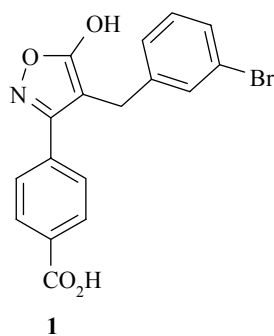
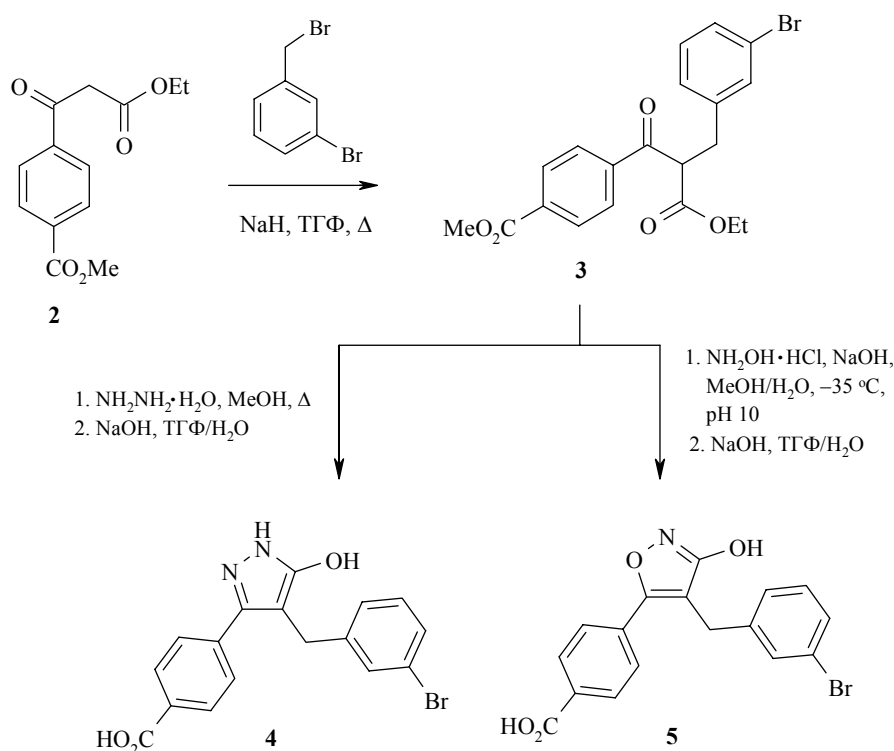


боновые кислоты, но они содержат легко метаболизируемые функции тио- и гидроксамовых кислот [7, 8]. Недавно мы обнаружили новый класс ингибиторов ГКП II на базе 3-(4-карбоксифенил)-5-гидроксиизоксазола, из которых самую высокую активность проявила 4-[4-(3-бромбензил)-5-гидроксиизоксазол-3-ил]бензойная кислота (**1**) ($IC_{50} = 1 \text{ мкМ}$).



Мы представляем результаты работы, предпринятой для модификации базового гетероцикла в ингибиторе **1**. Было решено заменить в 4-(3-бромбензил)-5-гидроксиизоксазоле **1** 5-гидроксиизоксазол на другие гетероциклы – 3-гидроксиизоксазол и 5-гидроксипиразол, чтобы установить взаимосвязь структура–активность между различными аналогами.

Исходным веществом для получения интересующих нас гетероциклических соединений является коммерчески доступный метиловый эфир 4-(2-этоксикарбонилацетил)бензойной кислоты (**2**).



В начале β -кетоефир **2** алкилировали 3-бромбензилбромидом в при-
1694

сутствии NaH [9] и получили метиловый эфир 4-[3-(3-бромфенил)-2-этоксикарбонилпропионил]бензойной кислоты (**3**). Далее для получения конечного продукта 5-гидроксипиразола **4** алкилированный β -кетоефир **3** конденсировали с гидразином в метаноле при нагревании и после образования пиразольного цикла проводили щелочной гидролиз эфирной группы. Для получения 3-гидроксиизоксазола **5** соединение **3** конденсировали с гидроксиламином в щелочной среде при пониженной температуре. В таких условиях происходит селективное образование 3-гидроксиизоксазола **5** [10]. Отметим, что при нагревании β -кетоефира **3** с гидрогенхлоридом гидроксиламина в нейтральной среде образуется соответствующий 5-гидроксиизоксазол.

Результаты тестов ингибиторной активности ГКП II показали, что 4-[5-гидрокси-4-(3-бромбензил)пиразол-3-ил]бензойная кислота (**4**) является практически неактивным ингибитором ГКП II (20% ингибирование при $c = 10$ мкМ), а ГКП II ингибиторная активность 4-[3-гидрокси-4-(3-бромбензил)изоксазол-5-ил]бензойной кислоты (**5**) ниже таковой начального соединения **1** ($IC_{50} = 7$ мкМ). Но такая активность достаточна для использования 3-гидроксиизоксазола как альтернативного базового гетероцикла для дальнейших исследований с целью получения ингибиторов ГКП II с наномолярной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H регистрировали на приборе Varian Mercury BB (200 МГц) в CDCl_3 (соединение **3**) и $\text{DMSO-}d_6$ (соединения **4** и **5**), внутренний стандарт ТМС. Хромато-масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Micromass Q-ToF micro и жидкостном хроматографе Acquity UPLC System, колонка Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1×50 мм. Температуры плавления веществ определяли на аппарате OptiMelt в капиллярах. Контроль за ходом реакции и индивидуальностью синтезированных соединений проводили методом ТСХ на пластинах DC Alufolien, Kieselgel 60 F_{254} (Merck) в системах петролейный эфир–этилацетат, 4:1, этилацетат–метанол, 9:1. Для проявления пластинок применяли пары иода, 1% раствор нингидрина в ацетоне и УФ лампу (длина волны 254–365 нм). Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel (35–70 и 60–200 мкм), элюент хроматографическая система петролейный эфир–этилацетат. Растворители очищали и высушивали, используя традиционные методы и осушающие агенты (CaO , NaOH , CaH_2 , CaCl_2), перед употреблением перегоняли. Реагенты приобретены из каталогов Acros и Aldrich.

Метиловый эфир 4-[3-(3-бромфенил)-2-этоксикарбонилпропионил]бензойной кислоты (3**).** Раствор 1.22 г (4.9 ммоль) 4-(2-этоксикарбонилацетил)бензойной кислоты (**2**) в 50 мл сухого ТГФ охлаждают на ледяной бане и при перемешивании небольшими порциями прибавляют 196 мг (4.9 ммоль) NaH (60% дисперсия в минеральном масле). Полученную смесь 20 мин перемешивают при охлаждении и далее 30 мин при комнатной температуре. После этого к смеси прибавляют по каплям раствор 593 мг (4.9 ммоль) 3-бромбензилбромид в 20 мл ТГФ и кипятят в течение 10 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 6 мл конц. HCl, 50 мл ледяной H_2O и тщательно перемешивают. Полученный раствор промывают этилацетатом (3×100 мл). Органические экстракты объединяют, промывают водой, насыщенным раствором NaCl и сушат над Na_2SO_4 . Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем, элюент петролейный эфир–этилацетат, 4:1. Выход целевого вещества 1.34 г (65%), бесцветные кристаллы, т. пл. 210–212 °С. Вещество существует в виде смеси кето- и энольного таутомеров. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.11, 1.25 и 1.34 (вместе 6H, все т, $J = 7$, OCH_2CH_3 кето- и энольного таутомеров); 3.29 (2H, д, $J = 7$, бензильные CH_2 кетотаутомера); 3.94 (6H, с, OCH_3 кето-

и энольного таутомеров); 4.10, 4.17 и 4.28 (вместе 4H, все к, $J = 7$, OCH_2CH_3 кето- и

енольного таутомеров); 4.58 (1H, т, $J = 7$, СН кетотаутомера); 5.73 (2H, с, бензильные CH_2 енольного таутомера); 7.08–7.38 (6H, м, 2,4,5-СН Ph); 7.81–8.16 (10H, м, 2,3,5,6-СН Ph, 6-СН Ph); 12.54 (1H, с, ОН енольного таутомера). Найдено, %: С 57.78; Н 4.33. $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{BrO}_5$. Вычислено, %: С 57.29; Н 4.57.

4-[5-Гидрокси-4-(3-бромбензил)пиразол-3-ил]бензойная кислота (4). К раствору 300 мг (0.72 ммоль) соединения **3** в 5 мл MeOH прибавляют 54 мг (1.07 ммоль) гидразингидрата и кипятят в течение 2 ч. Далее смесь охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 5 мл H_2O , тщательно перемешивают и отфильтровывают выпавший осадок. Осадок промывают водой и сушат при пониженном давлении. Выход метилового эфира 4-[5-гидрокси-4-(3-бромбензил)пиразол-3-ил]бензойной кислоты 70 мг (25%), белые кристаллы.

Растворяют 66 мг (0.17 ммоль) метилового эфира 4-[5-гидрокси-4-(3-бромбензил)пиразол-3-ил]бензойной кислоты в 2 мл смеси H_2O –ТГФ, 1:1. К раствору прибавляют 17 мг (0.43 ммоль) NaOH и перемешивают при комнатной температуре 12 ч. ТГФ упаривают при пониженном давлении, к остатку прибавляют 2 мл H_2O и подкисляют 10% HCl. Перемешивают, отфильтровывают выпавший осадок, промывают водой и сушат при пониженном давлении. Выход бензойной кислоты **4** 60 мг (95%), белые кристаллы, т. пл. 225 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 3.83 (2H, с, CH_2); 7.09–7.33 (3H, м, 4,5,6-СН Ph); 7.29 (1H, с, 2-СН Ph); 7.54 (2H, д, $J = 8$, 2,6-СН Ph); 7.92 (2H, д, $J = 8$, 3,5-СН Ph). $R_t = 6.41$ мин (>95%, при 254 нм). Масс-спектр, m/z (I , %): 373 [$\text{M}]^+$ (75), 293 (6), 217 (100), 199 (4), 173 (39), 169 (22), 143 (3). Найдено, %: С 53.25; Н 3.44; N 6.79. $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: С 54.71; Н 3.51; N 7.51.

4-[3-Гидрокси-4-(3-бромбензил)изоксазол-5-ил]бензойная кислота (5). Суспендируют 156 мг (2.24 ммоль) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ и 90 мг (2.24 ммоль) NaOH в 5 мл смеси MeOH– H_2O , 10:1, и перемешивают на водяной бане 10 мин. Полученную суспензию и 45 мг (1.12 ммоль) NaOH в 5 мл смеси MeOH– H_2O , 10:1, прибавляют к раствору 470 мг (1.12 ммоль) метилового эфира бензойной кислоты **3**. Смесь перемешивают при температуре –35 °С в течение 5 ч, потом нагревают до +5 °С и перемешивают еще 30 мин. После этого прибавляют 3 мл конц. HCl, тщательно перемешивают и упаривают при пониженном давлении. Остаток кристаллизуют из 10 мл H_2O , перекристаллизовывают из 5 мл MeCN, отфильтрованный осадок сушат при пониженном давлении. Получают 35 мг (8%) белых кристаллов метилового эфира 4-[3-гидрокси-4-(3-бромбензил)изоксазол-5-ил]бензойной кислоты.

Растворяют 35 мг (0.09 ммоль) метилового эфира 4-[3-гидрокси-4-(3-бромбензил)изоксазол-5-ил]бензойной кислоты в 2 мл смеси H_2O –ТГФ, 1:1. К раствору прибавляют 9 мг (0.23 ммоль) NaOH и перемешивают при комнатной температуре 12 ч. ТГФ упаривают при пониженном давлении, к остатку прибавляют 2 мл H_2O и подкисляют 10% HCl. Перемешивают, отфильтровывают выпавший осадок, промывают водой и сушат при пониженном давлении. Выход соединения **5** 25.3 мг (75%), белые кристаллы, т. пл. 255 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 3.95 (2H, с, CH_2); 7.16–7.29 (3H, м, 4,5,6-СН Ph); 7.39 (1H, с, 2-СН Ph); 7.78 (2H, д, $J = 8$, 2,6-СН Ph); 8.04 (2H, д, $J = 8$, 3,5-СН Ph); 11.84 (1H, уш. с, CO_2H). $R_t = 7.4$ мин (>99%, при 254 нм). Масс-спектр, m/z (I , %): 374 [$\text{M}]^+$ (100), 353 (18), 315 (3), 251 (7), 218 (45), 174 (56), 149 (11). Найдено, %: С 55.81; Н 3.51; N 3.52. $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BrNO}_4$. Вычислено, %: С 54.57; Н 3.23; N 3.74.

Ингибиторная активность глутаматкарбоксипептидазы II была определена измерением степени гидролиза N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата, помеченного тритием.

Параллельно проводят два идентичных эксперимента общим объемом 1 мл, каждый из которых содержит 50 ммоль Tris-HCl, pH 7.4, 30 нмол N-ацетил-L-аспартил-L-[3,4- ^3H]-глутамата и 30–50 мкг мембранного протеина. Тест инициируется добавлением к смеси мембранного протеина (с ингибиторами или без них), температуру которого предварительно уравнивают до 37 °С. Тестовый раствор интенсивно перемешивают и 15 мин выдерживают при температуре 37 °С. Эксперимент останавливают, добавляя к раствору ледяной буфер фосфата натрия (1.0 мл, 0.1 М, pH 7.4). Аликвоты тестового раствора наносят на ионообменную смолу Dowex AG 1-X8400 в мини колоннах PP (Millipore). [^3H]-Глутамат смывают с колонн 1.0 М формиатом (1.8 мл). Полученную смесь разбавляют 15 мл сцинтиллирующего раствора (SuperMix, Perkin–Elmer) и определяют радиоактивность при помощи сцинтилляционного спектрометра.

Работа выполнена при содействии Европейского социального фонда в рамках проекта "Поддержка развития докторантуры РТУ" Национальной программы "Содействие осуществлению программ докторантуры и исследований после нее", а также при финансовой поддержке Тайхо Фонда Латвия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. B. Robinson, R. D. Blakely, R. Couto, J. T. Coyle, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14498 (1987).
2. B. Wroblewska, J. T. Wroblewski, S. Pshenichkin, A. Surin, S. E. Sullivan, J. H. Neale, *Neurochem.*, **69**, 174 (1997).
3. W. Danysz, C. G. Parsons, I. Bresink, G. Quack, *Drug News Perspect.*, **8**, 261 (1995).
4. P. F. Jackson, B. S. Slusher, *Curr. Med. Chem.*, **8**, 949 (2001).
5. P. F. Jackson, K. L. Tays, K. M. Maclin, Y.-S. Ko, W. Li, D. Vitharana, T. Tsukamoto, D. Stoermer, X.-C. M. Lu; K. Wozniak, B. S. Slusher, *J. Med. Chem.*, **44**, 4170 (2001).
6. A. P. Kozikowski, J. Zhang, F. Nan, P. A. Petukhov, E. Grajkowska, J. T. Wroblewski, T. Yamamoto, T. Bzdega, B. Wroblewska, J. H. Neale, *J. Med. Chem.*, **47**, 1729 (2004).
7. P. Majer, P. F. Jackson, G. Delahanty, B. S. Grella, Y.-S. Ko, W. Li, Q. Liu, K. M. Maclin, J. Polakova, K. A. Shaffer, D. Stoermer, D. Vitharana, E. Y. Wang, A. Zakrzewski, C. Rojas, B. S. Slusher, K. M. Wozniak, E. Burak, T. Limsakun, T. Tsukamoto, *J. Med. Chem.*, **46**, 1989 (2003).
8. D. Stoermer, Q. Liu, M. R. Hall, J. M. Flanary, A. G. Thomas, C. Rojas, B. S. Slusher, T. Tsukamoto, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2097 (2003).
9. M. Nomura, T. Tanase, T. Ide, M. Tsunoda, M. Suzuki, H. Uchiki, K. Murakami, H. Miyachi, *J. Med. Chem.*, **46**, 3581 (2003).
10. E. Falch, L. Brehm, I. Mikkelsen, T. N. Johansen, N. Skjaebaek, B. Nielsen, T. B. Stensbol, B. Ebert, P. Krogsgaard-Larsen, *J. Med. Chem.*, **41**, 2513 (1998).

Латвийский институт органического синтеза,
Рига LV-1006, Латвия
e-mail: marinateus@osi.lv

Поступило 13.09.2007