

УДК 547.587.51:547.791/792

## СИНТЕЗ И ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БИБЛИОТЕК 2Н-ПИРАНО[2,3-с]ПИРИДИНОВ

И.А.Журавель, С.Н.Коваленко, А.В.Иващенко\*, К.В.Балакин\*,  
В.П.Черных, А.В.Скоренко\*, Я.А.Иваненков\*

Национальный фармацевтический университет,  
61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53. E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua

\* ООО "Предприятие Контакт-Сервис", г. Долгопрудный, Россия

*Ключевые слова:* 2Н-пирано[2,3-с]пиридины; виртуальный скрининг; мишень-специфическая активность; тирозиновые киназы

**С применением методов виртуального скрининга показана перспективность использования 2Н-пирано[2,3-с]пиридинов как ингибиторов тирозиновых киназ. Осуществлен дизайн и синтез комбинаторных библиотек данного класса соединений.**

### **SYNTHESIS AND VIRTUAL SCREENING OF LIBRARIES OF 2H-PYRANO[2,3-c]PYRIDINES**

**I.A.Zhuravel', S.N.Kovalenko, A.V.Ivashchenko, K.V.Balakin, V.P.Chernykh, A.V.Skorenko, Ya.A.Ivanenkov**

*With use of methods of virtual screening perspectives of use of 2H-pyrano[2,3-c]pyridines as tyrosine kinases inhibitors are shown. The design and synthesis of combinatory libraries of the given class of compounds have been carried out.*

### **СИНТЕЗ ТА ВИРТУАЛЬНИЙ СКРИНІНГ БІБЛІОТЕК 2Н-ПІРАНО[2,3-с]ПІРИДИНІВ**

**І.О.Журавель, С.М.Коваленко, О.В.Іващенко, К.В.Балакін, В.П.Черних, О.В.Скоренко, Я.О.Іваненков**

**З використанням методів віртуального скринінгу показана перспективність використання 2Н-пірано[2,3-с]піридинів як інгібіторів тирозинових кіназ. Здійснено дизайн та синтез комбінаторних бібліотек даного класу сполук.**

Хорошо известно, что кумарины (2Н-[1]-бензо-пиран-2-оны) представляют собой важный в практическом отношении класс гетероциклических соединений. Они находят применение как оптические отбеливатели, люминесцентные красители для искусственных волокон, флуоресцентные индикаторы рН, биологические маркеры, активные среды для лазеров. Соединения данного класса обладают широким спектром физиологической и фармакологической активности. Многие из них представляют собой перспективные субстанции, некоторые внедрены в медицинскую практику. Так, например, специализированная база данных по лекарственным препаратам Ensemble [Ensemble database, Prous Science, 2004; <http://www.prous.com>] содержит структуры более 300 различных производных кумаринов, обладающих физиологической активностью, в том числе являющихся коммерческими лекарственными субстанциями или находящимися на стадии клинических испытаний.

Особый интерес в плане поиска биологически активных объектов могут представлять изо-л-электронные аналоги и биоизостеры кумаринов, как, например, 2Н-пирано[2,3-с]пиридины (7-азакумарины), которые на сегодняшний день практически не изучены [1].

В настоящей работе с целью оптимизации поиска фармакологически активных соединений-лидеров разработаны синтетические методы, позволяющие получать библиотеки 2Н-пирано[2,3-с]пиридинов [2], и проведена оценка их потенциальной способности ингибировать тирозиновые киназы. Для синтеза комбинаторных библиотек замещенных 2Н-пирано[2,3-с]пиридинов СL1-6 в качестве исходного соединения предложено использовать пиридоксалия гидрохлорид — азааналог салицилового альдегида. Особое внимание было уделено возможности получения 2-имино-7-азакумаринов по реакции Кневенагеля, которые ранее не были получены.

Было установлено, что реакция пиридоксалия гидрохлорида А с замещенными амидами циануксусной кислоты протекает с хорошими выходами в безводной спиртовой среде при двукратном избытке пиперидина [3]. Эта методика была положена в основу технологии синтеза комбинаторной библиотеки 2-имино-5-гидроксиметил-8-метил-2Н-пирано[2,3-с]пиридин-3-Н-(R-арил)карбоксамидов СL1 (схема 1).

Наличие в структуре синтезированных соединений СL1 иминолактонного фрагмента позволяет рандомизировать библиотеку реакцией замещения с N-нуклеофильными реагентами. В качестве

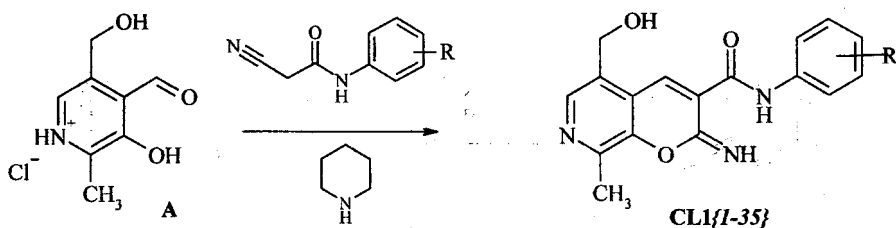


Схема 1

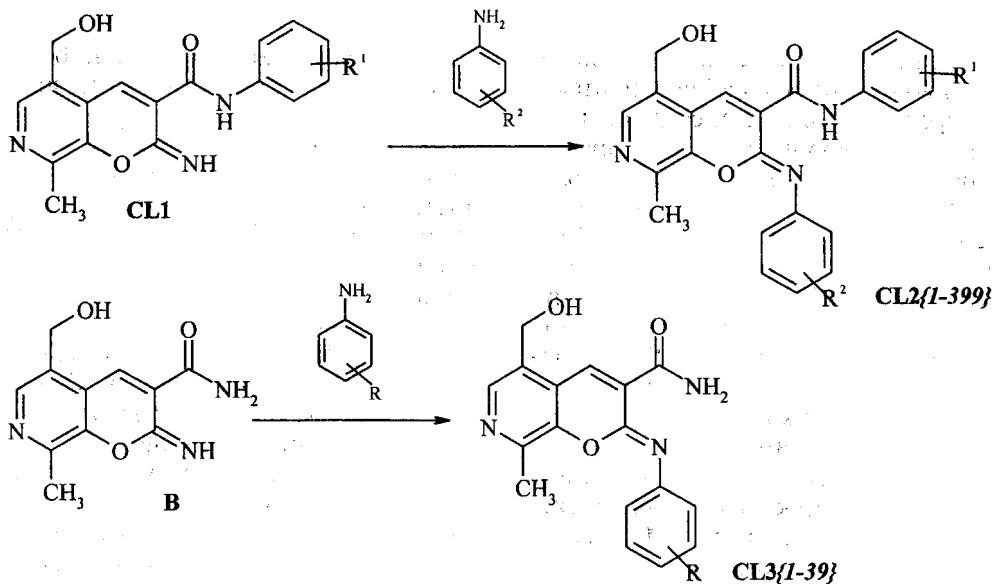


Схема 2

нуклеофильной компоненты были использованы ариламины с заместителями различной электронной природы. При этом важно было подобрать условия, исключающие возможность гидролиза иминогруппы и обеспечивающие максимальный выход конечного продукта. В результате получены библиотеки 2-(N-R<sup>1</sup>-арил)имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-с]пиридин-3-(N-R<sup>2</sup>-арил)карбоксамидов CL2 и 2-(N-R-арил)имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-с]пиридин-3-карбоксамидов CL3 с хорошими выходами (около 60-80%) (схема 2).

При гидролизе 2-имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-с]пиридин-3-арилкарбоксамидов CL2 в подкисленном этаноле при незначительном нагревании получена библиотека 2-оксоаналогов CL4 (схема 3).

Ацилированием 2-(N-R<sup>1</sup>-арил)имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-с]пиридин-3-(N-R<sup>2</sup>-арил)карбоксамидов CL2 уксусным ангидридом в ледяной уксусной кислоте получена библиотека сложных эфиров CL5 (схема 4).

В случае проведения реакции замещения 2-имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-с]пи-

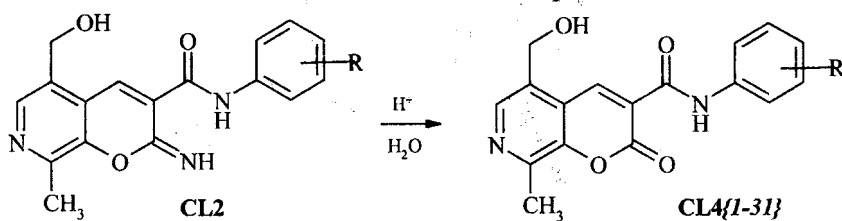


Схема 3

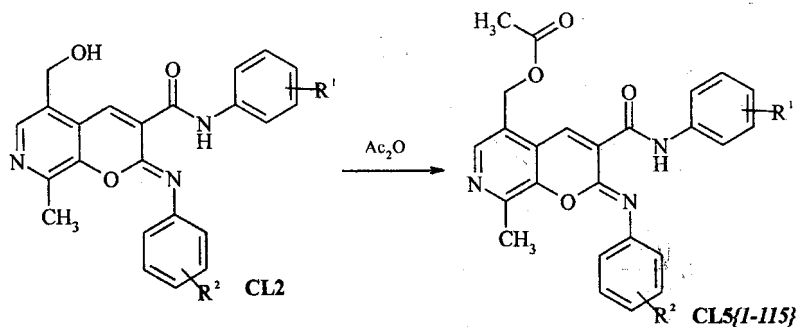


Схема 4

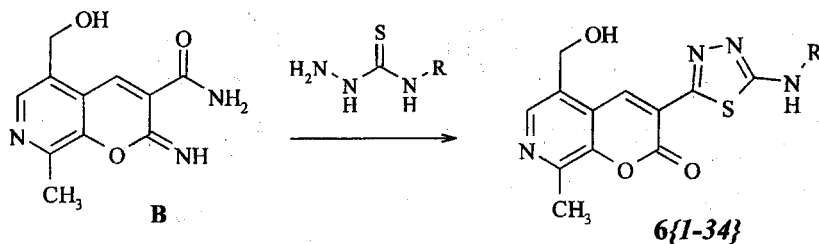


Схема 5

ридин-3-карбоксамид **B** с участием бинуклеофильных агентов возможно дальнейшее протекание процесса с формированием ансамблей циклов, содержащих два гетероциклических ядра [4]. С использованием данной перегруппировки получена библиотека 3-(5-N-R-амино-[1,3,4]тиадиазол-2-ил)-5-гидроксиметил-8-метилпирано[2,3-с]пиридин-2-онов **CL6** реакцией карбоксамид **B** с замещенными тиосемикарбазидами. В данном случае образующиеся на первой стадии взаимодействия 2-тиосемикарбазоно-производные претерпевают последующие термические превращения, которые сопровождаются рециклизацией и образованием 3-гетарил-7-азакумаринов (схема 5).

Строение всех полученных соединений доказано методами ИК-, ПМР-спектроскопии, масс-спектрометрическими измерениями, а в некоторых случаях — рентгеноструктурным анализом [2-6].

Для всех синтезированных библиотек с использованием алгоритма, разработанного ранее и основанного на классификационной модели “структура-активность” [7, 8], была проведена оценка потенциальной ингибирующей активности соединений по отношению к тирозиновым киназам.

Как известно, тирозиновые киназы (ТК) играют важную роль в передаче сигнальной информации в клетках посредством катализа переноса  $\gamma$ -фосфатной группы аденозин-5'-трифосфата (АТФ) на белковый субстрат [9] и участвуют в патогенезе многих хронических системных заболеваний. Ряд производных кумарина в эксперименте показал высокую ингибирующую активность по отношению к тирозиновым киназам (например, [10-12]),

что определило выбор данной биомиссии для биологических испытаний синтезированных нами соединений.

Для направленной селекции соединений, обладающих ТК-активностью, ранее нами была разработана модель, основанная на алгоритме опорных векторов (МОВ-модель). Для каждого соединения из независимой тестируемой выборки, состоящей из 220 ингибиторов ТК и 460 соединений, неактивных по отношению к ТК, были рассчитаны МОВ-индексы и вся выборка была отсортирована по убыванию МОВ-индекса. Более высокие индексы соответствуют большей вероятности проявления ТК-активности. На рис. 1 представлено распределение активных соединений в тестируемой выборке, представленные кривые обогащения описывают эффективность разделения между ТК-активными и ТК-неактивными соединениями. Кривая 2 на рис. 1 показывает число найденных активных соединений в сортированной выборке по мере движения от начала к концу списка. В идеальном случае, при котором модель присвоила бы наивысшие МОВ-индексы всем ТК-активным соединениям, эта кривая стремится к линии 1. В случае рандомизованной выборки, в которой активные и неактивные соединения перемешаны случайным образом, кривая обогащения стремится к линии 3. В реальном случае кривая 2 занимает промежуточное положение. Очевидно, что рассчитанные МОВ-индексы позволяют существенно обогатить первые позиции сортированного списка ТК-активными соединениями. Так, например, для нахождения 50% всех

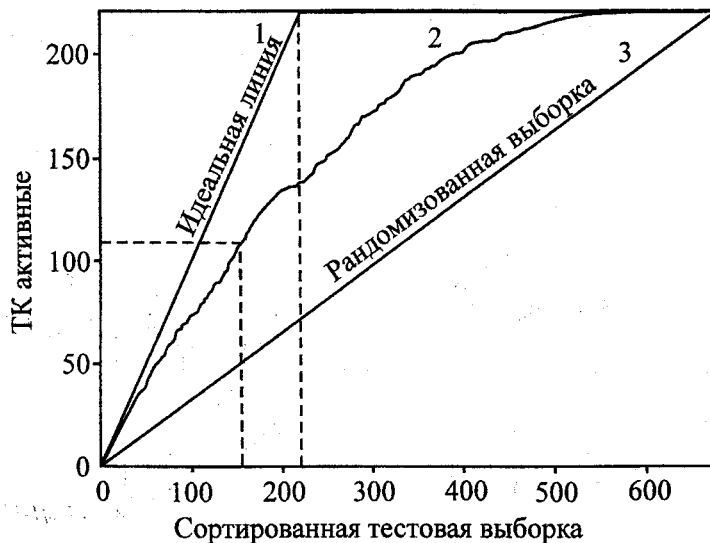


Рис. 1. Распределение ТК-активных соединений в тестируемой выборке.

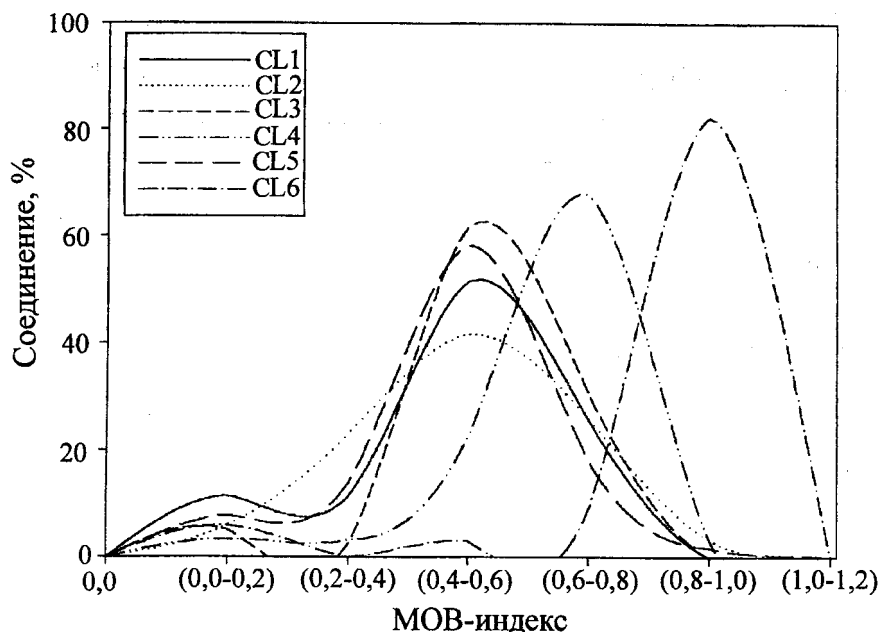


Рис. 2. Распределение соединений в комбинаторных библиотеках CL1-6 в соответствии с рассчитанными МОВ-индексами.

активных соединений потребуется реально протестировать примерно 150 соединений с наивысшими МОВ-индексами, а не все 680 соединений из первоначальной выборки. Несомненно, что подобная степень обогащения позволяет существенно экономить ресурсы при первичных испытаниях активности соединений.

В настоящей работе данная МОВ-модель применена для расчета МОВ-индексов шести синтезированных комбинаторных библиотек замещенных 2Н-пирано[2,3-с]пиридинов CL1-6. Диапазоны МОВ-индексов синтезированных соединений, соответствующие низкой, умеренной и высокой вероятности проявления ТК-ингибирующей активности, указаны в табл.

Полученные данные свидетельствуют о том, что представленные в настоящей работе замещенные 2Н-пирано[2,3-с]пиридины CL1-6 обладают высоким потенциалом проявления ТК-ингибирующей активности. Так, более 53% синтезированных соединений обладают МОВ-индексами, превышающими 0,5. Это значение было определено нами в предыдущей работе [8] как характеризующее большинство известных ТК-ингибиторов. В двух библиотеках (CL4 и CL6) доля таких соединений составляет примерно 90%. Из рис. 2, демонстрирующего распределение соединений в синтезированных библиотеках в диапазоне рассчитанных МОВ-индексов, хорошо видно, что эти две библиотеки отличаются от остальных более высокими значениями этой величины.

#### Експериментальна частина

Все растворители и реагенты были получены из коммерческих источников. Точки плавления синтезированных веществ получены на приборе фирмы "Buchi" (Швейцария) модель В-520.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры получены на спектрометрах фирмы

"Varian WXR-400" (200 MHz) в DMSO-D<sub>6</sub> или CDCl<sub>3</sub>. Внутренний стандарт — тетраметилсилан. ИК-спектры записаны на спектрофотометре "Specord M80" в таблетках KBr. ЭСП сняты на спектрофотометре "Specord M40" в пропанол-2, этаноле.

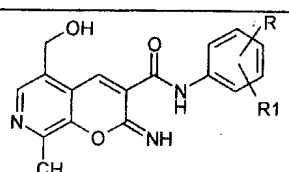
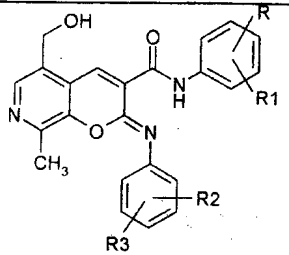
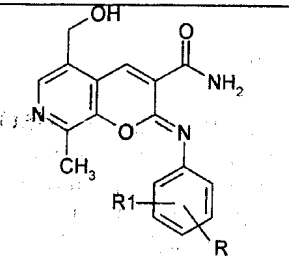
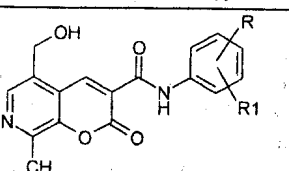
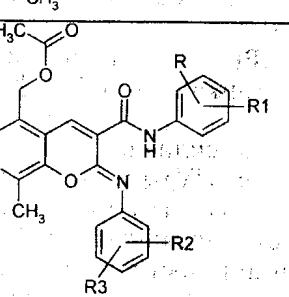
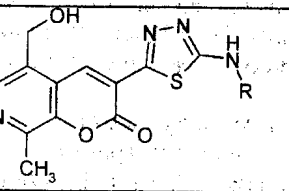
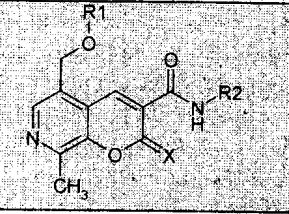
Содержание основного вещества контролировали с помощью HPLC на приборе Shimadzu 10-AV (колонка Luna-C18, Phenomenex, 25 смx4,6 мм, UV детектирование при 215 и 254 нм) и LC-MS на приборе Applied Biosystems (Shimadzu 10-AV LC, Gilson-215 автоматическая подача образца, масс-спектрометр API 150EX, детекторы UV (215 и 254 нм) и ELS, колонка Luna-C18, Phenomenex, 5 смx2 мм).

ТСХ проводили на силикагеле на алюминиевых пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (5 смx15 см) (Kavalier, Czech Republic) или на стеклянных пластинках с 0,25 мм слоем силикагеля 60 F<sub>254</sub> (Merck, Germany). Визуализация осуществлялась с помощью УФ-света при длине волны 254 нм. В соответствии с данными LC/MS все синтезированные соединения имели содержание основного вещества не ниже 95%.

Расчет и отбор молекулярных дескрипторов проведены при помощи программного продукта ChemoSoft компании "Chemical Diversity Labs" (Сан-Диего, США, www.chemdiv.com). Построение МОВ-модели осуществлялось при помощи программы SVMlight [14]. Все расчеты выполнены в операционной системе Windows 2000 на стандартном IBM PC-совместимом персональном компьютере с ЦПУ AMD Athlon 1,4 ГГц и 512 Мб оперативной памяти.

**Общая методика синтеза 5-гидроксиметил-2-имино-8-метил-2Н-пирано[2,3-с]пиридин-3-(N-арил) карбоксамидов 1{1-35}**. Смесь 0,05 Моль соответствующего замещенного амида цианоксусной кис-

МОВ-индексы для библиотек замещенных 2H-пирано[2,3-с]пиридинов CL1-6

Структура	Код	Число соединений в указанном диапазоне МОВ-индекса		
		0,0-0,3*	0,3-0,5**	0,5-1***
	CL1{1-35}	6	7	22
	CL2{1-399}	66	153	180
	CL3{1-39}	3	13	23
	CL4{1-31}	1	3	27
	CL5{1-115}	11	40	64
	CL6{1-34}	2	1	31
	CL1-6	89	217	347

\* низкая вероятность проявления ТК-активности;

\*\* умеренная вероятность проявления ТК-активности;

\*\*\* высокая вероятность проявления ТК-активности.

лоты и 0,05 Моль (10,18 г) пиридоксала гидрохлорида А растворяют при нагревании в 20 мл абсолютного метанола. К теплому раствору (40–45°C) добавляют по каплям 0,1 Моль (1 мл) очищенного пиперидина. Реакционную массу выдерживают при постоянном перемешивании при этой температуре в течение 20 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают метанолом, кристаллизуют из подходящего растворителя.

**Общая методика синтеза 5-гидроксиметил-8-метил-2-N-(R1-арил)-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-N(R2-арил)карбоксамидов 2{1-399}**. Соответствующий ароматический амин (0,002 Моль) растворяют при нагревании в 10 мл ледяной уксусной кислоты. В теплый раствор (30–40°C) добавляют 0,002 Моль (0,46 г) соответствующего 5-гидроксиметил-2-имино-8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-(N-арил)карбоксамид 1 и кипятят с обратным холодильником в течение 20–30 мин. При охлаждении реакционной смеси образуется обильный осадок, который отфильтровывают, промывают водой, этанолом и кристаллизуют из этанола или смеси этанол — диметилформамид.

**Общая методика синтеза 5-гидроксиметил-8-метил-2-N-(R-арил)-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-карбоксамидов 3{1-39}**. Соответствующий ароматический амин (0,002 Моль) растворяют при нагревании в 10 мл ледяной уксусной кислоты. В теплый раствор (30–40°C) добавляют 0,002 Моль (0,46 г) 5-гидроксиметил-2-имино-8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-карбоксамид В и кипятят с обратным холодильником в течение 20 мин. При охлаждении реакционной смеси образуется осадок, который отфильтровывают, промывают водой, этанолом и кристаллизуют из этанола или смеси этанол — диметилформамид.

**Общая методика синтеза 5-гидроксиметил-8-метил-2-оксо-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-N(R-арил)карбоксамидов 4{1-31}**. В 10 мл этанола помещают 0,005 Моль соответствующего 5-гидроксиметил-2-имино-8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-

(N-арил)карбоксамид 1. Реакционную массу нагревают до 45–50°C и по каплям при перемешивании добавляют 1N раствор HCl (до pH 4). Смесь охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой (2 по 15 мл), этанолом, кристаллизуют из смеси этанол — диметилформамид.

**Общая методика синтеза (8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-5-ил)метил ацетатов 5{1-115}**. В реактор помещают по 0,015 Моль уксусного ангидрида и 0,005 Моль соответствующего 5-гидроксиметил-8-метил-2-N-(R1-арил)-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-N(R2-арил)карбоксамид 2. Реакционную массу нагревают и при перемешивании кипятят в течение 60 мин. Полученную смесь охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой (3 по 20 мл), этанолом (2 по 15 мл) и кристаллизуют из этанола.

**Общая методика синтеза 3-(5-N-R-амино-[1,3,4]тиадиазол-2-ил)-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-2-онов 6{1-34}**. В 10 мл ледяной уксусной кислоты растворяют при нагревании 0,002 Моль соответствующего N<sup>(4)</sup>-замещенного тиосемикарбазида. В полученный теплый раствор добавляют 0,46 г (0,002 Моль) 2-имино-5-гидроксиметил-8-метил-2H-пирано[2,3-c]пиридин-3-карбоксамид В и кипятят в течение 20–30 мин. Реакционную массу охлаждают, осадок отфильтровывают, промывают водой, этанолом и кристаллизуют из смеси этанол — диметилформамид.

#### Выводы

Синтезированные в настоящей работе замещенные 2H-пирано[2,3-c]пиридины являются перспективным объектом для биологических испытаний на ингибирующую активность по отношению к тирозиновым киназам. Данные скрининга позволяют выделить группу структур для построения на их основе фокусированной библиотеки для скрининга по ингибированию abl-киназы, являющейся важной биомшенью, вовлеченной в процесс развития лейкемии [13].

#### Литература

1. Журавель И.А., Карасев А.А., Коваленко С.Н., Черных В.П. // *Избранные методы синтеза и модификации гетероциклов*. — М.: IBS PRESS, 2003. — Т. 2. — С. 159-192.
2. Журавель И.А., Иващенко А.В., Коваленко С.Н. и др. // *Заявка №2003 125 344, приоритет: 20.08.2003*.
3. Журавель И.О., Коваленко С.М., Черных В.П., Казмирчук В.В. // *ЖОФХ*. — 2004. — Т. 2, вып. 1 (5). — С. 11-16.
4. Zhuravel' I.O., Kovalenko S.M., Ivashchenko A.V. et al. // *J. Heterocyclic Chem.* — 2004. — Vol. 41. — P. 517-524.
5. Журавель И.О. // *36. науч. статей "Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики"*. — 2004. — Вип. XII, Т. II. — С. 29-34.
6. Kovalenko S.M., Baumer V.N., Zhuravel' I.O., Chernykh V.P. // *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep.* — 2004. — Vol. 60. — P. 187-189.
7. Балакин К.В., Иваненков Я.А., Шкуренко Н.Е. и др. // *ЖОФХ*. — 2004. — Т. 2, вып. 3 (7). — С. 47-53.
8. Балакин К.В., Иваненков Я.А., Скоренко А.В. и др. // *ЖОФХ*. — 2004. — Т. 2, вып. 4 (8). — С. 48-53.
9. Cohen P. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 1999. — №3. — P. 459-465.
10. Burke T.R., Lim B., Marquez V.E. et al. // *J. Med. Chem.* — 1993. — Vol. 36, №4. — P. 425-432.
11. Sudbeck E.A. *AACR-NCI-EORTC Int. Conf. Mol. Targets Cancer Ther.* — Nov. 16-19, Washington DC, 1999. — Abstr. 257.
12. Lee T.R., Lawrence D.S. // *J. Med. Chem.* — 2000. — Vol. 43, №6. — P. 173-1179.
13. Druker B.J., Lydon N.B. // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105. — P. 3-7.
14. Joachims T. in *Advances in Kernel Methods — Support Vector Learning*. Scholkopf, B.; Burges, C.; Smola, A.; Eds.; MIT Press, 1999. <http://svmlight.joachims.org/>