

СИНТЕЗ НОВЫХ 3,5-ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*О.В. Демина, старший научный сотрудник, А.В. Лаптев, научный сотрудник, А.Ю. Лукин, ассистент, Н.Е. Беликов, аспирант, К.В. Звездин, аспирант, М.А. Фомин, студент, А.А. Ходонов, профессор, *С.Д. Варфоломеев, директор института, В.И. Швеиц, заведующий кафедрой кафедры Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
e-mail: ovd@sky.chph.ras.ru

Для выявления механизма действия потенциальных антиагрегационных средств класса 3,5-замещенных изоксазолов и определения строения фармакофорного фрагмента были синтезированы два новых соединения этого класса. Апробирована одностадийная схема синтеза соединений класса 5-замещенных пиридил-изоксазолов в условиях межфазного катализа.

Two new compounds belonging to 3,5-substituted isoxazoles class were synthesized for the action mechanism investigation and the pharmacophore fragment determination of potential anti-aggregative compounds of this class. An attempt to prepare of 5-phenyl-3-(3-pyridyl)isoxazole by the phase-transfer method was described.

Ключевые слова: 3,5-замещенные изоксазолы, [3+2]-циклоприсоединение, межфазный катализ, 3-пиридинальдоксим.

Key words: 3,5-substituted isoxazoles, [3+2] cycloaddition, phase-transfer catalysis, 3-pyridinaldoxime.

Введение

Поиск и разработка новых антиагрегационных средств является актуальной задачей в течение последних 50 лет, так как смертность вследствие нарушений в системе свертывания крови при сердечно-сосудистых заболеваниях занимает первое место в мире. В настоящее время большое внимание уделяется дизайну и синтезу новых химических структур, проявляющих этот вид биологической активности при взаимодействии как с традиционными мишенями – белками, так и с вновь открытыми [1]. Наиболее перспективными в этом плане являются гетероциклические соединения [1–5].

Гетероциклические соединения разных химических классов обладают широким спектром биологических активностей, и разработка методов получения библиотек гетероциклических соединений различных классов с большим разнообразием заместителей, обладающих заданной биологической активностью, является актуальной задачей комбинаторной органической химии [1–6].

Известно, что замещенные изоксазолы могут обладать следующим спектром биологических активностей: гипогликемической, антиканцерогенной, антиагрегационной, анальгетической, противовоспалительной, ulcerогенной, противомикробной и противогрибковой. Соединения этого класса могут быть селективными агонистами клонированных рецепторов D₄ дофамина человека, антагонистами GABA_A и ингибиторами циклооксигеназы-2 [1, 2]. За последние несколько лет отмечен большой интерес к поиску новых биологически

активных производных изоксазолов и дизайну новых синтетических схем их получения [2–5]. Общие методы получения замещенных изоксазолов не слишком изменились за последние 50 лет, и наиболее предпочтительными остаются два способа получения замещенных изоксазолов: из нитрилоксидов и алкинов по реакции [3+2]-циклоприсоединения или из традиционных синтонов – 1,3-дикетонов и гидроксил-амин [6]. Замещенные изоксазолы часто используют в различных синтетических схемах получения биологически активных веществ в качестве интермедиатов из-за возможности раскрытия изоксазольного цикла в мягких условиях [6].

Ранее нами впервые было доказано, что сочетание в одной молекуле двух фармакофорных фрагментов – пиридинового и изоксазольного, приводит к появлению антиагрегационной активности в приемлемом фармакологическом диапазоне [7, 8]. Более того, несколько наиболее активных соединений этой серии показали низкие значения острой токсичности [9, 10]. Для синтеза нами была использована реакция [3+2]-циклоприсоединения нитрилоксидов к алкинам, что позволило варьировать заместители по C5-положению изоксазольного кольца без дополнительных стадий синтеза, с сохранением в третьем положении изоксазольного кольца 2-, 3- или 4-пиридинового фрагмента в качестве заместителя. Нами было показано, что замещенные пиридил-изоксазолы являются потенциальными антиагрегационными средствами, проявляя активность *in vitro* на обогащенной тромбоцитами плазме

крови человека при использовании в качестве индуктора арахидоновой кислоты в диапазоне $10^{-6} - 10^{-4}$ М [8, 9].

В данной работе описан синтез двух новых соединений класса 3,5-замещенных изоксазолов, необходимых для дальнейшего исследования механизма действия на тромбоциты человека и определения фармакофорного фрагмента молекул этого класса, а также одностадийная схема получения синтезированного нами ранее 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола с использованием метода межфазного катализа.

Результаты и их обсуждение

Синтез 3,5-замещенных пиридилизоксазолов проводили по схеме, модифицированной нами ранее (схема 1, верхняя строка) [10]. Эта схема синтеза позволяет региоселективно получать 3,5-замещенные изоксазолы и их 4,5-дигидропроизводные, что было подтверждено при помощи масс- и ^1H -ЯМР-спектров [10, 11]. В качестве исходного соединения использовали продажный реактив, 3-пиридинальдоксим (**1**), который превращали в гидрохлорид хлорангидрида пиридин-3-гидроксимовой кислоты (**2**) с выходом 95% при хлорировании газообразным

хлором в дихлорметане. 5-Замещенные пиридилизоксазолы получали по реакции [3+2]-циклоприсоединения при прибавлении 2 экв. триэтиламина к смеси 1 экв. гидрохлорида хлорангидрида пиридин-3-гидроксимовой кислоты (**2**) и 3-5 экв. терминального ацетиленового производного. Нами было установлено, что для нормального протекания реакции с теми же выходами вместо избыточных 5 экв. терминального ацетиленового или этиленового производного достаточно 3 экв. Процедура медленного прибавления триэтиламина при температуре реакционной смеси $-5 \div 0^\circ\text{C}$ для генерирования нитрилоксидов является обязательной для данной реакции, так как позволяет снизить скорость конкурирующей побочной реакции димеризации с образованием фурансанов.

Как показали проведенные эксперименты, реакция [3+2]-циклоприсоединения протекала региоселективно, и по данным ТСХ и анализа строения продуктов с помощью масс- и ^1H -ЯМР спектров образования 3,4-замещенного региоизомера изоксазолов не было зафиксировано ни в одном случае.

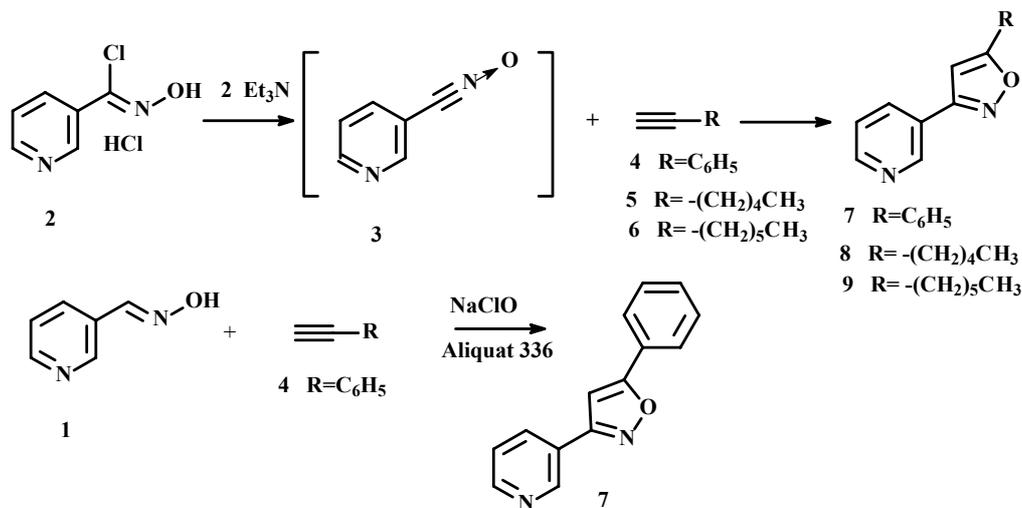


Схема 1. Схема синтеза 5-замещенных 3-(3-пиридил)изоксазолов.

Полученные продукты **8-9** имели низкие значения температуры плавления $-30-34^\circ\text{C}$ для 5-гексил- и $16-20^\circ\text{C}$ для 5-пентил-3-(3-пиридил)изоксазола, что привело к необходимости использовать для их выделения вместо простой процедуры кристаллизации колоночную хроматографию с дополнительной очисткой при помощи системы флэш-хроматографии «Biotage Flash+» (картридж – 15×150 мм, силикагель). Система «Biotage Flash+» позволила быстро и эффективно очистить целевые вещества до гомогенности. Этот вариант проведения полупрепаративной колоночной хроматографии обладает несомненным преимуществом перед обычными открытыми колонками при выделе-

нии продуктов реакции с очень близкими значениями R_f продуктов и примесей практически без потерь основного вещества, при минимальных расходах элюентов (петroleumный эфир – этилацетат) и уменьшении времени разделения.

Структура синтезированных соединений **7-9** была подтверждена на основании данных ^1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии электронного удара.

Для исключения из схемы синтеза трудоемкой стадии хлорирования газообразным хлором нами успешно была проведена апробация одностадийного способа получения 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола (**7**) из исходных

веществ – 3-пиридинальдоксима (1) и фенилацетилена (4) при использовании катализатора межфазного переноса – Aliquat 336 (схема 1, нижняя строка) в двухфазной системе дихлорметан – раствор «Белизны». В условиях межфазного катализа в качестве хлорирующего агента был применен продажный препарат «Белизна» с содержанием гипохлорита натрия от 4 до 7%, при этом хлорирование, генерирование нитрилоксиоксида и целевая реакция [3+2]-цикло-присоединения происходили одновременно на границе раздела фаз двухфазной системы дихлорметан – раствор «Белизны». Изоксазол 7 был также синтезирован по реакции [3+2]-циклоприсоединения с целью сравнения выходов для двух схем синтеза. В случае одностадийной схемы синтеза целевой продукт 7 был получен с низким выходом по сравнению с выходом по стандартной схеме: 15.7 и 38%, соответственно. Использование в качестве катализатора межфазного переноса других реагентов – гидроксида бензилтриметил-аммония и 18-крауна-6 – оказалось менее удачным: в первом случае при мониторинге реакции детектировались лишь следы продукта, во втором случае количество целевого продукта не превышало 7%. Мы полагаем, что дальнейшее усовершенствование этого процесса позволит повысить выход до 30-40%.

Ранее нами было показано, что 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазол (7) обладает антиагрегационной активностью в фармакологически приемлемом диапазоне 10^{-6} – 10^{-4} М [9, 12]. Первичная проверка 5-гексил-3-(3-пиридил)-изоксазола (9) на антиагрегационную активность *in vitro* в Гематологическом научном центре РАМН по ранее апробированной нами методике [13] позволила сделать вывод, что данное вещество обладает антиагрегационной активностью, и значение IC_{50} для него составляет <100 мкМ. Дальнейшее исследование данного соединения и 5-пентил-3-(3-пиридил)-изоксазола (8) в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов при сравнении с 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазолом (7) позволит уточнить структуру фармакофорного фрагмента его молекулы, в частности – необходимость наличия фенильного заместителя в C5-положении изоксазольного кольца.

Экспериментальная часть

В работе использовались: катализатор межфазного переноса Aliquat 336 (Aldrich, США), 1-гептин, 1-октин, 18-краун-6, 3-пиридинальдоксим (Merck, Германия), соляная кислота, триэтиламин, фенилацетилен, препарат отбеливающего средства «Белизна» (Россия), силикагель SilPerl (Kavalier, Чехия), растворители отечественного производства марки «х.ч.»: ди-

хлорметан, этанол, гексан, метанол, диэтиловый эфир. Все растворители были перегнаны перед использованием. Фенилацетилен предварительно очищали перегонкой в атмосфере аргона непосредственно перед реакцией.

Спектры 1H -ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе и диметилсульфоксиде- d_6 , на спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000). Масс-спектры регистрировали на приборе Finnigan-4021 (США) с прямым вводом образца при энергии ионизации 70 эВ.

Температуры плавления соединений были определены на столике Кофлера с точностью 1-2°C.

Тонкослойную хроматографию всех соединений проводили на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия), Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия) и Sorbfil (Россия) в системе растворителей метанол – хлористый метилен, 1 : 90, детекцию пятен – в УФ-свете и в парах йода.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель SilPerl (Чехия). Для дополнительной очистки аналитических образцов соединений 8-9 применяли препаративную колоночную хроматографию на флеш-хроматографе модели «Biotage Flash+», картридж – 15×150 мм, силикагель (Biotage Inc., США), в системе петролейный эфир – этилацетат, с подачей элюента при помощи полупрепаративного жидкостного насоса среднего давления (Чехия), давление 2-10 атм, расход 8 мл/мин.

Гидрохлорид хлорангидрида пиридин-3-гидроксимовой кислоты (2). К раствору 6.32 г (0.052 моль) коммерчески доступного 3-пиридинальдоксима (1) в 150 мл свежеперегнанного дихлорметана при -15 ÷ -10°C и перемешивании пропускали сильный ток сухого хлора в течение 3 ч до появления устойчивой желто-зеленой окраски реакционной массы с выпадением осадка гидрохлорида 3-пиридилгидроксимоилхлорида (2). Затем реакционную массу разбавляли 250 мл сухого эфира, и осадок отделяли на фильтре, промывали сухим диэтиловым эфиром (3×100 мл), сушили при 0.01 мм рт. ст. Выход: 9.5 г (95%), т. пл. 192-193°C (лит. данные: т. пл. 196°C (CH₃OH) [9]). 1H -ЯМР-спектр (δ , ДМСO- d_6): 7.98 (1H, дд, J = 8.2, 5.0 Гц, 5-H(Py)); 8.70 (1H; ддд, J = 8.2, 2.0, 1.2 Гц, 4-H(Py)); 8.94 (1H, дд, J = 5.0, 1.2 Гц, 6-H(Py)); 9.10 (1H, д, J = 2.0, 2-H(Py)); 9.64 (1H, ушир. с, N-H); 13.26 (1H, ушир. с, =N-OH). Найдено, %: С 36.95; Н 2.98; N 13.72; Cl 35.87. C₆H₆N₂Cl₂O. Вычислено, %: С 37.33; Н 3.13; N 14.51; Cl 36.73.

3-(3-Пиридил)-5-фенилизоксазол (7). К перемешиваемому раствору 1.56 г (0.008 моль) гидрохлорида пиридил-3-гидроксимоилхлорида (2) и 4.1 г (0.04 моль) фенилацетилена (4) в 100

мл сухого этанола по каплям при $-5 \div 0^\circ\text{C}$ прибавляли раствор 1.62 г (0.016 моль) триэтиламина в 30 мл сухого этанола. Реакционную массу выдерживали 20-24 ч при 20°C , затем растворитель удаляли в вакууме. Полученный остаток суспендировали в 50 мл сухого эфира, выпавший осадок гидрохлорида триэтиламина отделяли фильтрованием, промывали сухим эфиром (3×10 мл). Объединенные фильтраты упаривали, остаток дважды перекристаллизовали из бензола. Выход: 0.68 г (38%), т.пл. $142-143^\circ\text{C}$, R_f 0.57. ^1H -ЯМР-спектр (δ , $\text{DMCO}-d_6$): 7.6 (1H, дд, $J = 8.2, 5.0$ Гц, 5- $\text{H}(\text{Py})$); 8.30 (1H, ддд, $J = 8.2, 2.5, 1.8$ Гц, 4- $\text{H}(\text{Py})$); 8.71 (1H, дд, $J = 5.0, 1.8$ Гц, 6- $\text{H}(\text{Py})$); 9.11 (1H, д, $J = 2.0$ Гц, 2- $\text{H}(\text{Py})$); 7.72 (1H, с, 4- H изокс.); 7.58-7.72 (5H, м, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-Ph}$). Масс-спектр (m/z): 222.3 [M^+]. Найдено, %: С 74.89; Н 4.21; N 11.78. $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 75.57; Н 4.53; N 12.60.

5-Пентил-3-(3-пиридил)изоксазол (8) получали аналогично соединению (7) из 1.5 г (0.0078 моль) гидрохлорида 3-пиридилгидроксимоилхлорида (2) и 2.26 г (0.0234 моль) 1-гептина (5) в течение 48 ч. После стандартной обработки объединенные фильтраты упаривали, полученный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем SilPerl с использованием в качестве элюента смеси дихлорметан – этанол с градиентом этанола от 1 до 10%. Выход: 0.44 г (26%), R_f 0.76. ^1H -ЯМР-спектр (δ , CDCl_3): 0.91 (3H, т, CH_3 -пентил); 1.36 (4H, м, H_2C -пентил); 1.75 и 2.82 (4H, м, H_2C -пентил); 6.35 (1H, с, 4-Н изокс.); 7.4 (1H, дд, $J = 8.1, 5.0$ Гц, 5- $\text{H}(\text{Py})$); 8.17 (1H, ддд, $J = 8.1, 2.5, 1.8$ Гц, 4- $\text{H}(\text{Py})$); 8.66 (1H, дд, $J = 5.0, 1.8$ Гц, 6- $\text{H}(\text{Py})$); 9.01 (1H, д, $J = 2.0, 2\text{-H}(\text{Py})$). Масс-спектр (m/z): 216.1 [M^+].

5-Гексил-3-(3-пиридил)изоксазол (9) получали аналогично соединению (8) из 2.0 г (0.0104 моль) гидрохлорида 3-пиридилгидроксимоилхлорида (2) и 3.44 г (0.0312 моль) 1-октина (6) в течение 20-24 ч. Очистку проводили аналогично приведенной для соединения (8) процедуре (градиент этанола в дихлорметане от 2 до 10%). Выход: 0.89 г (37%), белое аморфное, R_f 0.75. ^1H -ЯМР-спектр (δ , CDCl_3): 0.89 (3H, т, CH_3 -гексил); 1.33 (6H, м, H_2C -гексил); 1.75 и 2.83 ($2 \times 2\text{H}$, м, H_2C -гексил); 6.41 (1H, с, 4-Н изокс.); 7.75 (1H, дд, $J = 8.1, 5.0$ Гц, 5- $\text{H}(\text{Py})$); 8.54 (1H, ддд, $J = 8.1, 2.5, 1.8$ Гц, 4- $\text{H}(\text{Py})$); 8.74 (1H, дд, $J = 5.0, 1.8$ Гц, 6- $\text{H}(\text{Py})$); 9.11 (1H, д, $J = 2.0$ Гц, 2- $\text{H}(\text{Py})$). Масс-спектр (m/z): 230.1 [M^+].

Получение 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола (7) с использованием метода межфазного

катализа. К перемешиваемому раствору 1.03 г (0.0082 моль) 3-пиридинальдоксима (1), 1.3 г (0.0127 моль) фенилацетилена (4) и 100 мкл Aliquat 336 в 60 мл дихлорметана по каплям прибавляли 15.3 мл препарата «Белизна» (~ 0.0082 моль гипохлорита натрия) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 20°C . Мониторинг реакции проводили при помощи ТСХ в системе дихлорметан – этанол, 10 : 1. Отделяли слой дихлорметана от водного слоя в делительной воронке, экстрагировали содержимое водного слоя дихлорметаном (3×20 мл), затем объединенный органический экстракт сушили сульфатом натрия с последующей фильтрацией и удалением растворителя в вакууме. Остаток в количестве 1.9 г хроматографировали на колонке с силикагелем SilPerl с использованием в качестве элюента смеси дихлорметан – этанол с градиентом этанола от 1 до 20%. Выход: 0.29 г (15.7%), т. пл. $142-143^\circ\text{C}$, R_f 0.57. ^1H -ЯМР спектр (δ , $\text{DMCO}-d_6$): 7.6 (1H, дд, $J = 8.2, 5.0$ Гц, 5- $\text{H}(\text{Py})$); 8.30 (1H, ддд, $J = 8.2, 2.5, 1.8$ Гц, 4- $\text{H}(\text{Py})$); 8.71 (1H, дд, $J = 5.0, 1.8$ Гц, 6- $\text{H}(\text{Py})$); 9.11 (1H, д, $J = 2.0, 2\text{-H}(\text{Py})$); 7.72 (1H, с, 4- H изокс.), 7.58-7.72 (5H, м, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-Ph}$). Масс-спектр (m/z): 222.3 [M^+].

Заключение

Нами был осуществлен синтез двух новых производных 3-(3-пиридил)изоксазолов **8-9**, содержащих в 5-м положении изоксазольного кольца пентильный и гексильный фрагменты, по реакции [3+2]-циклоприсоединения из исходного 3-пиридинальдоксима и соответствующего терминального ацетилена с умеренными выходами при использовании флэш-хроматографической системы «Biotage Flash+» для очистки веществ с очень близкими значениями R_f (ΔR_f 0.05–0.1). На примере 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола (7) успешно проведена апробация одностадийного способа получения 5-замещенных пиридилизоксазолов с применением межфазного катализа в двухфазной системе дихлорметан – раствор «Белизна». Предварительное тестирование 5-гексил-3-(3-пиридил)изоксазола (9) на антиагрегационную активность *in vitro*, выполненное нами, подтвердило, что данное соединение является ингибитором агрегации тромбоцитов человека.

Данная работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 09-04-01003а и госконтракта № 16.740.11.0177 в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Агрегация тромбоцитов человека: молекулярно-кинетические механизмы и пути регуляции / О. В. Демина, А. А. Ходонов, В. И. Швеи, С. Д. Варфоломеев // Биол. мембраны. – 2002. – Т. 19, № 2. – С. 115–152.
2. Waldo, J. P. Synthesis of isoxazoles via electrophilic cyclization / J. P. Waldo, R. C. Larock // Org. Lett. – 2005. – Vol. 7, № 23. – P. 5203–5205.
3. Denmark, S. E. Synthesis of 3,4,5-trisubstituted isoxazoles via sequential [3+2] cycloaddition. Silicon-based cross-coupling reactions / S. E. Denmark, J. M. Kallemeyn // J. Org. Chem. – 2005. – Vol. 70, № 7. – P. 2839–2842.
4. Lautens, M. Synthetic studies of the formation of oxazoles and isoxazoles from N-acetoacetyl derivatives: scope and limitations / M. Lautens, A. Roy // Org. Lett. – 2000. – Vol. 2, № 4. – P. 555–557.
5. Regioselective synthesis of polysubstituted pyrazoles and isoxazoles / A. R. Katritzky, M. Wang, S. Zhang, M. V. Voronkov // J. Org. Chem. – 2001. – Vol. 66, № 20. – P. 6787–6791.
6. Katritzky, A. R. Comprehensive heterocyclic chemistry / A. R. Katritzky, C. W. Rees. – Oxford : Pergamon Press, 1984. – Vol. 1. – 651 p.
7. А.с. 1624958 СССР, МКИ С 07D 413/04. 5-Оксиметил-3-(пирид-2-ил)изоксазол, обладающий способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов / Б. И. Горин, О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, П. В. Вржеш, А. В. Татаринцев. – зарегистр. 01.10.1990.
8. А.с. 1746676 СССР, МКИ С 07D 413/04. 5-Оксиметил-3-(пирид-3-ил)изоксазол, обладающий антиагрегационной активностью / Б. И. Горин, О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, П. В. Вржеш, А. В. Татаринцев, Д. Е. Ершов. – зарегистр. 08.03.1992.
9. Пат. РФ 2088229, МКИ С 07D 413/04. Антиагрегационные средства / О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, П. В. Вржеш, А. В. Татаринцев. – зарегистр. 27.08.1997.
10. Синтез новых ингибиторов агрегации тромбоцитов - замещенных пиридилизоксазолов и их 4,5-дигидроаналогов / О. В. Демина, П. В. Вржеш, А. А. Ходонов, В. И. Козловский, С. Д. Варфоломеев // Биоорганическая химия. – 1995. – Т. 21, № 12. – С. 933–940.
11. Региоселективный подход к получению нового класса тромбоцит-активных средств / О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, Н. М. Панкратова, А. А. Ходонов // Сб. трудов VI Междунар. научно-техн. конф. «Научно-технические химические технологии» – Москва, 1999. – С. 180–182.
12. Supercooperativity in platelet aggregation: substituted pyridyl-isoxazoles, a new class of supercooperative platelet aggregation inhibitors / P. V. Vrzheschch, O. V. Demina, S. I. Shram, S. D. Varfolomeev // FEBS Lett. – 1994. – Vol. 351. – P. 168–170.
13. Кинетика клеточного ответа. Явление суперкооперативности при агрегации тромбоцитов / П. В. Вржеш, А. В. Татаринцев, Д. Э. Ершов, Н. А. Федоров, С. В. Зайцев, С. Д. Варфоломеев // Докл. АН СССР. – 1989. – Т. 307. – С. 477–480.