»

Защита состоится 21 мая 2025 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.383.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», по адресу: 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 24-26/49 литера А, Белоколонный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), <https://spbti.ru/filecat/510>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, просим отправлять по адресу: 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 24-26/49 литера А, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Ученый совет, e-mail: dissowet@spbti.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Григорьева Татьяна Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сложность разработки киназных ингибиторов обусловлена тем, что АТФ-связывающая область, на которую нацелены классические ингибиторы, демонстрирует высокую консервативность среди ферментов данной группы. Поэтому наиболее остро проблема селективности стоит именно для ингибиторов киназ, что существенно ограничивает их практическое применение.

При создании новых ингибиторов киназ чаще всего проводят скрининг уже известных АТФ-конкурентных соединений, а затем структурную оптимизацию для реализации принципа «подобное сродство, но более высокая селективность». Одно из таких соединений, дорсоморфин, проявляет ингибирующую способность по отношению ко многим киназам, но до сих пор применяется в качестве «селективного» ингибитора АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК). В его основе лежит пиразоло[1,5-а]пиримидиновое ядро, которое считается привилегированным гетероциклом в медицинской химии и обладает структурным сходством с азотистым основанием молекулы АТФ.

Дорсоморфин является одним из трех общепризнанных ингибиторов АМФК, идентифицированных в результате высокопроизводительного скрининга. Для него не проводилась разработка доступных методов синтеза, а также работы по исследованию зависимости «структура–активность» по отношению к АМФК. При этом его структура предполагает возможность модификации и введения новых связывающих фрагментов. Учитывая потребность в ингибиторах АМФК, создание серии аналогов дорсоморфина с последующей оценкой вклада определенных структурных фрагментов в целевую активность является актуальным направлением исследований по выявлению высокоселективных ингибиторов.

Степень разработанности темы. АМФК была идентифицирована более 30 лет назад как основной регуляторный элемент энергетического сигнального каскада. В отличие от большинства киназ, при многих патологических состояниях ее активность подавляется, в связи с чем основное внимание было уделено разработке соединений, способных оказывать активирующее действие. Тем не менее, в последние годы возникла потребность в ингибиторах АМФК как для исследовательских целей, так и для терапевтического применения. Однако выбор низкомолекулярных агентов, способных достаточно селективно ингибировать активность киназы, в настоящее время ограничен тремя структурами, выявленными в ходе скрининга больших библиотек соединений: дорсоморфин (Compound C), SBI-0206965 и ВАУ-3827. Каждая из этих структур обладает определенными недостатками, которые не позволяют использовать их в терапевтической практике.

Несмотря на заинтересованность исследователей и клиницистов в ингибиторах АМФК, в литературе представлено ограниченное количество работ по ингибированию АМФК, и лишь единичные посвящены ингибированию соединениями, отличными от уже известных. Исследование процессов ингибирования АМФК является достаточно новым и мало разработанным направлением, а поиском и созданием ингибиторов АМФК занимается небольшое число научных групп, при этом устойчивых и значимых результатов в этой области к настоящему моменту достигнуто не было. Такое положение дел предоставляет широкие возможности для получения новых результатов.

Цели и задачи исследования. Целью диссертационного исследования является разработка подходов к синтезу структурных аналогов дорсоморфина для рационального дизайна ингибиторов киназ, в том числе АМФ-активируемой протеинкиназы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- разработка метода получения дорсоморфина на основе оптимальной стратегии синтеза;
- определение значимых точек для модификации дорсоморфина с целью первичного исследования зависимости «структура–активность»;
- проверка возможности реализации предложенных модификаций с учетом разработанной синтетической схемы;
- создание серии структурных аналогов дорсоморфина;
- выявление ключевых структурных элементов дорсоморфина, определяющих активность по отношению к АМФК, на основании сопоставления расчетных и экспериментальных данных.

Научная новизна. Предложена оптимальная синтетическая схема на основе конвергентной стратегии, позволяющая получать как дорсоморфин, так и его близкие структурные аналоги. Учитывая отсутствие исследований по разработке методов синтеза дорсоморфина, обусловленное тем, что соединение было идентифицировано в ходе высокопроизводительного скрининга, предложенная схема обладает определенной степенью новизны.

Впервые синтезирована серия пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных, являющихся близкими структурными аналогами дорсоморфина. Все синтезированные аналоги являются оригинальными соединениями и впервые охарактеризованы методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии.

Получены данные по взаимосвязи «структура–активность» для производных дорсоморфина, а также установлена корреляция между расчетной активностью соединений и экспериментальными данными, полученными в экспериментах *in vitro*. Показана возможность использования компьютерного моделирования для поиска новых и повышения селективности известных соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к АМФК.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе работы была синтезирована серия пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных, обладающих различным ингибирующим потенциалом по отношению к АМФК. Синтезированные соединения могут быть использованы как для изучения процесса ингибирования, так и для исследования эффектов, вызываемых ингибированием АМФК, на клеточных и животных моделях. Полученная серия производных может быть включена в библиотеки АТФ-конкурентных ингибиторов для проведения скрининговых исследований по иным киназам.

Разработанная схема получения дорсоморфина и его близких аналогов на основе конвергентной стратегии не только обеспечивает быстрый синтез библиотеки модифицированных соединений и их препаративную наработку для обеспечения биологических экспериментов, но также предполагает возможность получения новых структурных вариантов исходных молекул-ингибиторов.

Виртуальная библиотека производных 3-пиридил-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов, сконструированная на основе возможных комбинаций

заместителей, может быть использована для скрининга по АТФ-связывающему сайту киназ, отличных от АМФК.

В целом, рациональный дизайн может быть применен к разработке ингибиторов АМФК, нацеленных на АТФ-связывающую область, а результаты данного исследования позволят приблизиться к созданию высокоселективного ингибитора АМФК.

Методология и методы исследования. Определение строения и подтверждение чистоты синтезированных в работе соединений и полупродуктов осуществлялось с использованием комплекса современных физико-химических методов исследования, включая хромато-масс-спектрометрию и спектроскопию ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Очистку полупродуктов и целевых соединений проводили с использованием флэш-хроматографии. Помимо этого, в работе были также использованы расчетные методы исследования (молекулярный докинг, виртуальный скрининг) и *in vitro* методы исследования биологической активности.

Положения, выносимые на защиту:

- схема синтеза дорсоморфина и его структурных аналогов на основе конвергентной стратегии;
- способ образования С–С связи для построения углеродного скелета стерически затрудненных 5,7-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов;
- метод синтеза алкиламиновых фрагментов с использованием реакции Мицунобу;
- серия 3-пиридил-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов, обладающих ингибирующей активностью по отношению к АМФК;
- метод идентификации ингибиторов АМФК на основе моделирования *in silico* с последующим подтверждением биологической активности *in vitro*.

Степень достоверности результатов исследований. Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов и подходов синтетической и медицинской химии. Экспериментальные результаты и выводы, сделанные на их основе, подтверждаются согласующимися между собой данными, полученными различными методами. Выводы, сформулированные в результате выполнения работы, являются научно обоснованными и соответствуют современным научным представлениям.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022» (Москва, 2022), XII научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Неделя науки-2022» (Санкт-Петербург, 2022), XIII научной конференции «Традиции и инновации», посвященной 194-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) (Санкт-Петербург, 2022), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Москва, 2023), XIII научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Неделя науки-2023» (Санкт-Петербург, 2023), XIV научной конференции «Традиции и инновации», посвященной 195-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) (Санкт-Петербург, 2023), XIV научно-технической конференции студентов, аспирантов, молодых учёных

«Неделя науки-2024. Творчество молодежи – будущему России» (Санкт-Петербург, 2024). По материалам конференций опубликованы сборники тезисов докладов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 2 работы в изданиях, рекомендуемых ВАК и индексируемых Scopus и Web of Science, а также тезисы 7 докладов на конференциях 2022–2024 года.

Диссертация состоит из введения, трёх глав (литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть), заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Материал изложен на 124 страницах, содержит 2 таблицы, 28 рисунков, 20 схем. Список литературы включает 203 ссылки.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФ №21-73-00296 и №24-73-10221.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор объекта исследования

В настоящее время общепризнаны лишь три ингибитора АМФК: дорсоморфин (Compound C), SBI-0206965 и BAY-3827 (Рисунок 1). Эти структуры являются результатом высокопроизводительного скрининга и имеют свои недостатки, которые ограничивают их использование в исследовательских и терапевтических целях. Дорсоморфин проявляет низкую специфичность по отношению к АМФК, соединение SBI-0206965 ингибирует АМФК не полностью, в то время как коммерческий ингибитор BAY-3827 демонстрирует плохую фармакокинетику из-за низкой метаболической стабильности.

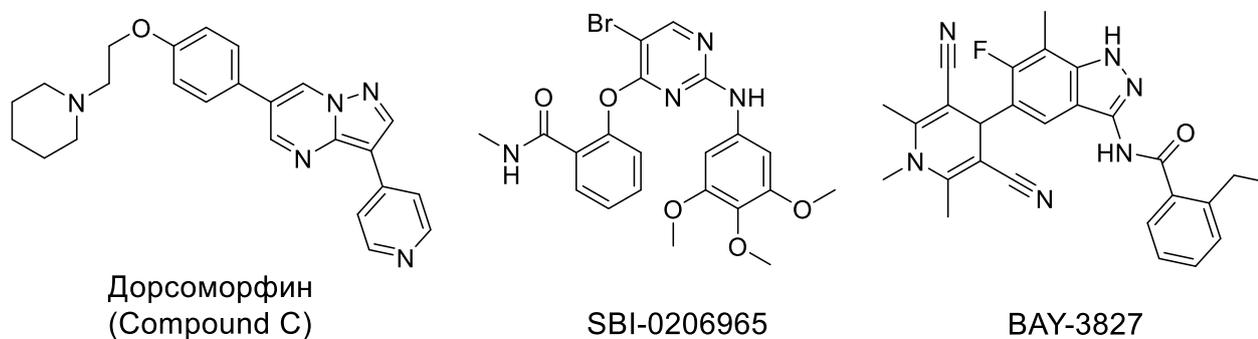


Рисунок 1 – Соединения-ингибиторы АМФК

Рациональный дизайн требует наличие структурных данных о белковой мишени и низкомолекулярном лиганде, активность которого подтверждается в эксперименте. Установлено, что SBI-0206965 перекрывает АТФ-связывающий сайт, что соответствует киназному ингибитору типа IIb, тогда как BAY-3827 лишь предположительно блокирует сайт связывания АТФ. Однако структурные данные по связыванию лиганда с полноразмерной АМФК имеются лишь для дорсоморфина.

Чтобы подтвердить возможность использования структуры дорсоморфина в качестве основы для рационального дизайна селективных киназных ингибиторов мы провели моделирование его взаимодействия с АМФК. Сравнение структуры полученного комплекса АМФК–дорсоморфин с данными рентгеноструктурного анализа (PDB ID 7JHG) показало достаточное большое значение среднего

квадратичного отклонения лиганда ($RMSD = 3,79 \text{ \AA}$), что обусловлено отличной ориентацией подвижного циклоалкильного фрагмента дорсоморфина (Рисунок 2). При рассмотрении только ароматической части молекулы дорсоморфина, наблюдается высокая степень совпадения экспериментальной и расчетной укладок лиганда ($RMSD = 0,15 \text{ \AA}$).

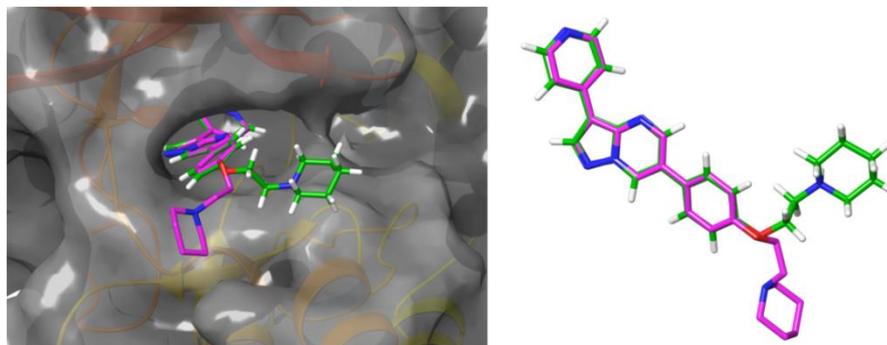


Рисунок 2 – Размещение дорсоморфина в АТФ-связывающем сайте АМФК по данным РСА (малиновый) и докинга (зеленый). Справа: структуры без белкового окружения

Таким образом, возможность смоделировать взаимодействие дорсоморфина в активном сайте АМФК с высокой степенью достоверности, а также отсутствие данных «структура–активность» для соединений этого хемотипа по отношению к АМФК определили выбор дорсоморфина в качестве объекта исследования. Модификация дорсоморфина с последующей оценкой вклада определенных структурных фрагментов в целевую ингибирующую активность представляет собой способ выявить более эффективный и селективный ингибитор АМФК, а также разработать основу для рационального дизайна принципиально новых ингибиторов, нацеленных на АТФ-связывающую область АМФК.

Разработка схемы синтеза дорсоморфина на основе линейной стратегии

На основе анализа литературных данных было принято решение сначала применить линейную стратегию для синтеза целевого соединения, чтобы определить наиболее трудоемкие и выход-лимитирующие стадии. Структуру дорсоморфина мы разложили на циклические фрагменты (Рисунок 3), а синтетическую схему построили таким образом, чтобы последовательно вводить эти фрагменты. Таким образом, основой для построения молекулы стал фрагмент пиридина, а синтез был разбит на три подзадачи: 1) $A \rightarrow AB$; 2) $AB \rightarrow AB\Gamma$; 3) $AB\Gamma \rightarrow AB\Gamma D$.

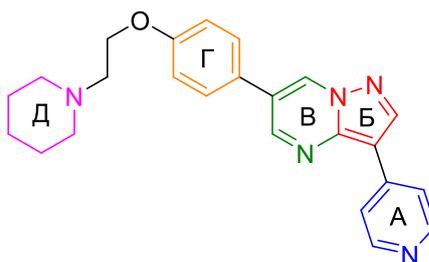


Рисунок 3 – Обозначение циклических фрагментов дорсоморфина

Синтез пиридил-замещенной аминопиразольной компоненты (фрагмент «АБ») осуществляли из 4-пиридинкарбоновой кислоты (Схема 1). На первой стадии проводили ее этерификацию в безводном метаноле с серной кислотой. Восстановление метилового эфира 4-пиридинкарбоновой кислоты боргидридом натрия осуществляли в сравнительно новой модификации с катализом метилатом натрия. 4-(Хлорметил)пиридин получали в виде гидрохлорида, так как концентрирование раствора 4-(хлорметил)пиридина в виде основания приводило к самоконденсации.

Получение 2-пиридилацетонитрила осуществляли путем нуклеофильного замещения цианистым натрием в ДМСО. Синтез 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила проводили с избытком диметилацетала диметилформамида (1,3 экв.), дополнительно разработав протокол очистки. Заключительной стадией стало образование пиразольного кольца при участии гидразина. Таким образом, средний выход 4-(пиридин-4-ил)-1*H*-пиразол-5-амина по результатам неоднократных повторов шестистадийного синтеза составил 41% в пересчете на исходную кислоту.

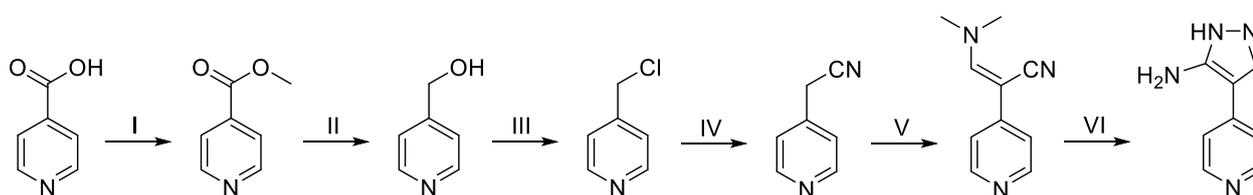


Схема 1 – Синтез 4-(пиридин-4-ил)-1*H*-пиразол-5-амина (фрагмент «АБ»)

Формирование пиразоло[1,5-*a*]пиримидинового скелета и введение арильного фрагмента (получение фрагмента «АБВГ») проводили в одну стадию при использовании 4-метоксифенилмалонового альдегида (Схема 2). С точки зрения стратегии такой вариант имеет некоторые преимущества за счет возможности параллельного получения замещенных 1,3-бисэлектрофилов.

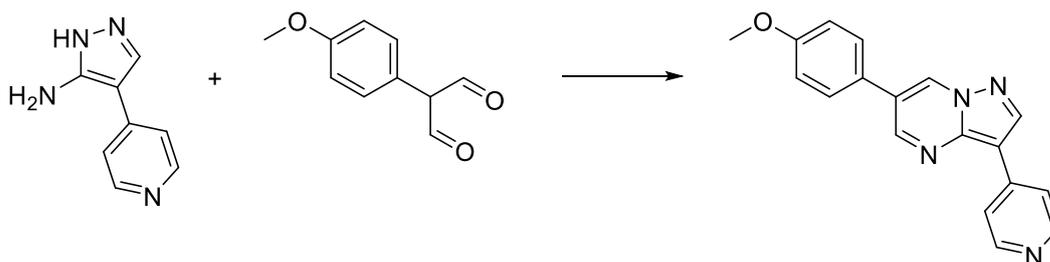


Схема 2 – Синтез пиразолопиримидинового скелета с арильным фрагментом (фрагмент «АБВГ»)

Однако мы столкнулись со сложностями на этапе синтеза 4-метоксифенилмалонового альдегида, провести очистку которого без существенных потерь нам не удалось. Использование сырого продукта на стадии циклизации приводило к образованию примесных соединений, трудноотделимых как физико-химическими, так и хроматографическими методами. Поэтому мы были вынуждены отойти от первоначальной схемы и разработать методику последовательного введения фрагментов «В» и «Г», а также использовать реакцию кросс-сочетания для образования С–С связи между этими фрагментами.

Согласно обновленной схеме (Схема 3), формирование пиразоло[1,5-а]пиримидинового скелета осуществляли при помощи броммалонового альдегида. Такой вариант построения функционализированной структуры выглядит более предпочтительным с точки зрения комбинаторной стратегии. Образование 6-бром-3-пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидина проходило со стабильно высоким выходом (около 90%), а сырой продукт не требовал специфической очистки.

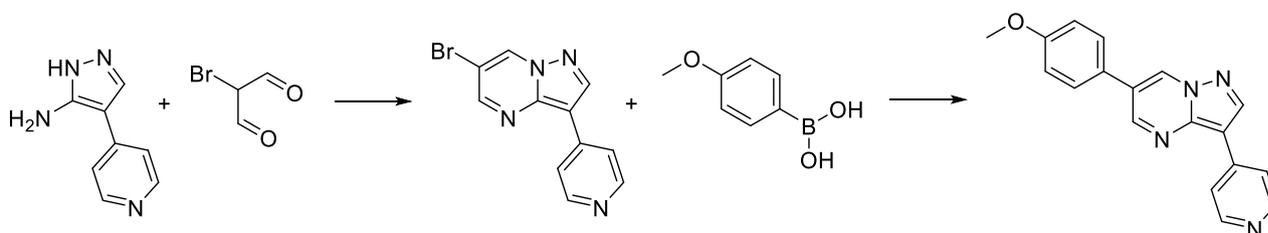


Схема 3 – Последовательное введение фрагментов «В» и «Г» в структуру молекулы

Формирование С–С связи между бромпроизводным пиразолопиримидина и 4-метокси замещенным бензольным кольцом осуществляли с помощью реакции Сузуки–Мияуры, для проведения которой синтезировали 4-метоксифенилборную кислоту. Реакция кросс-сочетания в стандартных условиях с применением $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]_4$ в качестве катализатора позволила получить конечный продукт высокой чистоты с хорошим выходом (87%).

Синтез циклоаминового фрагмента изначально осуществляли из этиленгликоля согласно Схеме 4. Для этого проводили монобензоилирование, свободную гидроксильную группу замещали на хлор, полученный хлорид использовали для алкилирования пиперидина, затем осуществляли гидролиз и вновь освободившуюся гидроксильную группу замещали на хлор.

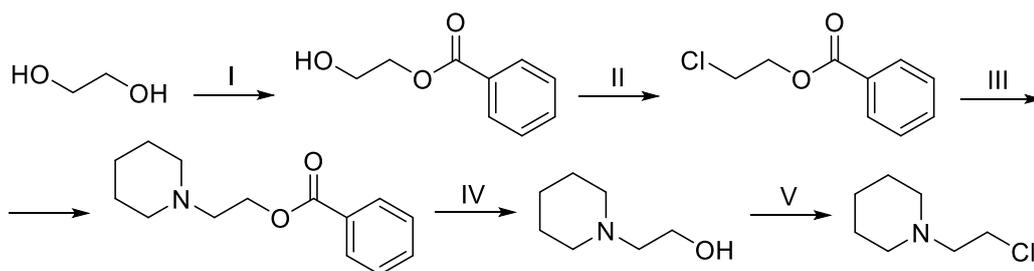


Схема 4 – Синтез циклоаминового алкильного фрагмента молекулы дорсоморфина

Получение конечного соединения (дорсоморфина) осуществляли путем деметилирования полученного ранее пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидинового фрагмента (фрагмент «АБВГ») и алкилирования 1-(2-хлорэтил)пиперидином (фрагмент «Д»), синтезированным на предыдущем этапе (Схема 5). Деметилирование проводили в хлористом метиле с использованием молярного эквивалента VBr_3 . Реакцию *O*-алкилирования освободившейся гидроксильной группы проводили в диметилформамиде в присутствии K_2CO_3 . К сожалению, суммарный выход после двух стадий не превышал 15–18%, несмотря на варьирование условий проведения

реакций. Тем не менее, использование линейной стратегии позволило получить и охарактеризовать целевой дорсоморфин.

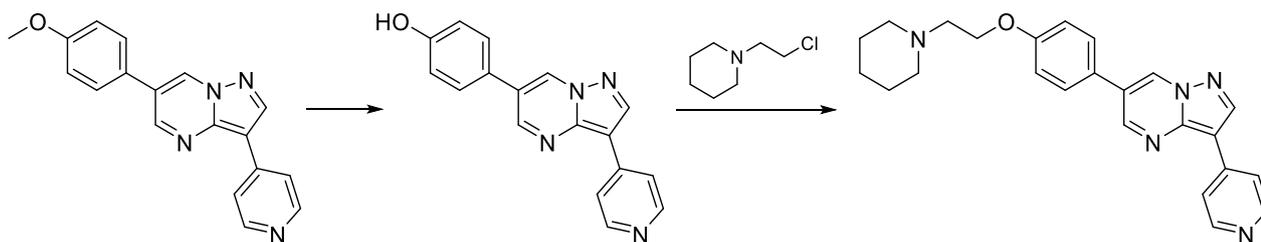


Схема 5 – Заключительные стадии синтеза дорсоморфина

Синтез дорсоморфина и его производных с использованием конвергентной стратегии

Умеренные выходы на конечных стадиях синтеза дорсоморфина при использовании линейной стратегии потребовали пересмотра синтетической схемы. Был предложен новый вариант, позволяющий получать не только сам дорсоморфин, но и его структурные аналоги.

Начальные этапы рационального дизайна обычно начинаются с создания библиотеки из нескольких десятков соединений, которые затем используются для первичной оценки зависимости «структура–активность». Структурные различия таких соединений должны быть небольшими, чтобы различия их реальной активности можно было объяснить результатами моделирования связывания с белком-мишенью.

При наработке сфокусированной библиотеки соединений линейная стратегия практически не применяется. Поэтому мы использовали конвергентную стратегию, на основе которой предложили следующую схему синтеза дорсоморфина и его производных: 1) А → АВ; 2) АВ → АВВ; 3) Г → ГД; 4) АВВ + ГД → АВВГД. Таким образом, основными прекурсорами для получения дорсоморфина, согласно предложенной схеме, могут выступать фрагменты, представленные на Рисунке 4.

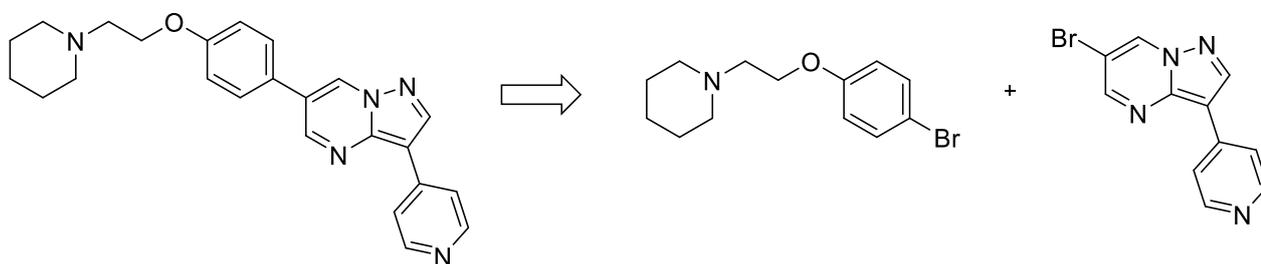


Рисунок 4 – Ретросинтетический анализ молекулы дорсоморфина

Основные точки модификации структуры дорсоморфина. Так как основной задачей в рамках работы являлось изучение зависимости «структура–активность» соединений пиразолопиримидинового ряда, были выделены структурные элементы дорсоморфина, для которых необходимо оценить вклад в целевую активность. Для этого были определены точки, по которым можно осуществлять модификацию молекулы дорсоморфина. При этом модификации пиразолопиримидинового

скаффолда, который определяет сходство дорсоморфина с молекулой АТФ, не рассматривали.

Первым структурным элементом является пиридиновый цикл, варьирование которого можно достичь путем изменения положения атома азота в кольце при использовании соответствующих исходных пиридинкарбоновых кислот. Согласно данным РСА, молекула дорсоморфина в сайте связывания принимает практически планарное положение, поэтому вторым важным моментом является угол плоскости фенильного фрагмента относительно пиразолопиримидинового ядра. Разворота фенильного кольца можно достичь путем введения заместителей, например метильных групп, в положения 5 и 7 пиразоло[1,5-а]пиримидина.

Также возможно введение дополнительных заместителей в фенильный фрагмент или изменение направления алкильного фрагмента за счет изменения положения атома кислорода относительно исходной молекулы дорсоморфина. В еще одну группу модификаций, позволяющую оценить функциональную значимость циклоаминового алкильного фрагмента, можно включить варьирование длины и структуры алкильной цепочки, а также циклического амина.

Все рассмотренные модификации являются незначительными изменениями в структуре дорсоморфина, однако их реализация позволяет определить значимость отдельных структурных элементов молекулы для проявления целевой ингибирующей активности.

Синтез производных, обеспечивающих варьирование положения атома азота и разворот фенильного фрагмента, начинали с получения соответствующих 3-пиридил- и 2-пиридил-замещенных аминопиразолов по схеме, аналогичной Схеме 1, при использовании 3-пиридинкарбоновой и 2-пиридинкарбоновой кислот. Дальнейшая задача заключалась в получении 6-бром-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных, для чего стадию циклизации проводили с броммалоновым альдегидом ($R = H$, Схема 6). Чтобы ввести заместители в пиримидиновое кольцо, которые обеспечили бы поворот фенильного кольца вокруг С–С связи относительно гетероциклического ядра, на стадии циклизации использовали 3-бромацетилацетон ($R = CH_3$, Схема 6). Во всех случаях реакция циклизации проходила в среде этанол/уксусная кислота с выходами от 75 до 92%, при этом продукты не требовали специфической очистки.

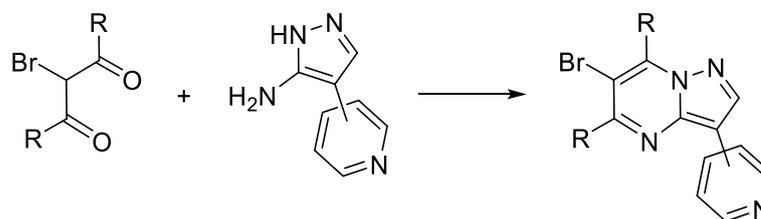


Схема 6 – Синтез производных пиразоло[1,5-а]пиримидина с варьируемым положением атома азота и заместителями

Синтез производных, обеспечивающих варьирование состава и ориентации аминоалкильного фрагмента, осуществляли с использованием различных арилалкильных фрагментов «ГД», для получения которых использовалась аналогичная схема получения алкильного фрагмента, разработанная в рамках

реализации линейной схемы синтеза дорсоморфина, с добавлением еще одной стадии – *O*-алкилирования бромфенолов (Схема 7).

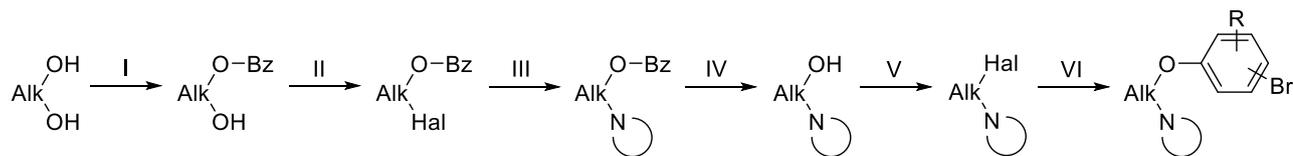


Схема 7 – Синтез арилалкильного фрагмента «ГД»

При создании серии аналогов дорсоморфина прежде всего рассматривали следующие варианты варьирования алкильной цепи, циклоаминового фрагмента и фенильного кольца, соответственно, для реализации которых при синтезе предполагали использование следующих реагентов (Рисунок 5):

- гликоли – этиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 2,2-диметилпропан-1,3-диол, 1,1-бис(гидроксиметил)циклопропан;
- циклические амины – пиперидин, пирролидин, морфолин, *N*-метилпиперазин;
- бромфенолы – 4-бромфенол, 3-бромфенол, 4-бром-2-метилфенол, 5-бром-2-метилфенол, 4-бром-2,6-диметилфенол.

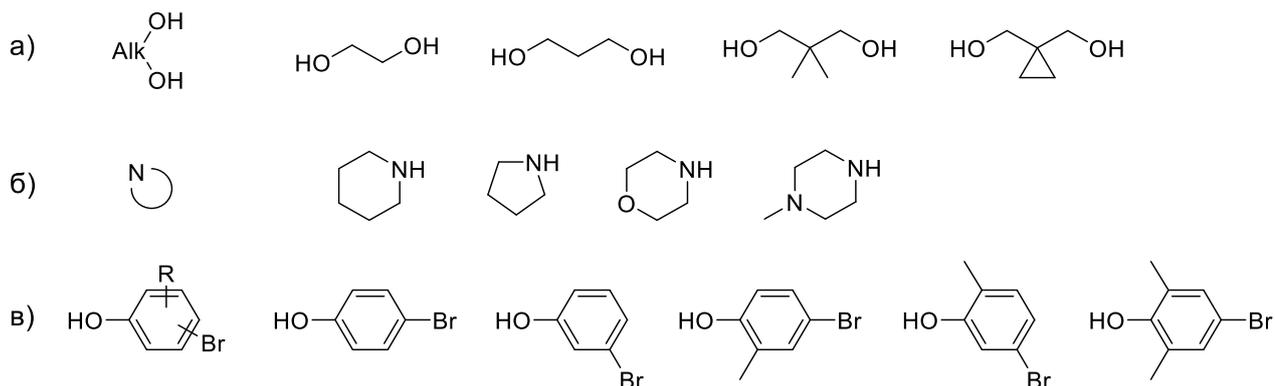


Рисунок 5 – Реагенты, использованные для варьирования структуры аналогов дорсоморфина

В качестве ацильной компоненты при реализации первой стадии Схемы 7 рассматривали как бензойную кислоту, так и уксусную кислоту. Показано, что монобензоилирование гликолей имеет два несомненных плюса: высокий инкремент липофильности фенильной группы и большая разница в температурах кипения исходного гликоля и его моно- и дибензоилированных производных. Однако продукты, полученные после третьей стадии синтеза, преимущественно имели слишком высокую температуру кипения для перегонки. Моноацетилирование должно было решить эту проблему. Тем не менее ацетилированные гликоли перегонялись без полного разделения моно- и диацетилированных производных. Таким образом, мы остановились на бензойной кислоте, которую в дальнейшем использовали в качестве ацильной компоненты.

При реализации стадии II Схемы 7 в качестве галогена рассматривали как хлор, так и бром. Известно, что для нуклеофильного замещения, представляющего собой третью стадию схемы, бром является более предпочтительным, чем хлор. Получение

бромпроизводных осуществляли взаимодействием моноацилированного продукта с бромом в ацетонитриле в присутствии трифенилфосфина. Нуклеофильное замещение галогена проводили в диметилформаменте с K_2CO_3 в качестве основания, и в случае бромидов выходы достигали 84–92%, тогда как в случае хлоридов выходы были заметно ниже.

Гидролиз сложных эфиров (стадия IV) осуществляли гидроксидом натрия в смеси вода/ТГФ, при этом выходы составили 90–94%. Галогенирование аминспиртов на пятой стадии синтеза проводили аналогично второй стадии. Завершающую стадию проводили по методике, использованной на третьей стадии, но с несколько меньшими выходами.

По рассматриваемой схеме были наработаны в препаративных количествах три фрагмента (Рисунок 6). Тем не менее подобная стратегия синтеза является громоздкой и малопригодной для наработки большого количества вариантов с целью получения библиотеки соединений.

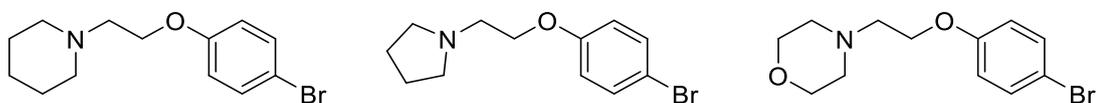


Рисунок 6 – Фрагменты «ГД», синтезированные по классической схеме

Для преодоления этого затруднения мы предложили исключить стадии галогенирования и осуществить прямую дегидратацию за счет реакции Мицунобу (Схема 8). Эта реакция была открыта как метод образования сложных эфиров с обращением конфигурации спиртов, движущим реагентом которого является диизопропиловый эфир азодикарбоновой кислоты (ДИАД). Данный метод вполне применим в разнообразных случаях дегидратации, в частности, для получения арил-алкиловых простых эфиров и образования связи C–N.

При классическом варианте проведения реакции Мицунобу выход составил около 3%. Подбор условий привел к методике проведения реакции, которая дала хорошие результаты даже в случае *N*-алкилирования (выход 74–86%). Конечно, существуют и другие эффективные методы аминирования спиртов, но в данном случае реакция Мицунобу имеет преимущества по простоте синтеза и доступности используемых реагентов.

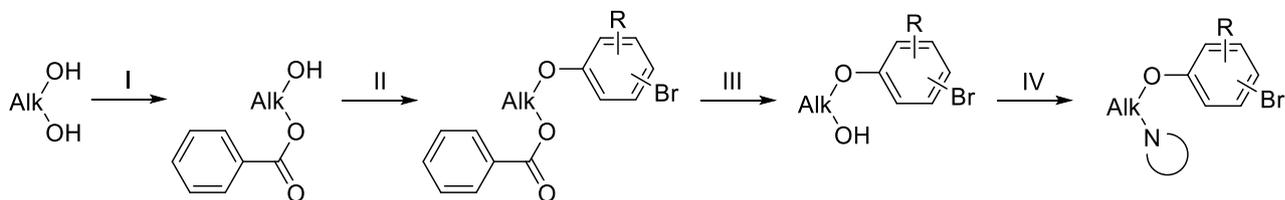


Схема 8 – Синтез фрагмента «ГД» с использованием реакции Мицунобу

Очистка продуктов при использовании Схемы 8 не требовала больших трудозатрат и осуществлялась пропусканием через слой силикагеля. Более высокая липофильность продуктов реакции Мицунобу по сравнению с исходными веществами позволила получить соединения удовлетворительной чистоты.

Поскольку атака активированного спирта фенолятом на последней стадии реакции Мицунобу происходит по SN_2 механизму, можно было ожидать низкие выходы при использовании стерически нагруженных орто-замещенных фенолов. В нашем случае успешно прошел синтез не только с орто-замещенными фенолами, но и с ди-орто-замещенным фенолом. Таким образом, с использованием разработанной схемы были наработаны и охарактеризованы еще шесть фрагментов (Рисунок 7).

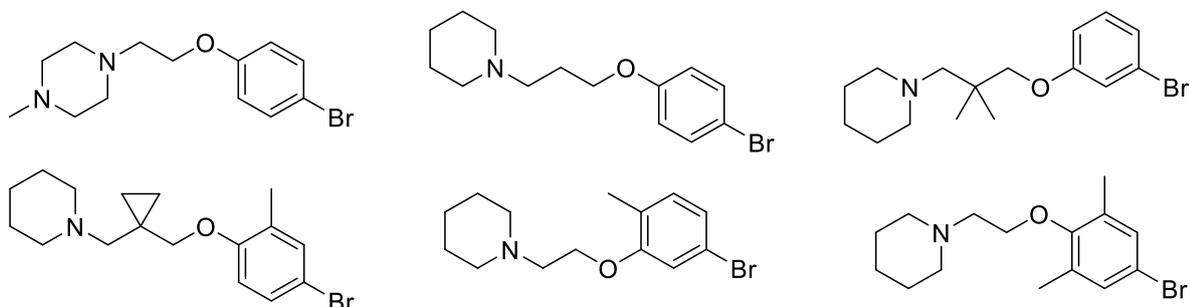


Рисунок 7 – Фрагменты «ГД», полученные по схеме с использованием реакции Мицунобу

Сборка конечных соединений из синтезированных фрагментов происходила за счет образования С–С связи по методу Сузуки–Мияуры, для которого требуется функционализация одного из сочетаемых фрагментов (Схема 9). С точки зрения построения библиотеки соединений более целесообразным является функционализация билдинг-блока, варьируемого в меньшей степени.

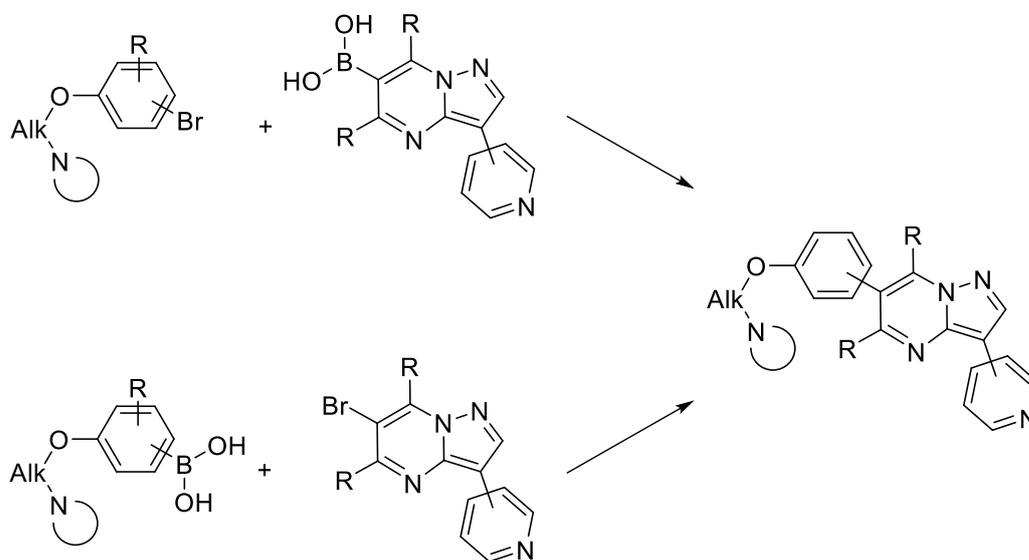


Схема 9 – Варианты сборки конечных молекул

Учитывая этот факт, борную функцию вводили в 6-бром-3-пиридил-замещенные пиразоло[1,5-а]пиримидины взаимодействием триметилбората с литиевыми производными пиразолопиримидинов. Производные получали обменной реакцией брома на литий с использованием *n*-бутиллития, при этом выходы составили 57–62%. Образование С–С связи осуществляли с помощью реакции Сузуки–Мияуры по методике, использованной ранее в рамках линейной схемы синтеза дорсоморфина.

По данной схеме было синтезировано десять структур при использовании различных комбинаций сочетаемых фрагментов (соединения **1–10**, Рисунок 8).

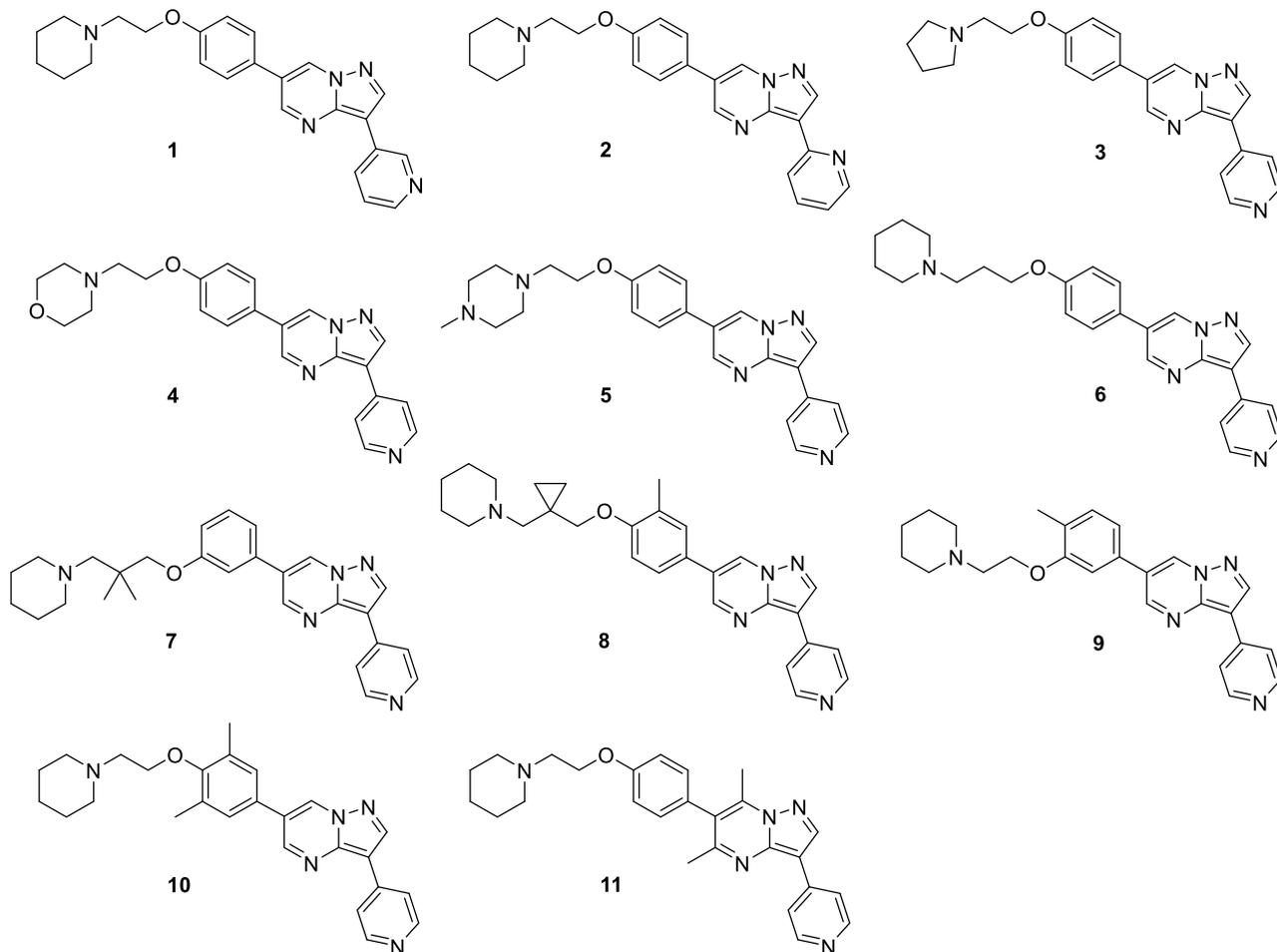


Рисунок 8 – Синтезированные структуры аналогов дорсоморфина

В случае 5,7-диметилзамещенного производного получить борную кислоту из пиразоло[1,5-а]пиримидиновой части нам не удалось. Поэтому синтез конечного соединения с 5,7-замещением в ядре осуществляли с предварительной функционализацией 1-(2-(4-бромфенокси)этил)пиперидина. Использование в качестве катализатора $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]_4$ для образования C–C связи не привело к образованию детектируемых количеств целевого продукта. При этом применение каталитической системы $\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{S-Phos}$, предложенной С. Бухвальдом для стерически затрудненных случаев кросс-сочетания, показало удовлетворительные результаты и позволило получить соединение **11** (Рисунок 8).

Таким образом, в ходе проделанной работы была реализована конвергентная стратегия синтеза дорсоморфина, на основе которой впервые синтезированы его 11 структурных аналогов для дальнейшего изучения зависимости «структура–активность».

Синтезированная малая серия соединений отличается максимально возможной диверсификацией в рамках сфокусированной библиотеки соединений, что позволяет провести оценочное определение биологической активности для выбора дальнейшего направления исследований.

Компьютерное моделирование дорсоморфина и его аналогов

Использование инструментов и методов рационального дизайна является современным трендом при разработке новых лекарственных кандидатов. Несмотря на то, что в рамках данной работы перед нами не стояло задачи осуществить модификацию дорсоморфина с целью увеличения его активности и селективности по отношению к АМФК, тем не менее мы решили создать виртуальную сфокусированную библиотеку близких аналогов дорсоморфина и смоделировать их взаимодействие с АМФК.

Создание виртуальной библиотеки соединений осуществляли с учетом пяти рассмотренных точек варьирования структуры дорсоморфина. В данной работе мы варьировали:

- 1) положение атома азота в пиридиновом ядре за счет использования различных пиридинкарбоновых кислот – 3 варианта;
- 2) поворот фенильного кольца за счет применения броммалонового альдегида или 3-бромацетилацетона – 2 варианта;
- 3) ориентацию алкильной цепочки и заместители в фенильном фрагменте за счет использования различных бромфенолов – 5 вариантов;
- 4) длину и состав алкильной цепи за счет использования различных гликолей – 4 варианта;
- 5) циклоаминовый фрагмент – 4 варианта.

Таким образом, максимальное возможное число конечных соединений, которые можно получить с использованием реагентов, позволяющих реализовать рассмотренные модификации, $3 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 4 \cdot 4 = 480$. Все эти соединения легли в основу виртуальной библиотеки аналогов дорсоморфина. Подобная сфокусированная библиотека будет полезна при исследованиях и других мишеней, содержащих АТФ-связывающий сайт.

Скрининг соединений по АТФ-связывающему сайту осуществляли для оценки соотношения «структура–активность» уже синтезированных соединений, а также определения дальнейших направлений исследования. Виртуальный скрининг созданной сфокусированной библиотеки соединений осуществляли по белковой модели АМФК, в качестве которой выбрали полноразмерную трехсубъединичную структуру АМФК в комплексе с дорсоморфином (модель PDB ID 7JHG). Референсным лигандом служил дорсоморфин, который также входил в библиотеку и подвергался скринингу.

Скрининг сфокусированной библиотеки проводили методом молекулярного докинга в режиме полужесткого докинга, когда белковая мишень считается жесткой, но при этом учитывается конформационная подвижность лиганда. По результатам расчетного эксперимента для каждого соединения из библиотеки были получены значения скоринговой функции, которая отражает энергетические характеристики его связывания с АТФ-связывающим сайтом АМФК.

В нашем случае, в качестве скоринговой функции анализировался показатель Docking Score, который приравнивался к значению расчетной активности соединения. Так как Docking Score является энергетической функцией, то чем меньше значение, тем сильнее взаимодействие и выше активность соединения. Значения рассматриваемой скоринговой функции для синтезированных соединений-аналогов дорсоморфина приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Значения скоринговой функции Docking Score синтезированных аналогов дорсоморфина по результатам скрининга сфокусированной библиотеки соединений

Соединение	Шифр	Docking Score
Дорсоморфин	40111	-8,7
1	30111	-8,2
2	20111	-7,4
3	40112	-8,2
4	40113	-8,3
5	40114	-8,6
6	40121	-8,5
7	40231	-8,1
8	40341	-8,3
9	40411	-8,9
10	40511	-8,7
11	42111	-6,9

Исследование «структура-активность»

Для того, чтобы оценить вклад каждого структурного элемента дорсоморфина в ингибирующую активность по отношению к АМФК, все синтезированные соединения были протестированы в эксперименте *in vitro* с использованием рекомбинантного трехсубъединичного комплекса АМФК и SAMS-пептида, являющегося синтетическим субстратом АМФК. Данные по ингибирующей активности соединений **1–11**, а также дорсоморфина приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Экспериментальная ингибирующая активность синтезированных соединений по отношению к АМФК. Дорсоморфин выступает в качестве положительного контроля

Соединение	Остаточная активность, %
Дорсоморфин	4 ± 1
1	10 ± 2
2	29 ± 5
3	6 ± 2
4	10 ± 2
5	4 ± 1
6	6 ± 2
7	10 ± 2
8	10 ± 2
9	4 ± 1
10	4 ± 1
11	25 ± 4

Согласно полученным данным, можно сделать вывод, что положение азота в пиридиновом кольце является критическим для проявления активности. И расчетные, и экспериментальные результаты показали, что с перемещением атома азота из 4 положения в 3 и 2 положение активность существенно падает. Вероятно, в качестве скаффолда дорсоморфина следует рассматривать не пиразоло[1,5-а]пиримидин, а 3-(4-пиридил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Изменение угла поворота фенильного фрагмента также драматически сказывается на ингибирующей активности.

Следует также отметить, что введение дополнительного атома кислорода в случае использования морфолина, а также введение заместителей в алкильную цепочку не является перспективным в плане дальнейшей оптимизации структуры дорсоморфина.

Для целей разработки более эффективного ингибирующего агента следует обратить внимание на более длинные алкильные цепочки, которые, по всей видимости, позволяют более благоприятно ориентировать циклоаминовый фрагмент, а также иные азот-содержащие циклоаминовые фрагменты. Перспективным является рассмотрение других замещенных пара- и мета-бромфенолов.

Если значения экспериментальной активности и расчетной активности синтезированных соединений нанести на график, то зависимость хорошо описывается линейной функцией (Рисунок 9). Это говорит о том, что при разработке более эффективных аналогов дорсоморфина с большой степенью достоверности можно использовать данные компьютерного моделирования.

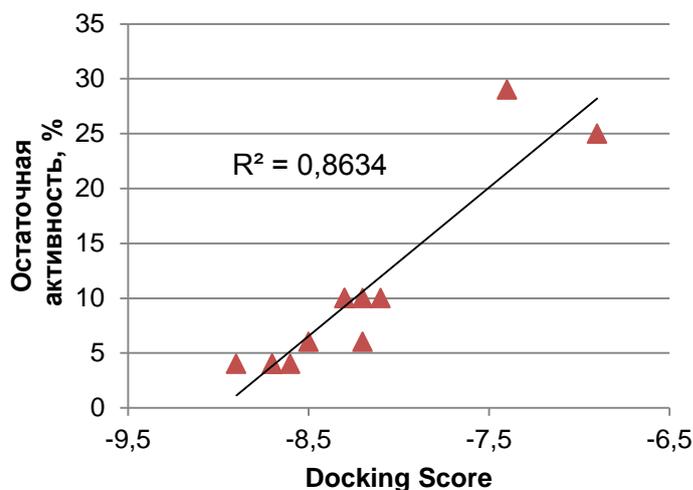


Рисунок 9 – Корреляция данных по экспериментальной активности и расчетной активности синтезированных соединений

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения исследования был разработан синтетический подход, позволяющий с использованием конвергентной стратегии синтеза получать дорсоморфин и его близкие структурные аналоги в количествах, достаточных для дальнейших биологических испытаний. Такие модифицированные соединения могут быть использованы для рационального дизайна новых селективных АТФ-конкурентных ингибиторов АМФК, а также других киназных мишеней.

1. Установлено, что линейная стратегия не является оптимальной при синтезе дорсоморфина и его аналогов. Была разработана синтетическая схема, позволяющая нарабатывать конечные соединения путем сочетания двух билдинг-блоков. Предложенная конвергентная схема является оптимальной для наработки сфокусированной библиотеки соединений.

2. Определены пять основных точек модификации молекулы дорсоморфина, которые позволили оценить вклад основных структурных элементов в ингибирующую активность по отношению к АМФК.

3. Показано, что предложенная конвергентная схема синтеза позволяет реализовать все рассматриваемые в работе модификации. Дальнейшая оптимизация схемы позволила существенно упростить синтез с использованием неклассической реакции Мицунобу.

4. Синтезирована серия аналогов дорсоморфина. Все полученные соединения были исследованы в *in vitro* эксперименте по ингибированию активности АМФК.

5. По результатам анализа полученных данных определены ключевые структурные фрагменты дорсоморфина, определяющие ингибирующую активность. Показана возможность применения рационального дизайна при разработке ингибиторов АМФК, а также определены дальнейшие направления исследований.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Новикова Д.С., Дарвиш Ф., Григорьева Т.А., Трибулович В.Г. Разработка воспроизводимого и масштабируемого метода синтеза биологически активных производных пиразоло[1,5-а]пиримидина // Журнал общей химии. – 2023. – Т. 95 – № 5. – С. 684–694. [Переводная версия: Novikova D.S., Darwish F., Grigoreva T.A., Tribulovich V.G. Development of a reproducible and scalable method for the synthesis of biologically active pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93. – No. 5. – P. 1040–1049. DOI: 10.1134/S1070363223050043].

2. Дарвиш Ф., Новикова Д.С., Григорьева Т.А., Трибулович В.Г. Производные пиразоло[1,5-а]пиримидина и их биологическая активность // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2024. – Т. 70. – № 96. – С. 53–59.

Тезисы докладов на конференциях

1. Дарвиш Ф., Новикова Д.С. Оптимизация синтетической схемы получения соединений на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных

«Ломоносов-2022», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2022. – 72 МБ. [Электронное издание]. – С. 476.

2. **Дарвиш Ф.**, Львова М.Ю. Реакции восстановления при синтезе низкомолекулярного ингибитора АМФК дорсоморфина // Сборник тезисов XII научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «НЕДЕЛЯ НАУКИ-2022» (с международным участием) 20–22 апреля 2022 г. – СПб: 2022. – С. 64.

3. **Дарвиш Ф.**, Аль Мустафа А., Трибулович В.Г. Изучение специфики восстановления пиразолопиримидинов // Материалы XIII научной конференции «Традиции и Инновации», посвященной 194-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) в рамках мероприятий 2022 года по проведению в Российской Федерации Десятилетия науки и технологий. 30 ноября – 2 декабря 2022 г. – СПб: 2022. – С. 58.

4. **Дарвиш Ф.**, Новикова Д.С. Синтез серии пиразоло[1,5-а]пиримидинов для построения зависимости структура–биологическая активность // Сборник тезисов XIII научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «НЕДЕЛЯ НАУКИ-2023» (с международным участием) 11–13 апреля 2023 г. – СПб: 2023. – С. 77.

5. **Дарвиш Ф.**, Новикова Д.С., Трибулович В.Г. Направленная модификация Compound C для повышения способности к ингибированию АМФК // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2023. – 121 МБ. [Электронное издание]. – С. 562.

6. **Дарвиш Ф.**, Трибулович В.Г. Разработка синтетического подхода для варьирования алкильного фрагмента Compound C // Материалы XIV научной конференции «Традиции и Инновации», посвященной 195-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), в рамках мероприятий по проведению в Российской Федерации Десятилетия науки и технологий, 20-23 ноября 2023 г. – СПб: 2023. – С. 84.

7. **Дарвиш Ф.**, Новикова Д.С., Трибулович В.Г. Синтез серии производных дорсоморфина с помощью реакции О-алкилирования // Сборник тезисов XIV научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «НЕДЕЛЯ НАУКИ-2024. Творчество молодежи – будущему России» (с международным участием). 22–24 апреля 2024 г. – СПб.: 2024. – С. 82.