

**RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE**  
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte  
Ķīmijas katedra  
**RIGA TECHNICAL UNIVERSITY**  
Faculty of Material Science and Applied Chemistry  
Department of Chemistry

**Marina TEUS**  
Organiskās ķīmijas doktora programmas doktorante

**GLUTAMĀTA KARBOKSIPEPTIDĀZES II  
POTENCIĀLO INHIBITORU SINTĒZE  
UN ĪPAŠĪBU IZPĒTE**

Promocijas darba kopsavilkums

**THE DEVELOPMENT OF NOVEL GLUTAMATE  
CARBOXYPEPTIDASE II INHIBITORS**

Summary of Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs (supervisor)

*Dr. chem.*, vad. pētnieks, docents

A. JIRGENSONS

**Rīga 2008**

UDK 547.057+615.015](043.2)  
Te 910 g

Teus M. Glutamāta karboksipeptidāzes II potenciālo inhibitoru sintēze un īpašību izpēte. Promocijas darba kopsavilkums.-R.: RTU, 2008. – 39. lpp.

Iespiests saskaņā ar 2008. gada 12. jūnija lēmumu, protokols Nr. 4

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu Nacionālās programmas "Atbalsts doktorantūras programmu īstenošanai un pēcdoktorantūras pētījumiem" projekta "Atbalsts RTU doktorantūras attīstībai" ietvaros.

**ISBN 978-9984-39-559-3**

**PROMOCIJAS DARBS**  
**IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTĒ**  
**ĶĪMIJAS DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI**

Promocijas darbs ķīmijas doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts  
2008. g. 25. septembrī plkst. 15:00  
Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē,  
Āzenes ielā 14/24, 271. auditorijā.

**OFICIĀLIE RECENZENTI**

Profesors, *Dr.habil.chem.* A. STRAKOVŠ  
Rīgas Tehniskā universitāte

Vad. pētnieks, *Dr.chem.* G. VEINBERGS  
Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Asoc. prof., vad. pētniece, *Dr. chem.* J. KREICBERGA  
Rīgas Tehniskā universitāte

**APSTIPRINĀJUMS**

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē ķīmijas doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Marina Teus \_\_\_\_\_(Paraksts)

Datums: 2008. gada 08. septembris

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur ievadu, literatūras apskatu, rezultātu izvērtējuma daļu, eksperimentālo daļu, secinājumus un izmantotās literatūras sarakstu. Saturs izklāstīts uz 135 lapaspusēm. Darbs satur 55 attēlus, 17 tabulas, 114 literatūras avotus, 3 pielikumus.

## Problēmas būtība un aktualitāte

Glutamāta karboksipeptidāze II (GKP II) ir divus cinka atomus saturošais enzīms, kas centrālajā nervu sistēmā (CNS) šķeļ *N*-acetilaspartilglutamīnskābi (NAAG) par *N*-acetilaspargīnskābi (*N*-Ac-Asp) un glutamīnskābi (Glu). Vairākos pētījumos parādīts, ka NAAG ir endogēnais metabotropo glutamāta receptoru subtīpa mGluR3 agonists ar pozitīvu neiroprotektīvo efektu. Savukārt, NAAG šķelšanas produkts – Glu ir galvenais signāla pārnēsētājs CNS, kas paaugstinātā koncentrācijā izraisa neurodeģenerāciju. Fermenta GKP II inhibīcija CNS disfunkciju apstākļos uztur augstāku NAAG koncentrāciju un samazina Glu koncentrāciju.

Šādai pieejai ir augsts terapeitiskais potenciāls un GKP II inhibitorus varētu izmantot vairāku neiroloģisko traucējumu terapijā – amiotrofās laterālās sklerozes (ALS), akūto un neiropatisko sāpju, narkotiskās un alkohola atkarības ārstēšanai, kā arī neurodeģeneratīvo saslimšanu gadījumos (šizofrēnijas, Alcheimera, Parkinsona un Hantingtona slimības).

Fermenta GKP II inhibitoru meklējumi ir aktīvs pētījumu lauks jau vairāk kā 10 gadus. Ir publicēti un patentēti vairāki strukturāli atšķirīgi inhibitori. Galvenais trūkums, kas nav ļāvis šos savienojumus attīstīt tālāk kā medicīniskos preparātus, ir to augstā polaritāte, kuras dēļ savienojumi nevar šķērsot hematoencefālisko barjeru un nodrošināt pietiekošu preparāta koncentrāciju CNS. Papildus problēma ir dažu funkcionālo grupu saturošo savienojumu zemā bioloģiskā stabilitāte. Pašlaik klīniskajos pētījumos ir tikai daži GKP II inhibitori un, pagaidām, neviens no savienojumiem nav kļuvis par zāļu vielu.

Izstrādātais promocijas darbs veltīts jaunu patentējamu GKP II inhibitoru meklējumiem un īpašību izpētei.

## **Darba mērķi un pētījumu metodika**

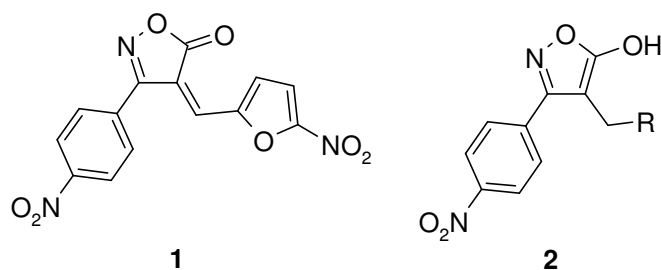
Promocijas darba galvenais uzdevums ir atrast jaunus glutamāta karboksipeptidāzes II (GKP II) inhibitorus un izpētīt struktūras-aktivitātes likumsakarības atrastās klases savienojumu rindā. Tā īstenošanai nepieciešams:

1. apkopot publikācijās un patentos pieejamus datus par zināmajiem GKP II inhibitoriem un to īpašībām, veikt iegūto datu analīzi;
2. veikt nelielas nejonizējamu savienojumu bibliotēkas inhibitorās aktivitātes pārbaudi, lai identificētu aktīvus savienojumus, kas būtu piemēroti tālākai modificēšanai;
3. balstoties uz GKP II inhibitorās aktivitātes datiem, modificēt atrastā aktīvā savienojuma bāzes struktūru, ar mērķi iegūt aktīvākus GKP II inhibitorus;
4. izstrādāt universālas un paralēlai sintēzei piemērotas sintēzes metodes aktīvo savienojumu modificēšanai, kas ļautu ievadīt bāzes struktūrā dažādus aizvietotājus;
5. ar molekulārās modelēšanas palīdzību izpētīt aktīvo savienojumu – enzīma kompleksa modeli, lai iegūtu informāciju par aktivitātes uzlabošanas iespējām.

## Darba rezultāti

### Aktīva savienojuma identificēšana un sākotnēja optimizācija

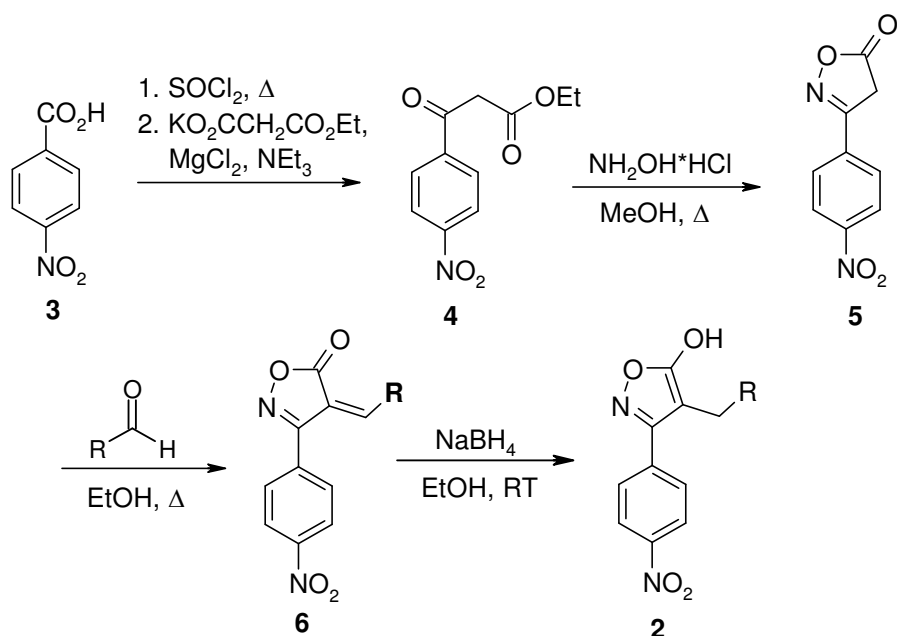
Pēc literatūrā aprakstīto GKP II inhibitoru datu analīzes nonācām pie secinājuma, ka nevienu no aprakstītajām savienojumu klasēm nav racionāli modificēt un attīstīt tālāk līdz potenciālam zāļu vielas kandidātam. Visi aprakstītie savienojumi, kaut arī tie uzrāda augstu GKP II inhibitoro aktivitāti, ir vai nu pārāk hidrofilī, lai šķērsotu hematoencifālisko barjeru, vai satur metaboliski nestabilas funkcionālas grupas. Turklāt, visi šie savienojumi un to atvasinājumi ir patentēti. Mūsu mērķis bija atrast GKP II inhibitorus jaunā patentējamu savienojumu klasē. Tāpēc darbu sākām ar nelielas nejonizējama savienojumu bibliotēkas (ap 500 savienojumiem) inhibitorās aktivitātes pārbaudi, kā rezultātā identificējām aktīvu savienojumu **1** ar  $IC_{50}=10\ \mu M$  (1. att.).



1. att. Savienojumu bibliotēkas aktivitātes pārbaudē atrastais aktīvais savienojums **1** un tā analogi **2**

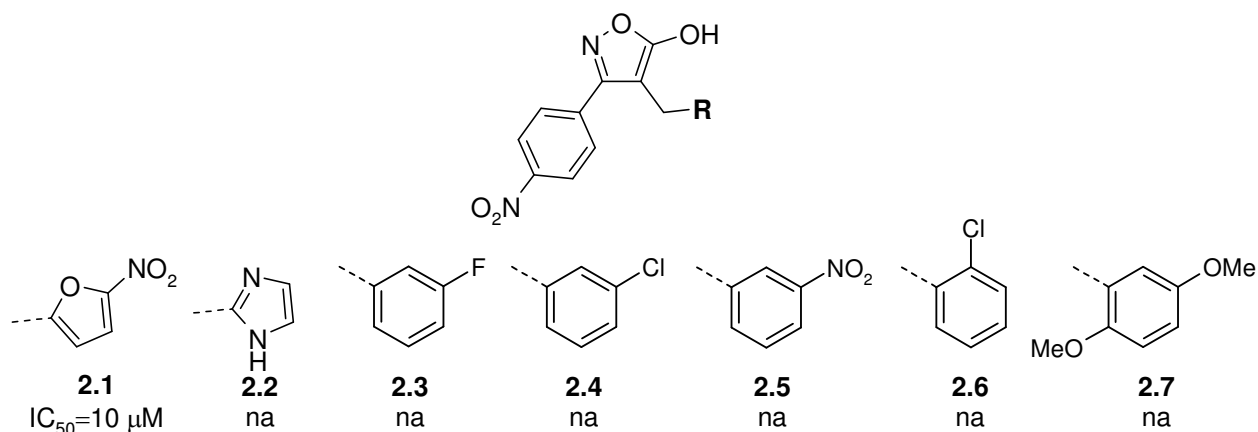
Diemžēl 4-[1-(5-nitrofuran-2-il)-metilidēn]-3-(4-nitrofenil)-4H-izoksazol-5-ons **1** uzrādīja zemu stabilitāti, kas visticamāk saistīta ar aktivētas dubultsaites klātbūtni savienojuma struktūrā. Līdz ar to šo savienojumu klasi optimizēt tālāk nebija racionāli, tāpēc nolēmām sintezēt stabilāku, bet strukturāli ļoti līdzīgu savienojumu **2** sēriju.

Sintēzi sākām no 4-nitrobenzoksābes **3** (2. att.). Reakcijā ar tionilhlorīdu transformējam to par hloranhidrīdu un tālāk, bez izdalīšanas no reakcijas maisījuma, acilējām malonskābes etilesterā kālija sāli. Paskābinot reakcijas maisījumu, notika C-acilēšanas produkta dekarboksilēšana, kā rezultātā veidojas β-ketoesteris **4**. Ketoesteri kondensējām ar hidroksilamīnu un iegūto izoksazolonu **5** izmantojām aizvietotāju ievadīšanai heterocikla 4. pozīcijā. Izoksazolonu kondensējām ar dažādiem aldehīdiem, kondensācijas reakcijas produktus **6** reducējām ar nātrija borhidrīdu un ieguvām mērķa savienojumus **2**.



2. att. 4-Arilmetil-3-(4-nitrofenil)-izoksazol-5-olu **2** iegūšana

Aktīvākais sērijas pārstāvis bija 4-(5-nitrofuran-2-ilmetil)-3-(4-nitrofenil)-izoksazol-5-ols **2.1** ( $IC_{50}=10 \mu M$ ), kas ir savienojuma **1** tiešs analogs. Diemžēl, 5-nitrofuril grupas aizvietošana ar citiem aromātiskiem aizvietotājiem deva praktiski neaktīvus savienojumus **2.2-2.7** (3. att.).



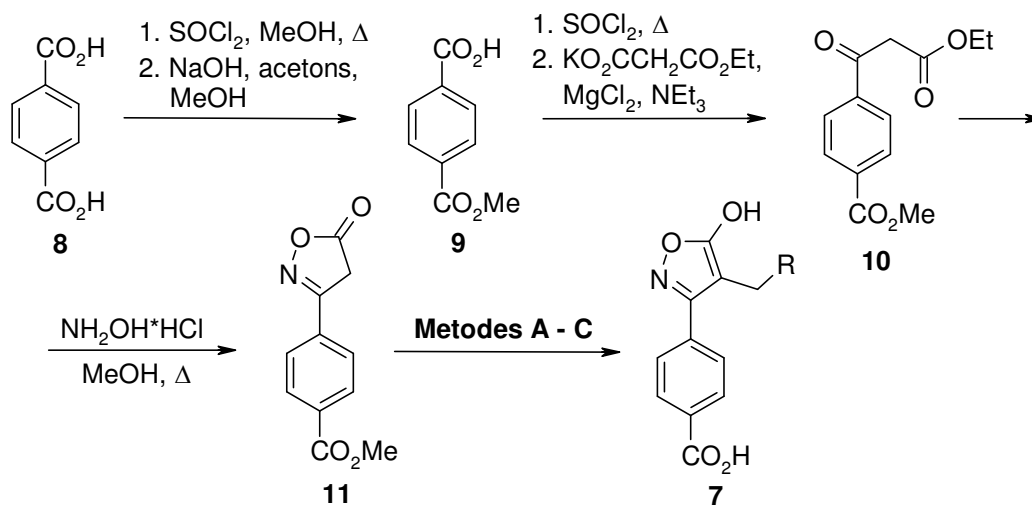
3. att. 4-Arilmetil-3-(4-nitrofenil)-izoksazol-5-olu **2** GKP II inhibitorā aktivitātē

Tā kā zināmie GKP II inhibitori ir polikarbonskābes, pieņemām, ka karboksilfunkcijas ievadīšana molekulā varētu būtiski uzlabot savienojumu inhibitoro aktivitāti. Tāpēc savienojuma **2.1** nitrogrupu nomainījām pret karboksilgrupu un ieguvām 4-[5-hidroksi-4-(5-nitrofuran-2-ilmetil)-izoksazol-3-il]benzoscābi **7.1** ar uzlabotu inhibitoro aktivitāti  $IC_{50}=2 \mu M$  (7. att.).

Tālākais darbs bija veltīts 4-(5-hidroksiizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterā 4. pozīcijas modificēšanai ar mērķi atrast optimālo aizvietotāju un noteiktu struktūras-aktivitātes likumsakarības.

#### 4-(5-Hidroksiizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterā 4. pozīcijas modificēšana

4-(5-Hidroksiizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterā 4. pozīcijas modificēšanai izstrādājām 4-(5-okso-4,5-dihidroizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterā **11** sintēzes metodi (4. att.).

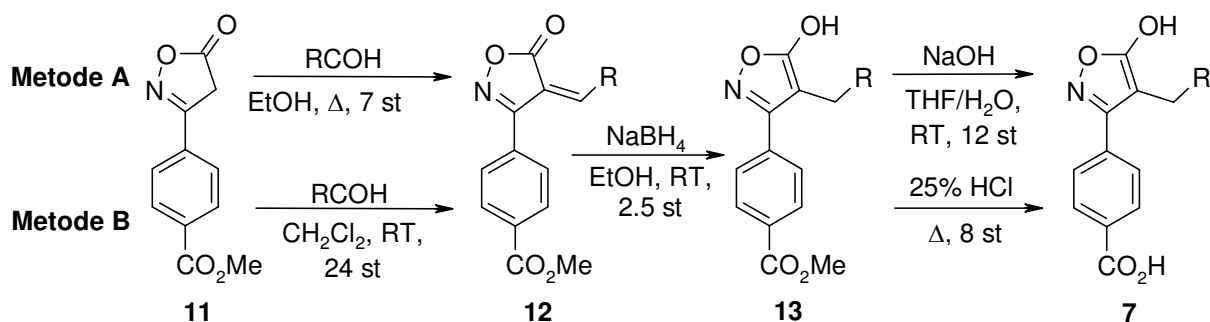


4. att. 4-(5-okso-4,5-dihidroizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterā **11** iegūšana

Divās stadijās pēc literatūrā aprakstītās metodes no tereftalskābes **8** ieguvām attiecīgo monoestere **9**. Tālāk analogiski nitro analogam **5** ieguvām izoksazolonu **11**, kuru izmantojām kā atslēgas savienojumu aizvietotāju ievadīšanai heterocikla 4. pozīcijā.

Mērķa savienojumu **7** iegūšanai no izoksazolona **11** izstrādājām divas sintēzes metodes (metode A un B), kuras izmantojām atkarībā no aldehīda šķīdības un produkta stabilitātes reakcijas apstākļos (5. att). Vispirms izoksazolonu **11** kondensējām ar atbilstošiem aldehīdiem, veidojot arilidēnizoksazolonus **12**. Jāpiebilst, ka tāpat kā nitro analogā **1** gadījumā šie savienojumi ir nestabili. Tos reducējām ar nātrija borhidrīdu, iegūstot stabilākus 3-hidroksiizoksazolus **13**. Sintēzes pēdējā stadijā veicām estergrupas skābo vai bāzisko hidrolīzi un ieguvām mērķa savienojumus **7** (7. att.).

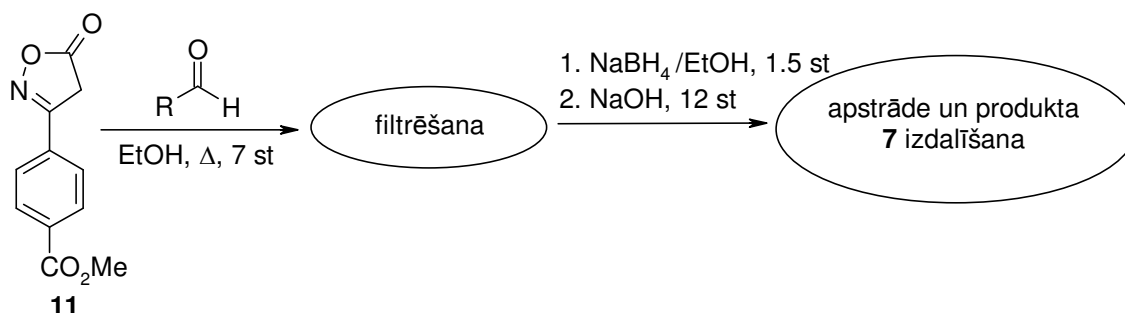




5. att. Mērķa savienojumu 7 sintēzes metodes

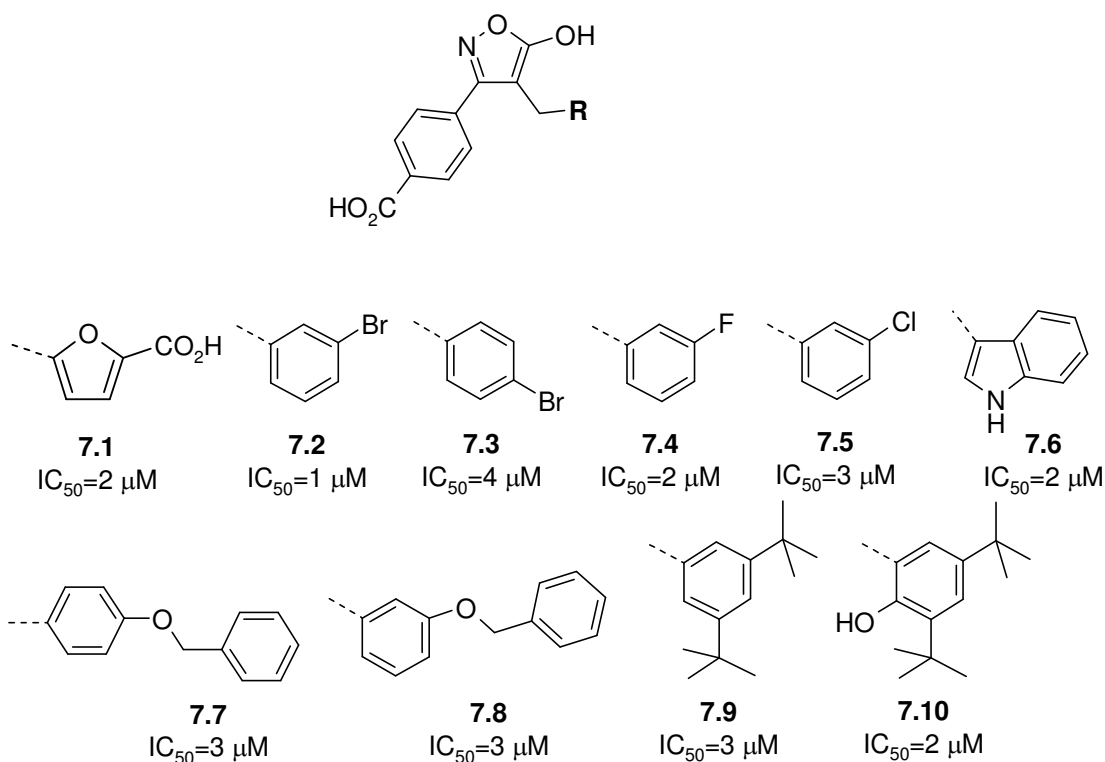
Lai palielinātu produktivitāti, savienojumu 7 iegūšanai izstrādājām arī paralēlās sintēzes metodi (metode C) (6. att.) – pēc kondensācijas nogulsnes izkritušo reakcijas produktu 12 filtrējām un bez žāvēšanas izmantojām nākamajās divās stadijās – dubultsaites reducēšanai un estergrupas hidrolīzei vienā reaktorā. Paralēlās sintēzes pielietošana ļāva paaugstināt galaproduktu kopējo iznākumu, kā arī saīsināt reakcijas laiku un samazināt resursus starpproduktu analizēšanai.

**Metode C**



6. att. Mērķa savienojumu 7 paralēlās sintēzes metode

Pēc metodēm A – C ieguvām 38 savienojumu 7 bibliotēku. Aktīvāko savienojumu GKP II inhibitorās aktivitātes dati apkopoti 7. attēlā.



7. att. 4-Arilmetil-3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazolu **7** GKP II inhibitorā aktivitātē

Aktīvākie sērijas savienojumi **7.1-7.10** inhibēja GKP II mikromolārās koncentrācijās ( $IC_{50}=1-4 \mu M$ ). Pārējie šīs rindas savienojumi uzrādīja līdzīgu vai zemāku inhibitoro aktivitāti.

Starp sērijas aktīvākajiem savienojumiem bija analogi **7.2** un **7.3**, kas satur bromu 4. pozīcijas aromātiskajā gredzenā. Ar nolūku uzlabot inhibitoro aktivitāti, sintezējām vēl dažus šo savienojumu analogus ar papildus aizvietotājiem benzola gredzenā. Diemžēl, neviens no šiem savienojumiem neuzrādīja augstāku GKP II inhibitoro aktivitāti kā savienojumi **7.1-7.10**.

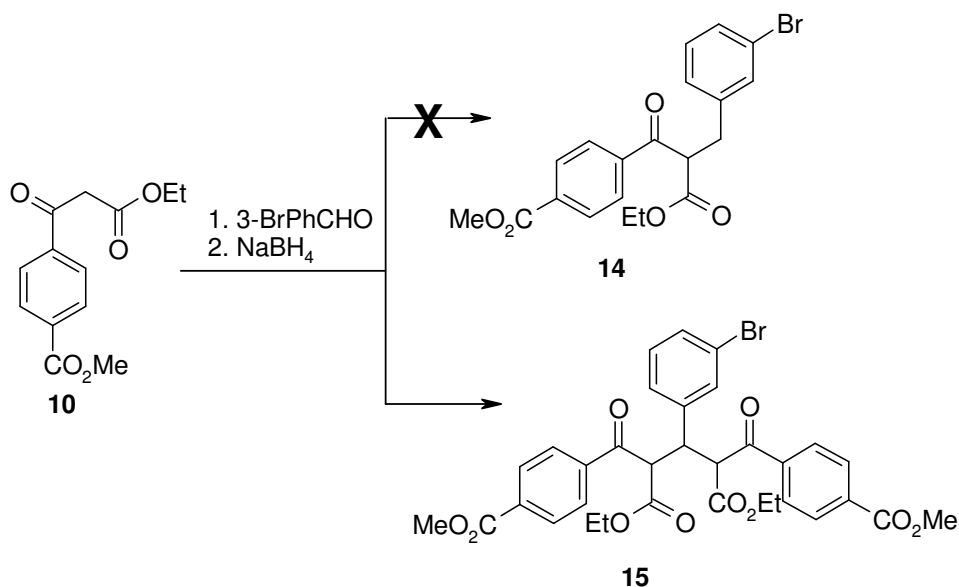
No 3-(4-karboksifenil)-izoksazol-5-olu **7** sērijas nepieciešams atzīmēt savienojumus ar stēriski lieliem aizvietotājiem **7.7-7.10**, kuru inhibitorā aktivitāte ir augstāka, salīdzinot ar neaizvietotiem analogiem. Īpaši jāatzīmē savienojumu **7.9** ( $IC_{50}=3 \mu M$ ), kas, salīdzinot ar citiem sērijas pārstāvjiem, ir ievērojami lipofīlāks.

Kopumā, 4-aril-3-(4-karboksifenil)-izoksazol-5-olu **7** sērijas ietvaros GKP II inhibitorās aktivitātes dati ir diezgan līdzīgi. Optimāla aizvietotāja 5-hidroksiizoksazola 4. pozīcijā izvēlē svarīga ir ne tikai savienojuma GKP II inhibitora aktivitāte, bet arī lipofilitāte, kas var ievērojami ietekmēt savienojuma spēju šķērsot hematoencefālisko barjeru un nonākt CNS.

## Bāzes struktūras heterocikla modificēšana

Tālākais darbs bija veltīts heterocikla modificēšanai atrastajā 3-(4-karboksifenil)-4-metilaryl-5-hidroksiizoksazola pamatstruktūrā **7**. Kā testa savienojumu izvēlējamies 5-hidroksiizoksazolu **7.2**. Savienojuma **7.2** struktūrā 5-hidroksiizoksazolu aizvietojam ar citiem karbonskābju bioizostēriem – 3-hidroksiizoksazolu un 5-hidroksipirazolu, lai noteiktu struktūras-aktivitātes likumsakarības starp dažādiem heterocikliskajiem analogiem.

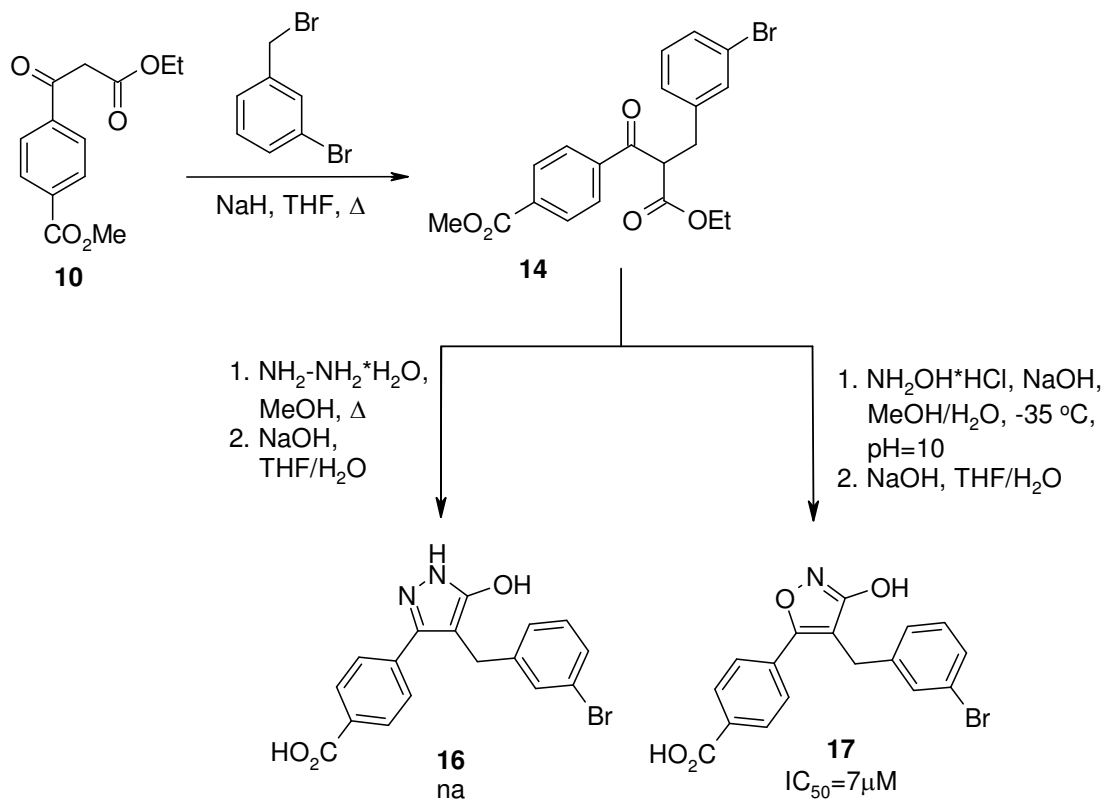
Savienojumu sintēzi sākām no  $\beta$ -ketoestera **10**. Vispirms mēģinājām to kondensēt ar 3-brombenzalhīdu, lai iegūtajā nepiesātinātajā produktā ar  $\text{NaBH}_4$  reducētu dubultsaiti un iegūto reakcijas produktu **14** tālāk izmantotu 3-hidroksiizoksazola un 5-hidroksipirazola atvasinājumu sintēzei. Šo sintēzes ceļu mums realizēt neizdevās, jo kondensācijas reakcijā kā vienīgo produktu ieguvām savienojumu **15**, kas ir vēlamā savienojuma un izejvielas pievienošanās produkts (8. att.).



8. att.  $\beta$ -Ketoestera **10** *Knoevenagel* kondensācija ar 3-brombenzalhīdu

Vajadzīgā starpsavienojuma **14** sintēzei izvēlējamies citu ceļu –  $\beta$ -ketoesteri **10** alkilējām ar 3-brombenzilbromīdu (9. att.). Tālāk iegūto 4-[3-(3-bromfenil)-2-etoksikarbonilpropionil]benzoscābes metilesteri **14** ciklizējām ar hidrazīnu metanolā un, pēc pirazola gredzena veidošanās, veicām estergrupas bāzisko hidrolīzi, kā rezultātā ieguvām mērķa savienojumu **16**.

Lai iegūtu 3-hidroksiizoksazolu **17**, alkilēto  $\beta$ -ketoesteri **14** pazeminātā temperatūrā kondensējām ar hidroksilamīnu bāziskā vidē. Šādos apstākļos notiek selektīva 3-hidroksiizoksazola gredzena veidošanās, atšķirībā no neitrāliem reakcijas apstākļiem, kuros veidojas 5-hidroksiizoksazols.



9. att. 5-Hidroksipirazola **16** un 3-hidroksiizoksazola **17** iegūšana

4-[4-(3-Brombenzil)-5-hidroksi-1H-pirazol-3-il]benzoscābe **16** ir praktiski neaktīvs GKP II inhibitors (20% inhibēšana pie  $10\ \mu\text{M}$ ). Salīdzinot ar izejas savienojumu **7.2**, 4-[4-(3-brombenzil)-3-hidroksiizoksazol-5-il]benzoscābe **17** uzrādīja zemāku inhibitoro aktivitāti ( $\text{IC}_{50}=7\ \mu\text{M}$ ). Tomēr šāda aktivitāte ir pietiekama, lai izmantotu 3-hidroksiizoksazolu kā alternatīvu heterociklu bāzes struktūrā un turpinātu struktūras optimizāciju augstas aktivitātes GKP II inhibitoru iegūšanai.

Jāpiebilst, ka hidroksiizoksazoli tiek uzskatīti par daļēji jonizējamiem karboksilgrupas bioizostēriem. Šādu hidroksiheterociklu un karboksilgrupas īpašību salīdzinājums pie fizioloģiskā pH ( $\text{pH}=7.4$ ) rāda, ka heterocikliskie savienojumi ir daudz lipofilāki, kas var ievērojami ietekmēt savienojuma spēju šķērsot hematoencifālisko barjeru, tajā pašā laikā tie spēj jonizēties ( $\text{pK}_a\sim 7$ ) un uzrādīt līdzīgas īpašības kā karbonskābe.

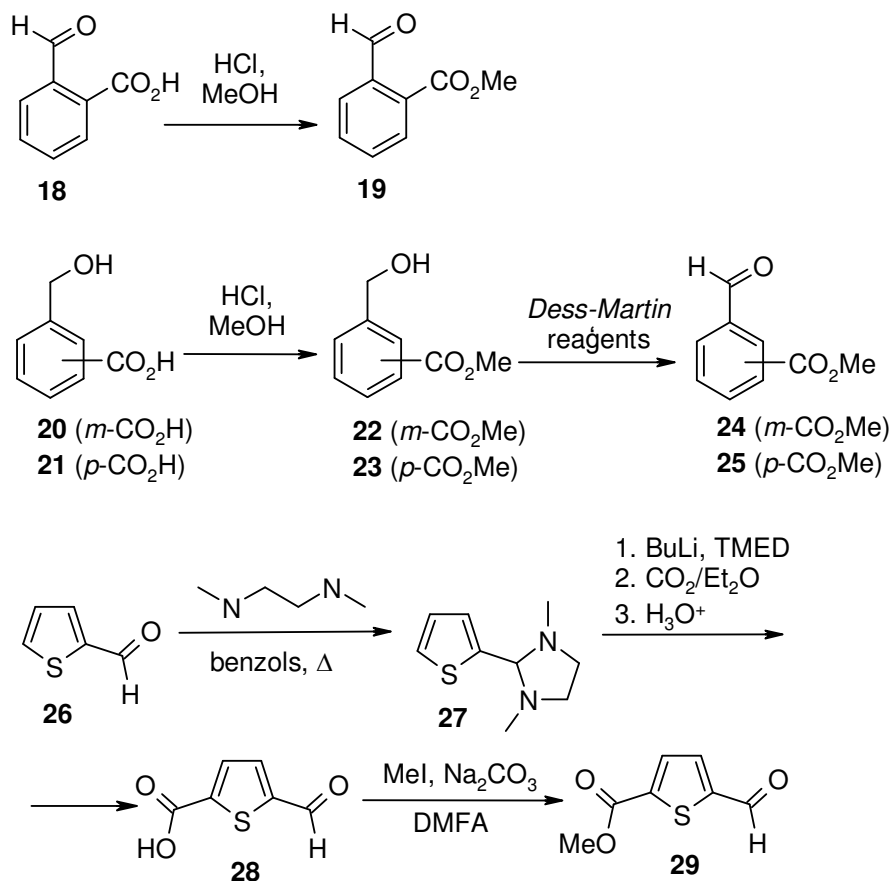
### Farmakoforo elementu savienošā tiltiņa modificēšana

#### Dikarbonskābes 3-fenil-5-hidroksiizoksazola rindā

Tā kā zināmie GKP II inhibitori ir polikarbonskābes, pieņemām, ka papildus karboksilfunkcijas ievadīšana molekulā būtiski uzlabos savienojumu inhibitoro aktivitāti. Tāpēc kā mērķa savienojumus izvēlējamies no fenil-5-hidroksiizoksazola atvasinātas

dikarbonskābes, kurās sintētisko iespēju robežās variēts karboksilgrupu savstarpējais telpiskais novietojums.

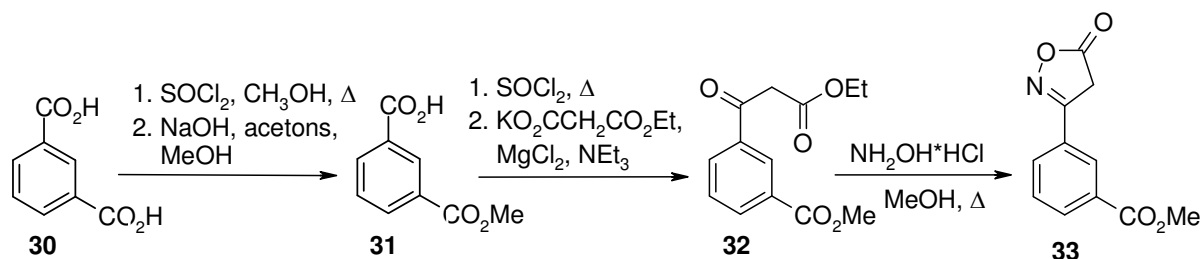
Vispirms sintezējām nepieciešamos būvblokus – 2-, 3-, 4-karboksimetilbenzalhēdus **19**, **24**, **25** un 2-karboksimetiltiofēn-2-karbalhēdu **29** (10. att.). 2-Karboksimetilbenzalhēdu **19** ieguvām, esterificējot attiecīgo skābi **18**. 3- un 4-Karboksimetilbenzalhēdus **24** un **25** sintezējām no attiecīgām hidroksimetilbenzoscābēm **20** un **21**. Vispirms skābes pārvērtām par attiecīgajiem metilesteriem **22** un **23** un tad oksidējām iegūto savienojumu spirta grupas par alhēdīdgrupām. 2-Karboksimetiltiofēn-5-karbalhēdu **29** ieguvām no tiofēn-2-karbalhēda **26**. Vispirms ar *N,N*-dimetiletān-1,2-diamīnu aizsargājām savienojuma **26** alhēdīda funkciju. Karboksilgrupu ievadījām litiēta tiofēna **27** reakcijā ar oglekļa dioksīdu. Iegūto 5-formiltiofēn-2-karbonskābi **28** pārvērtām par attiecīgo metilesteri **29**.



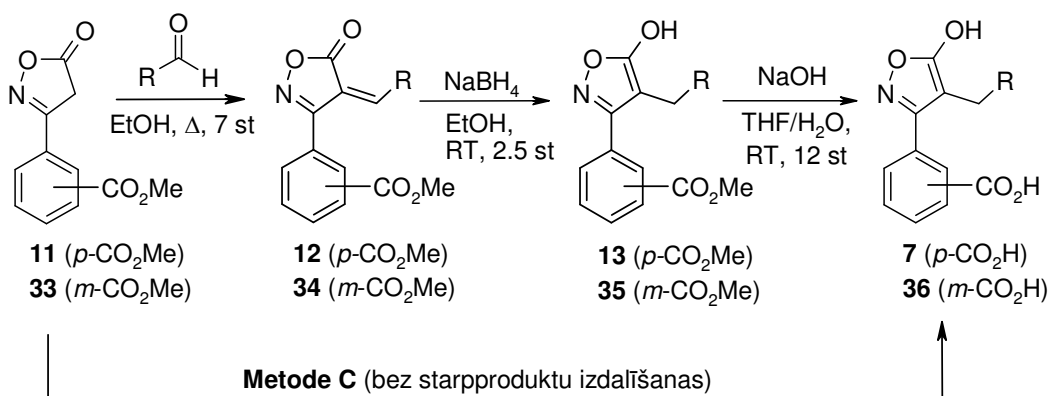
10. att. Izejas alhēdīdu **19**, **24**, **25** un **29** iegūšana

Analoģiski iepriekš aprakstītajai izoksazoloni **11** sintēzei no izoftalskābes **30** ieguvām atbilstošo izoksazoloni **33**. Izoksazolonus **11** un **33**, izmantojot metodes A un C, kas

izstrādātas savienojumu **7** sērijas iegūšanai, transformējām par nepieciešamajām dikarbonskābēm **7.11-7.14** un **36.1-36.3** (11. att.).

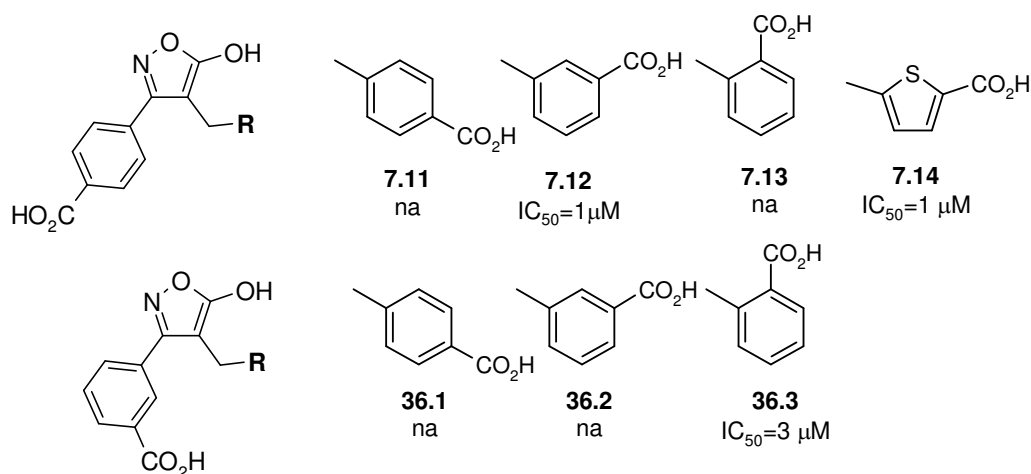


#### Metode A



11. att. Dikarbonskābju **7** un **36** iegūšana

Iegūto dikarbonskābju GKP II inhibitorās aktivitātes dati apkopoti 12. attēlā. Augstāko aktivitāti uzrādīja dikarbonskābes **7.12** ( $IC_{50}=1 \mu M$ ), **7.14** ( $IC_{50}=1 \mu M$ ) un **36.3** ( $IC_{50}=3 \mu M$ ). Šādas inhibitorās aktivitātes ir salīdzināmas ar monokarbonskābju rindas **7** aktīvāko pārstāvju inhibitorām aktivitātēm. Tas nozīmē, ka optimāls otras karboksilgrupas novietojums netika atrasts un darbu pie 3-fenil-5-hidroksiizoksazola rindas savienojumu struktūras optimizācijas bija nepieciešams turpināt.

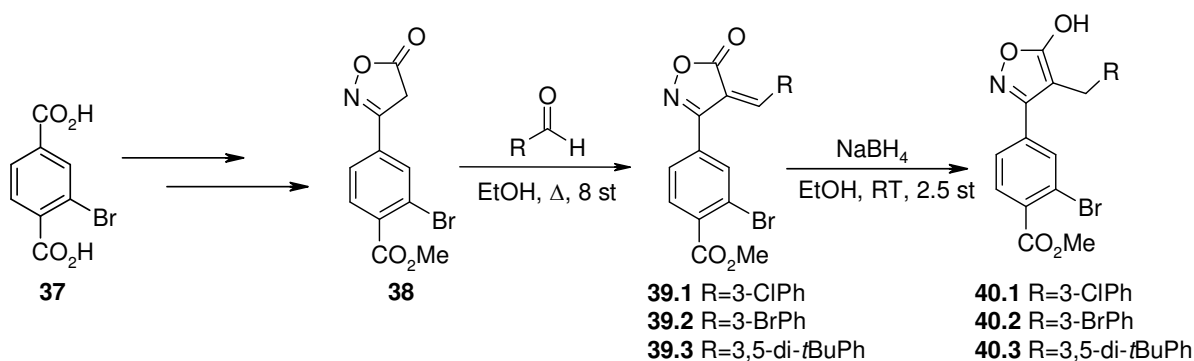


12. att. Dikarbonskābju **7** un **36** GKP II inhibitorā aktivitāte

### Savienojumu 7 bāzes struktūras 4-karboksifenil- fragmenta modificēšana

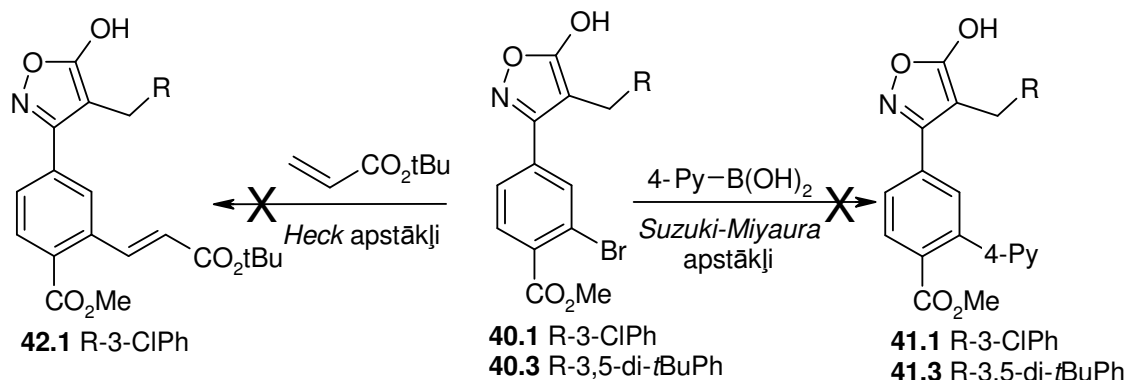
Farmakoforo elementu savienošā tiltiņa modificēšanai nolēmām savienojumu 7 bāzes struktūras 4-karboksifenil fragmentā ievadīt dažādas funkcionālas grupas, lai panāktu papildus saistību ar enzīma aktīvajā centrā esošiem cinka joniem vai aminoskābju atlikumiem. Modificēšanai kā pamatu izvēlējāmies savienojumu sērijas 7 lipofilākos un aktīvākos pārstāvjus 7.2, 7.5 un 7.9.

Sākotnēji mērķa savienojumu iegūšanai mēģinājām attīstīt sintēzes pieeju, kurā var izmantot arilbromīdus kā universālus būvblokus pārejas metālu katalizētajās sametināšanas reakcijās. Funkcionalizēšanai nepieciešamos bromu saturošus esterus 40 sintezējām pēc savienojumu 7 iegūšanai izstrādātas sintēzes metodes, izejot no 2-bromtereftalskābes 37 (13. att.).



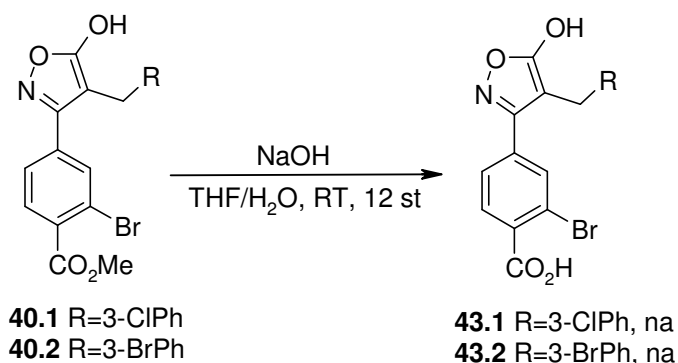
13. att. 2-Brombenzoscābju metilesteru 40.1-40.3 iegūšana

Tālāk savienojumus 40.1 un 40.3 mēģinājām funkcionalizēt Pd(0) katalizētajās *Suzuki-Miyaura* un *Heck* reakcijās (14. att.). Diemžēl, mums neizdevās atrast optimālus *Suzuki-Miyaura* un *Heck* apstākļus. Nevienā no mēģinājumiem produkta klātbūtni reakcijas maisījumā nenovērojām. To varētu skaidrot ar neaizsargāta 5-hidroksiizoksazola nesavietojamību ar Pd(0) katalizatoriem. Atkarībā no izvēlētiem apstākļiem reakcijas maisījumā novērojām neizreaģējušu izejvielu vai sadalīšanās produktus, kuru struktūru identificēt neizdevās.



14. att. Neveiksmīgie *Suzuki-Miyaura* un *Heck* reakciju apstākļi

Savienojumus **40.1** un **40.2** hidrolīzes reakcijā sekmīgi transformējām par izoksazolu **7.2** un **7.5** analogiem – karbonskābēm **43.1** un **43.2** (15. att.), lai noteiktu to GKP II inhibitoro aktivitāti. Abi savienojumi bija neaktīvi.

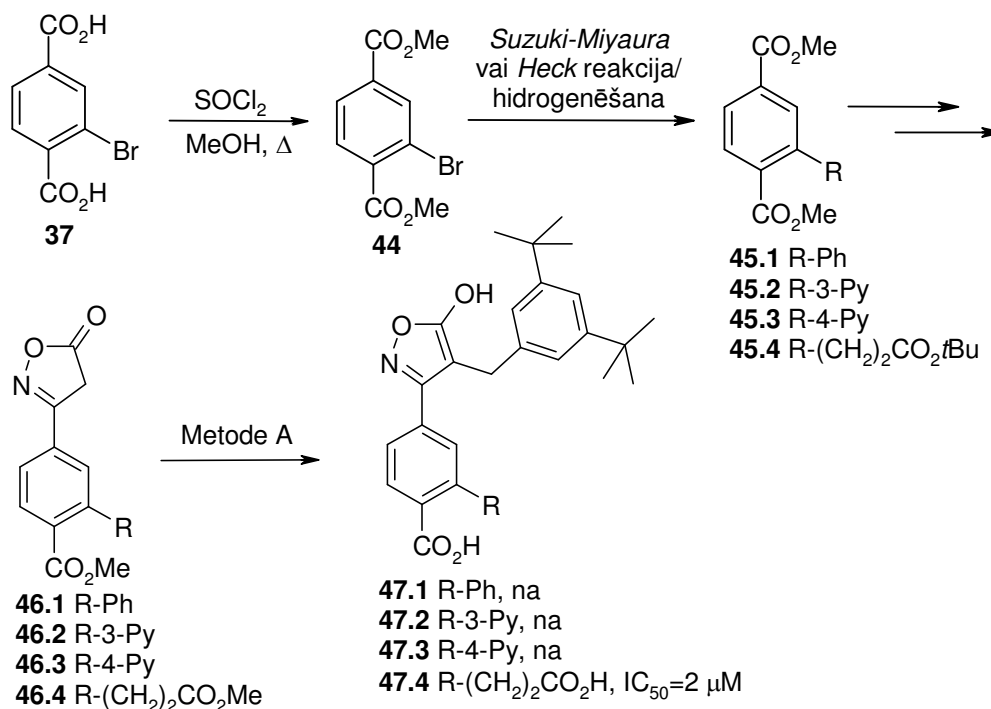


15. att. Brombenzozskābju **43.1** un **43.2** iegūšana un GKP II inhibitorā aktivitāte

Tā kā brom-aizvietotās 3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazola bāzes struktūras vienotā modificēšanas stratēģija neattaisnojās, vajadzīgos aizvietotājus ievadījām benzola gredzenā sintēzes sākumā – pirms 5-hidroksiizoksazola cikla veidošanas. Izmantojot *Suzuki-Miyaura* un *Heck* sametināšanas reakcijas 2-bromtereftalskābes diestera **44** molekulā ievadījām fenil, 3- un 4-piridil aizvietotājus, kā arī *treš*-butilkarboniletilgrupu (16. att.). Pd(0) katalizēto reakciju apstākļi bija analogiski savienojumu **40.1** un **40.3** modificēšanas apstākļiem, taču šoreiz sametināšanu bija iespējams realizēt un produktus izdalījām ar apmierinošiem iznākumiem. Nepieciešamos 5-hidroksiizoksazolus **47.1** – **47.4** sintezējām, izejot no 2-bromtereftalskābes **37**. Pēc funkcionalizēšanas *Suzuki-Miyaura* un *Heck* sametināšanas reakcijās, selektīvi hidrolizējām tikai vienu iegūtā diestera estergrupu. Tālāk, izmantojot jau izstrādātas sintēzes metodes, ieguvām izoksazolonus **46.1** – **46.4**, no kuriem tālāk 5-hidroksiizoksazolus **47.1** – **47.4**. Jāpiebilst, ka karboksietil- analoga gadījumā,



kondensējot  $\beta$ -ketoesteri ar hidroksilamīnu metanolā, notika pilnīga *treš*-butilestera pāresterificēšanās par metilesteri.

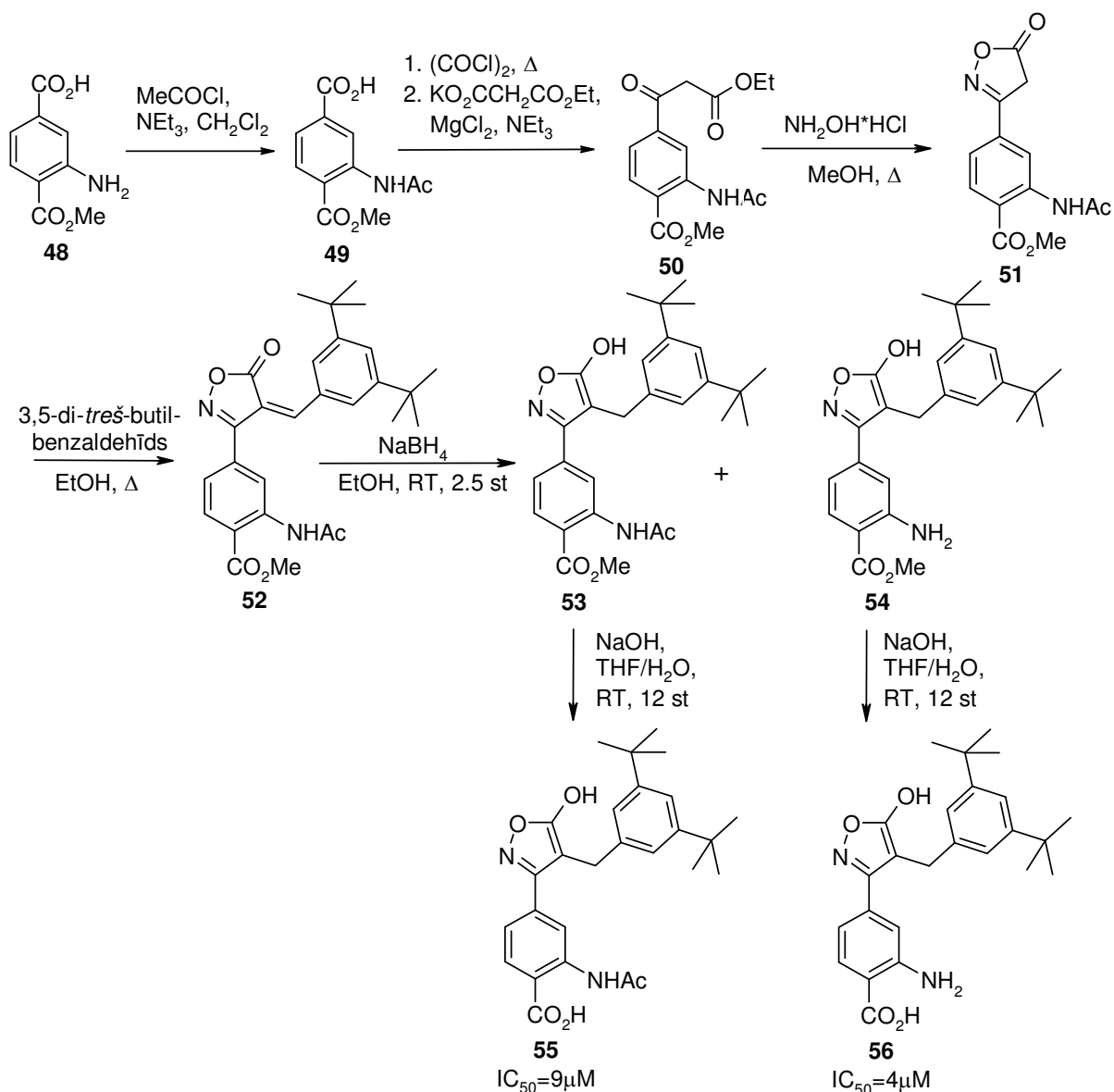


*Suzuki-Miyaura* un *Heck* reakciju apstākļi: ja R - Ph, 3-Py, 4-Py: R-B(OH)<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; ja R - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu (1) *treš*-butilakrilāts, Pd(OAc)<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, DMF, (2) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C

## 16. att. 2. Pozīcijā aizvietoto benzoskābju **47.1-47.4** iegūšana un GKP II inhibitorā aktivitāte

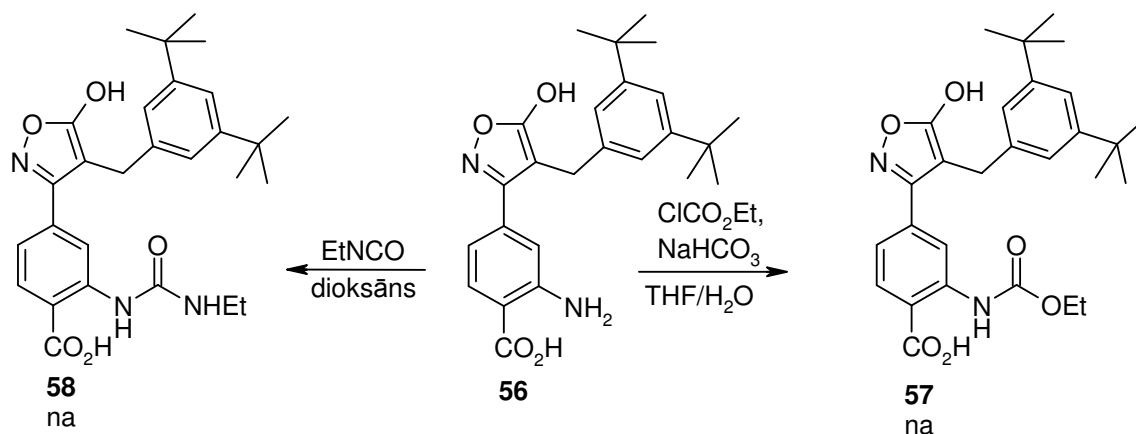
Lai panāktu papildus saistību ar enzīma aktīvajā centrā esošiem cinka joniem vai aminoskābju atlikumiem nolēmām 3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazola bāzes struktūrā ievadīt slāpekli saturošas funkcionālās grupas.

Savienojumu **55-58** sintēzi sākām no komerciāli pieejama 2-aminotereftalskābes monometilestera **48** (17. att.). Pēc aminogrupas aizsardzības, karbonskābi pārvērtām par  $\beta$ -ketoesteri **50**. Tālāk,  $\beta$ -ketoesteri kondensējot ar hidroksilamīnu, ieguvām izoksazolonu **51**, kuru *Knoevenagel* reakcijā ar 3,5-di-*treš*-butilbenzalhīdu pārvērtām par arilidēnizoksazolonu **52**. Reducējot savienojuma **52** dubultsaiti, daļēji notika arī *N*-acilgrupas nošķelšana. Abus produktus **53** un **54** atdalījām hromatogrāfiski un katram atsevišķi hidrolizējām estera grupu, kā rezultātā ieguvām 2-acetilamino-4-[4-(3,5-di-*treš*-butilbenzil)-5-hidroksiizoksazol-3-il]benzoskābi **55** un 2-amino-4-[4-(3,5-di-*treš*-butilbenzil)-5-hidroksiizoksazol-3-il]benzoskābi **56**.



17. att. *N*-Acetilaminobenzoskābes **55** un aminobenzoskābes **56** iegūšana un GKP II inhibitorā aktivitātē

Tālāk sintezējam *N*-etoksikarbonil- un *N*-etilaminokarbonil- atvasinājumus. Vispirms *N*-etoksikarbonil atvasinājumu **57** mēģinājām sintezēt no estera **54**. Diemžēl, hidrolizējot metilesteri, notika arī daļēja *N*-etoksikarbonilgrupas nošķelšana. Tāpēc gan acilēšanas reakciju, gan urīnvielas sintēzi veicām izejot no brīvas aminoskābes **56**, kā rezultātā, pēc literatūrā aprakstītām metodēm, ieguvām *N*-etoksikarbonil atvasinājumu **57** un *N*-etilaminokarbonil atvasinājumu **58** (18. att.).



18. att. *N*-etoksikarbonil atvasinājuma **57** un *N*-etilaminokarbonil atvasinājuma **58** iegūšana un GKP II inhibitorā aktivitāte

4-Karboksifenil- fragmenta modificēšanā iegūtie brom-aizvietotie 3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazola analogi **43.1** un **43.2** uzrādīja zemu GKP II inhibitoro aktivitāti. Arī aromātisko aizvietotāju ievadīšana 4-karboksifenil- fragmenta 3. pozīcijā (savienojumi **47.1-47.3**) neuzlaboja inhibitoro aktivitāti. Karboksietil grupas, kā arī aizvietotas aminofunkcijas ievadīšana 4-karboksifenil- fragmenta 3. pozīcijā deva savienojumus **47.4, 55-57** ar inhibitoro aktivitāti, kas līdzīga vai zemāka par izejas savienojumu **7** aktivitāti.

Šie rezultāti liecina ka, modificējot 4-karboksifenil fragmentu mums neizdevās atrast funkcionālo grupu, kura nodrošinātu papildus saistību ar enzīma aktīvās kabatas aminoskābju atlikumiem vai cinka joniem.

## Secinājumi

1. Identificēta 4-arilmetil-3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazolu bāzes struktūra, uz kuras pamata ir attīstīti jauni, vidēji aktīvi GKP II inhibitori;
2. Izstrādāta sintēzes metode 4-arilmetil-3-(4-nitrofenil)- un 4-arilmetil-3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazolu iegūšanai no attiecīgajām karbonskābēm. Metode ļauj ievadīt dažādus aizvietotājus 5-hidroksiizoksazola 4. pozīcijā;
3. Izstrādātā sintēzes metode ir modificēta, piemērojot to paralēlajai sintēzei un iegūta 38 savienojumu bibliotēka;
4. Eksperimentāli parādīts, ka kondensējot 4-(2-etoksikarbonilacetil)benzoscābes metilesteri ar hidroksilamīnu neitrālā reakcijas vidē notiek 5-hidroksiizoksazola cikla veidošanās, savukārt, veicot kondensāciju bāziskā vidē, notiek 3-hidroksiizoksazola cikla veidošanās;
5. Parādīts, ka 2. pozīcijā aizvietoto tereftalskābju dimetilesteru hidrolīzi par monoesteriem iespējams panākt selektīvi – reģioselektīvi hidrolizējas telpiski mazāk ekranētā estergrupa;
6. Arilmetil-3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazola bāzes struktūrā ir iespējams 5-hidroksiizoksazolu aizstāt ar 3-hidroksiizoksazolu būtiski nezaudējot GKP II inhibitoro aktivitāti;
7. Brom-aizvietotus 4-(4-benzil-5-hidroksiizoksazol-3-il)benzoscābes metilesterus nevar izmantot kā universālos būvblokus pārejas metālu katalizētajās sametināšanas reakcijās;
8. 4-Arilmetil-3-(4-karboksifenil)-5-hidroksiizoksazolu bāzes struktūrā atļauta stēriski apjomīgu grupu ievadīšana 4-arilmetil aizvietotāja aromātiskajā gredzenā, kas dod iespēju paaugstināt šīs sērijas savienojumu lipofilitāti;
9. Fenil-, piridil-, etilkarboksi-, amino-, *N*-acetilamino-, *N*-etoksikarbonil- un *N*-etilaminokarbonil- grupu ievadīšana jaunizveidotās sērijas lipofilākā savienojumā 4-karboksifenil- fragmenta 3. pozīcijā neuzlabo savienojuma inhibitoro aktivitāti.

## Introduction

Glutamate Carboxypeptidase II (GCP II) is two zinc atom containing enzyme, which in central nervous system (CNS) cleaves *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) into *N*-acetylaspartate (*N*-Ac-Asp) and glutamate (Glu). It has been shown that NAAG is endogenous mGluR3 agonist with positive neuroprotective effect. NAAG cleavage product Glu is a major neurotransmitter in the CNS, which in high concentrations causes neurodegeneration. In the cases of CNS dysfunction GCP II inhibition can maintain higher NAAG concentration and lower Glu concentration. This approach has a high therapeutic potential and GCP II inhibitors can be used in therapy of several neurological disorders – ALS, acute and neuropathic pain, drug and alcohol dependence, as well as neurodegenerative diseases, such as schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases.

The development of novel GCP II inhibitors has been an active field of research for more than 10 years. Several structurally different GCP II inhibitors have been published and patented. The main drawback that prevents the development of these compounds as medicines is their high polarity. Because of that, compounds cannot cross the blood-brain barrier and secure sufficient concentrations in the CNS. Additional disadvantage is low biological stability of some functional group containing compounds. Only a few potential GCP II inhibitors are undergoing clinical trials, and none of them have yet become a clinically used drug.

This doctoral thesis is devoted to the development of novel GCP II inhibitors and to research of their properties.

## **Aim of the Work and Research Methods**

The main objective of this doctoral thesis was to find new glutamate carboxypeptidase II inhibitors and to study structure-activity relationship within the series of newly found compound class. To achieve this it was necessary to:

1. summarize and analyze publication and patent data covering known GCP II inhibitors and their properties;
2. identify active compounds or compounds suitable for further modification by performing inhibitory activity screening of a nonionisable compound library;
3. modify base structure of a newly found hit in order to obtain more active GCP II inhibitors;
4. develop synthetic method for the modification of an active compound by introducing different substituents into the base structure, and adjust it for parallel synthesis;
5. study the active compound-enzyme complex model using molecular modeling in order to improve activity.

## Results

### Identification and Preliminary Optimization of an Active Compound

Analysis of the data available in the literature about known GCP II inhibitors led to a conclusion that none of the known compound classes are expected to expand and develop as drug candidates. All described compounds, although showing very high GCP II inhibitory activity, are either highly hydrophilic and are unable to cross the blood-brain barrier, or contain metabolically unstable functional groups. Moreover, all of these compounds and their derivatives are patented. The aim of this thesis was to find GCP II inhibitors representing new, patentable compound class. Therefore, we started our work with screening of nonionisable compound library (about 500 compounds), which resulted in a hit **1** with  $IC_{50}=10\ \mu\text{M}$  (Figure 1).

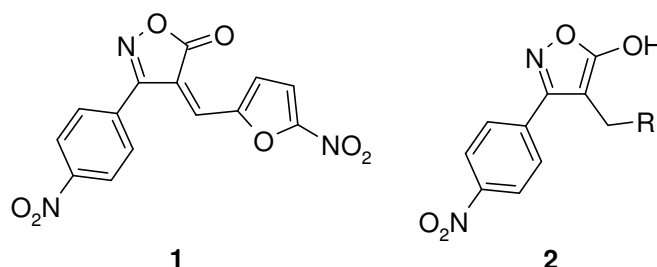


Figure 1. Hit **1** found as a result of screening of nonionisable compound library and its analogs **2**

Unfortunately, 4-[1-(5-nitrofuran-2-yl)-methyliden]-3-(4-nitrophenyl)-4H-isoxazol-5-one **1** showed low stability, probably due to the presence of an activated double bond in the molecule. It was not rational to optimize this compound class any further, so we decided to synthesize a more stable compound **2** series, which is structurally very similar.

Synthesis was started from 4-nitrobenzoic acid **3** (Figure 2). It was transformed to chloroanhydride in the reaction with thionyl chloride and then, without isolation, used to acylate malonic acid ethylester potassium salt. Upon acidification of the reaction mixture, C-acylation product underwent decarboxylation and  $\beta$ -ketoester **4** was formed. Ketoester was condensed with hydroxylamine and the resulting isoxazolone **5** was used to introduce substituents into the 4th position of the heterocycle. Isoxazolone **5** was condensed with different aldehydes, condensation reaction products **6** reduced with sodium borohydride to give target compounds **2**.

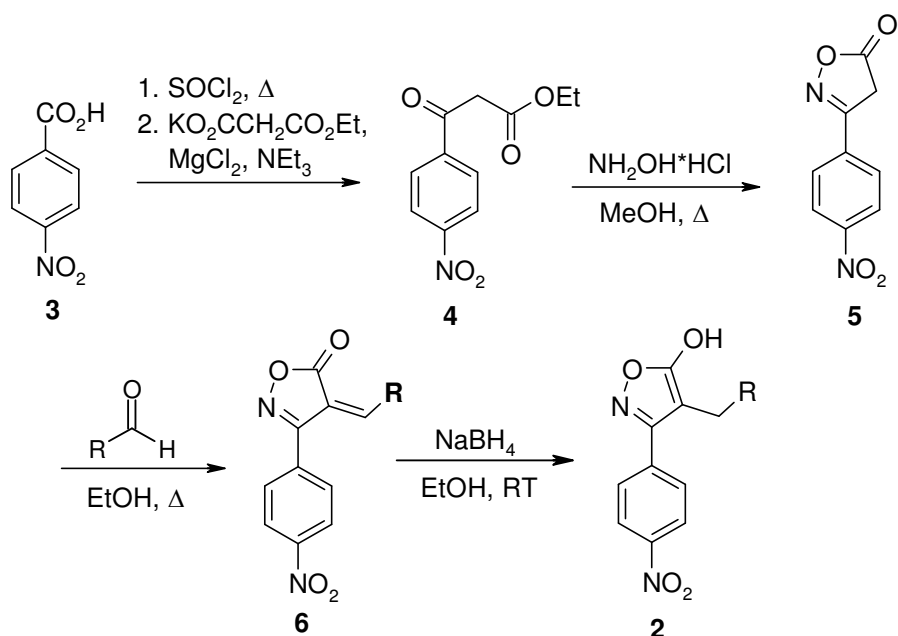


Figure 2. Preparation of 4-arylmethyl-3-(4-nitrophenyl)-isoxazol-5-oles **2**

The most active compound of the series is 4-(5-nitrofuran-2-ylmethyl)-3-(4-nitrophenyl)-isoxazol-5-ole **2.1** ( $IC_{50}=10 \mu\text{M}$ ), which is a direct analogue of starting hit **1**. Unfortunately, substitution of 5-nitrofuryl group with different aromatic substituents gave almost inactive compounds **2.2-2.7** (Figure 3).

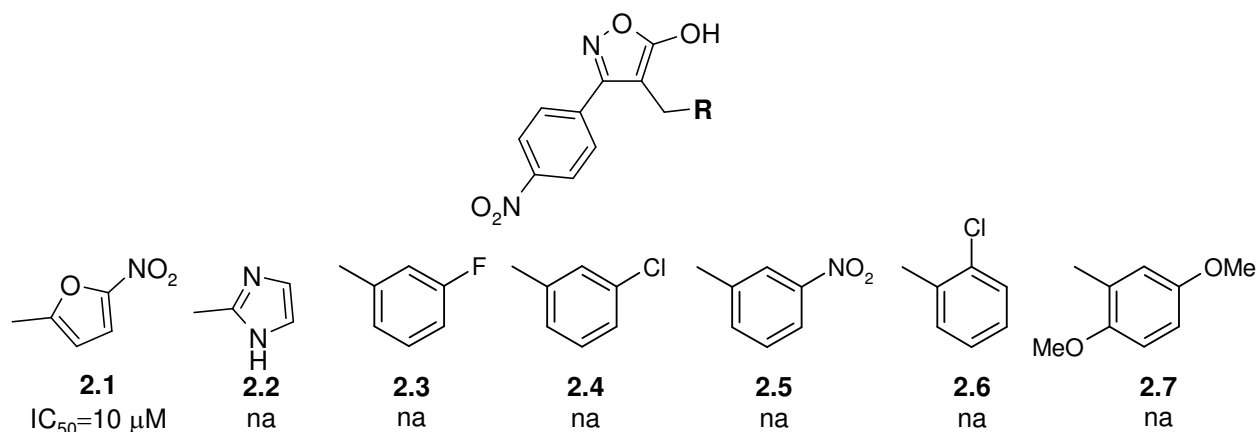


Figure 3. GCP II inhibitory activity of 4-arylmethyl-3-(4-nitrophenyl)-isoxazol-5-oles **2**

Given that known GCP II inhibitors are polycarboxylic acids we assumed that introduction of carboxylic acid functional group to the molecule could increase inhibitory activity of the compounds. Nitro group was exchanged with carboxylic group in **2.1**, which resulted in 4-[5-hydroxy-4-(5-nitrofuran-2-ylmethyl)-isoxazol-3-yl]benzoic acid **7.1** with increased inhibitory activity  $IC_{50}=2 \mu\text{M}$  (Figure 7).



Further work was devoted to the modification of the 4th position of 4-(5-hydroxyisoxazol-3-yl)benzoic acid methylester in order to find optimal substituent and define structure-activity relationships.

### Modification of the 4th Position of 4-(5-Hydroxyisoxazol-3-yl)benzoic Acid Methylester

In order to modify the 4th position of 4-(5-hydroxyisoxazol-3-yl)benzoic acid methylester we have developed synthetic method toward 4-(5-oxo-4,5-dihydroisoxazol-3-yl)benzoic acid methylester **11** (Figure 4).

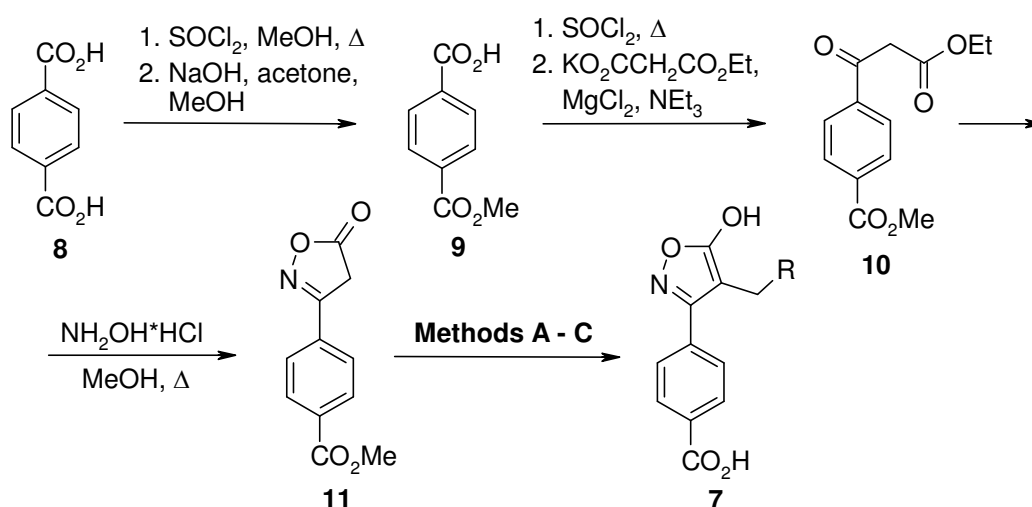


Figure 4. Preparation of 4-(5-oxo-4,5-dihydroisoxazol-3-yl)benzoic acid methylester **11**

Terephthalic acid monomethylester **9** was synthesized in two steps from terephthalic acid **8** by the method described in the literature. Then, in the conditions identical to the synthesis of nitro analogue **5**, isoxazolone **11** was prepared and used further as a key compound for introduction of different substituents into the 4th position of the heterocycle.

Two synthetic methods (methods A and B) were developed for the synthesis of target compounds **7**. Methods were used depending on the stability of the product in the reaction media and solubility of an aldehyde (Figure 5). First, isoxazolone **11** was condensed with corresponding aldehydes forming arylidenisoxazolones **12**. It was observed that, analogous to nitro compounds **1**, arylidenisoxazolones **12** were unstable. They were reduced with sodium borohydride to give more stable 5-hydroxyisoxazoles **13**. Basic or acidic hydrolysis of an ester group in 3-hydroxyisoxazoles **13** was performed as a last step of the synthesis and a series of target compounds **7** synthesized (Figure 7).

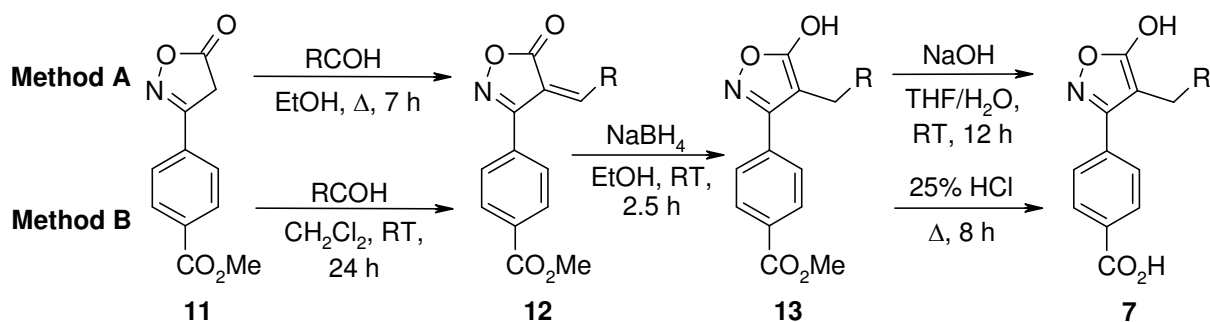


Figure 5. Synthetic methods toward target compounds **7**

In order to increase efficiency we have developed parallel synthesis approach (method C) toward target compounds **7** – precipitate of the product **12** formed in the condensation reaction was filtered off, and, without drying, used in the next two steps – double bond reduction and ester hydrolysis in the same reaction pot. Such parallel synthesis approach allowed an increase of overall yield of the target compounds, as well as shortened the reaction time and reduced contribution for intermediate analysis.

**Method C**

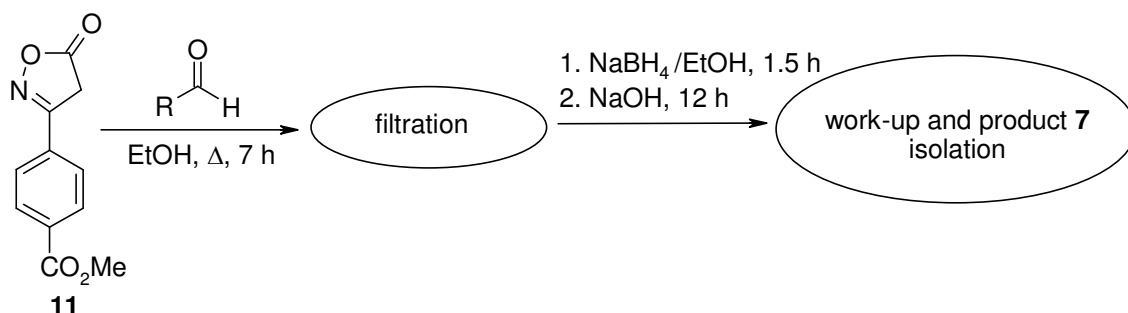


Figure 6. Parallel synthesis of target compounds **7**

Following methods A – C we have prepared a 38 compound library with general structure **7**. GCP II inhibitory activity data of the most active compounds from the series is shown in figure 7.

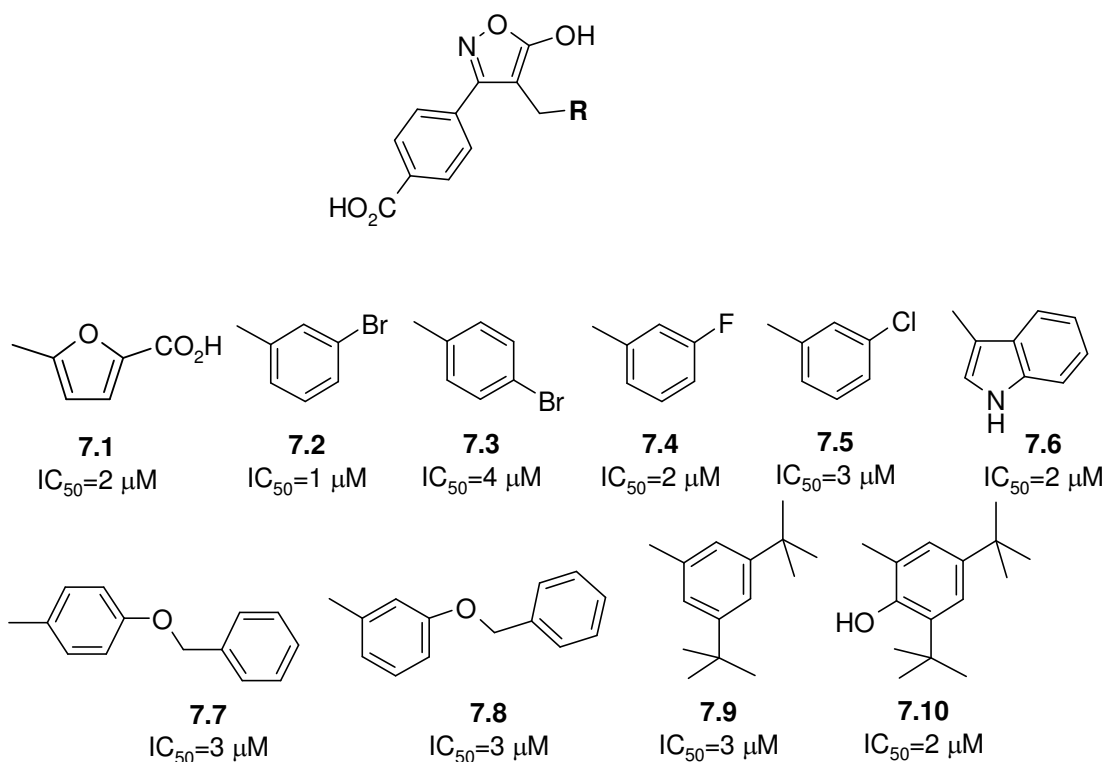


Figure 7. GCP II inhibitory activity of 4-arylmethyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazoles **7**

The most active compounds from the series **7.1-7.10** inhibited GCP II in micromolar concentrations ( $IC_{50}=1-4 \mu\text{M}$ ). All the other compounds from the series showed similar or lower inhibitory activity.

Compounds **7.2** and **7.3**, which contain bromine in the 4th position of an aromatic ring of the substituent, were between the most active representatives of the series. In order to improve inhibitory activity, we synthesized few more **7.2** and **7.3** analogues, containing additional substituents in the benzene ring. Unfortunately, none of the newly synthesized analogues showed inhibitory activity higher than compounds **7.1-7.10**.

In the 3-(4-carboxyphenyl)isoxazol-5-ole **7** series, one can highlight compounds **7.7-7.10** with sterically hindered substituents, that display higher inhibitory activity comparing to unsubstituted analogues. Compound **7.9** ( $IC_{50}=3 \mu\text{M}$ ) is particularly interesting – comparing to the other representatives of the series it is remarkably more lipophilic.

In general, GCP II inhibitory activity data within the series of 4-aryl-3-(4-carboxyphenyl)-isoxazol-5-oles **7** is rather narrow. Choice of an optimal substituent in the 4th position of 5-hydroxyisoxazole is restricted not only by the GCP II inhibitory activity, but

also by lipophilicity, that can considerably influence blood-brain barrier permeability of the compound.

### Modification of the Core Heterocycle

Further work was devoted to the modification of the core heterocycle in the scaffold of newly found 3-(4-carboxyphenyl)-4-methylaryl-5-hydroxyisoxazole series **7**. 5-Hydroxyisoxazole **7.2** was selected as a reference compound. In order to determine structure-activity relationship between different heterocyclic analogs, 5-hydroxyisoxazole of the compound **7.2** was replaced with different carboxylic acid bioisosters – 3-hydroxyisoxazole and 5-hydroxypyrazole.

Synthesis of the target heterocycles was started from  $\beta$ -ketoester **10**. Initial attempt was made to condense it with 3-bromobenzaldehyde, in order to reduce double bond in the condensation product with  $\text{NaBH}_4$ , that would lead to compound **14** as a key for the synthesis of 3-hydroxyisoxazole and 5-hydroxypyrazole derivatives. This synthetic route was unsuccessful – the only reaction product was compound **15**, which resulted from the addition of the starting ketoester **10** to the desired condensation product (Figure 8).

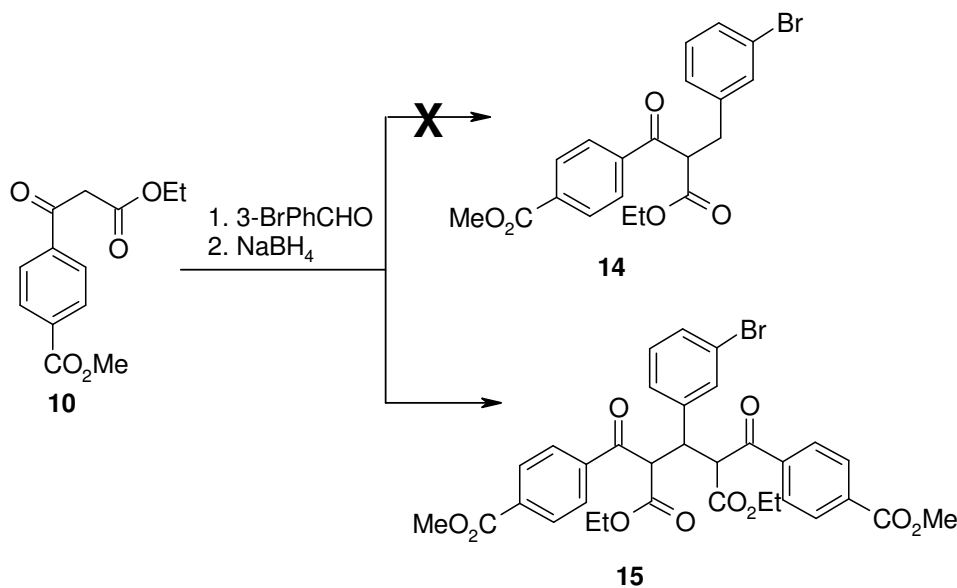


Figure 8. *Knoevenagel* condensation of  $\beta$ -ketoester **10** with 3-bromobenzaldehyde

A different synthetic pathway was applied for the synthesis of the desired intermediate **14** – alkylation of  $\beta$ -ketoester **10** with 3-bromobenzylbromide (Figure 9). 4-[3-(3-Bromophenyl)-2-ethoxycarbonylpropionyl]benzoic acid methylester **14** obtained in this reaction was cyclized with hydrazine in methanol and, after pyrazole ring formation, ester group was hydrolyzed under basic conditions to give target compound **16**.

For the synthesis of 3-hydroxyisoxazole **17**, alkylated  $\beta$ -ketoester **14** was condensed with hydroxylamine in basic media under reduced temperature. Under these conditions selective 3-hydroxyisoxazole ring formation occurred, in contrast to the neutral reaction conditions when 5-hydroxyisoxazole is formed.

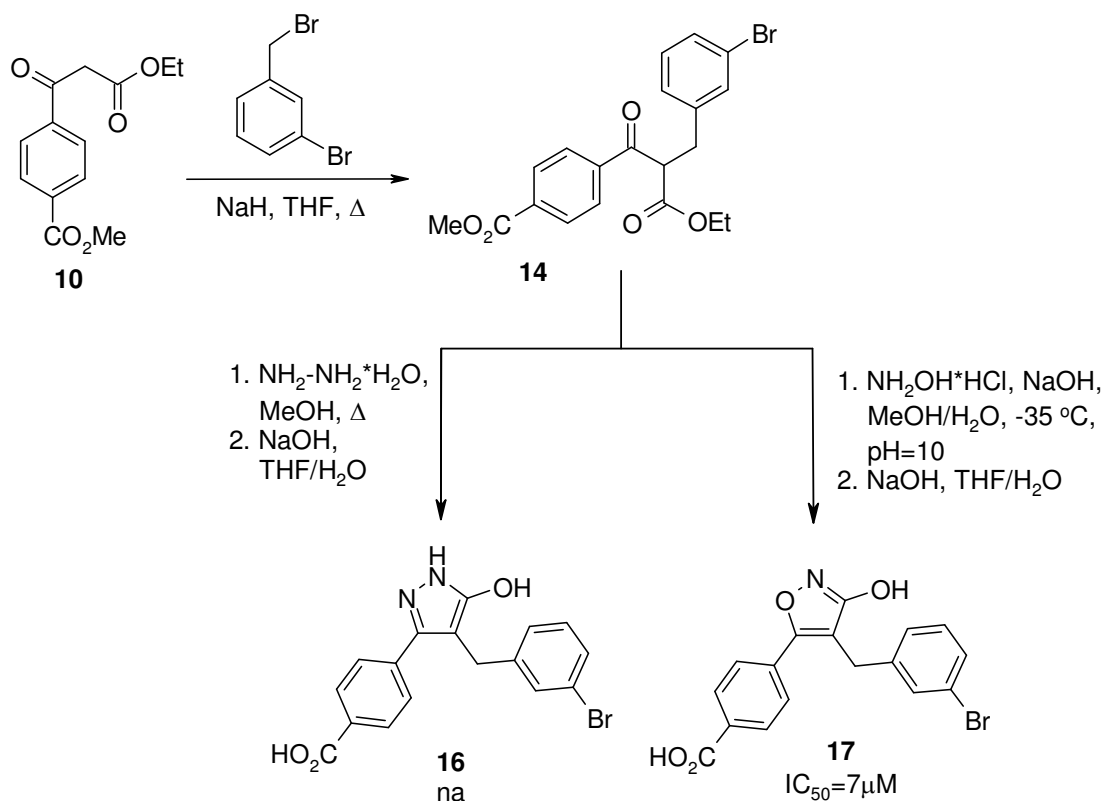


Figure 9. Preparation of 5-hydroxypyrazole **16** and 3-hydroxyisoxazole **17**

4-[4-(3-Bromobenzyl)-5-hydroxy-1H-pyrazol-3-yl]benzoic acid **16** was found to be almost inactive GCP II inhibitor (20% inhibition at 10  $\mu\text{M}$ ). Comparing to the starting compound **7.2**, 4-[4-(3-bromobenzyl)-3-hydroxyisoxazol-5-yl]benzoic acid **17** displayed lower inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}=7\mu\text{M}$ ). But still, this range of activity is sufficient to use 3-hydroxyisoxazole as an alternative heterocycle to 5-hydroxyisoxazole and continue structure optimization in order to obtain highly active GCP II inhibitors.

It is important to add, that hydroxyisoxazoles are believed to be partially ionized carboxylic acid bioisosters. Comparison of the properties of heterocycles and carboxylic acids at physiological pH (pH=7.4) indicates, that heterocyclic compounds are more lipophilic, that can influence blood-brain barrier penetration ability, at the same time they are able to ionize ( $\text{pK}_a\sim 7$ ) and display properties similar to carboxylic acids.

## Pharmacofore Linker Modification

### 3-Phenyl-5-hydroxyisoxazole Based Dicarboxylic Acids

As long as known GCP II inhibitors are polycarboxylic acids, we presumed that introduction of additional carboxylic function to the molecule could considerably improve inhibitory activity. Phenyl-5-hydroxyisoxazole derived dicarboxylic acids with different spatial disposition of carboxylic groups were selected as target compounds.

First, starting building blocks were synthesized – 2-, 3-, 4-carboxymethylbenzaldehydes **19**, **24**, **25** and 2-carboxymethylthiophen-2-carbaldehyde **29** (Figure 10). 2-Carboxymethylbenzaldehyde **19** was synthesized by esterification of the corresponding acid **18**. 3- and 4-Carboxymethylbenzaldehydes **24** and **25** were synthesized from corresponding hydroxymethylbenzoic acids **20** and **21**. First, acids were converted to the corresponding methylesters **22** and **23**, and then hydroxygroups were oxidized to aldehydes. 2-Carboxymethylthiophen-5-carbaldehyde **29** was synthesized from thiophen-2-carbaldehyde **26**. In this case, aldehyde function of **26** was protected with *N,N*-dimethylethan-1,2-diamine and the compound **27** obtained was subjected to lithiation. Carboxylic group was introduced to the lithiated thiophene in reaction with carbon dioxide. 5-Formylthiophen-2-carboxylic acid **28** obtained was transformed to the corresponding methylester **29** by alkylation of carboxylate with methyl iodide.

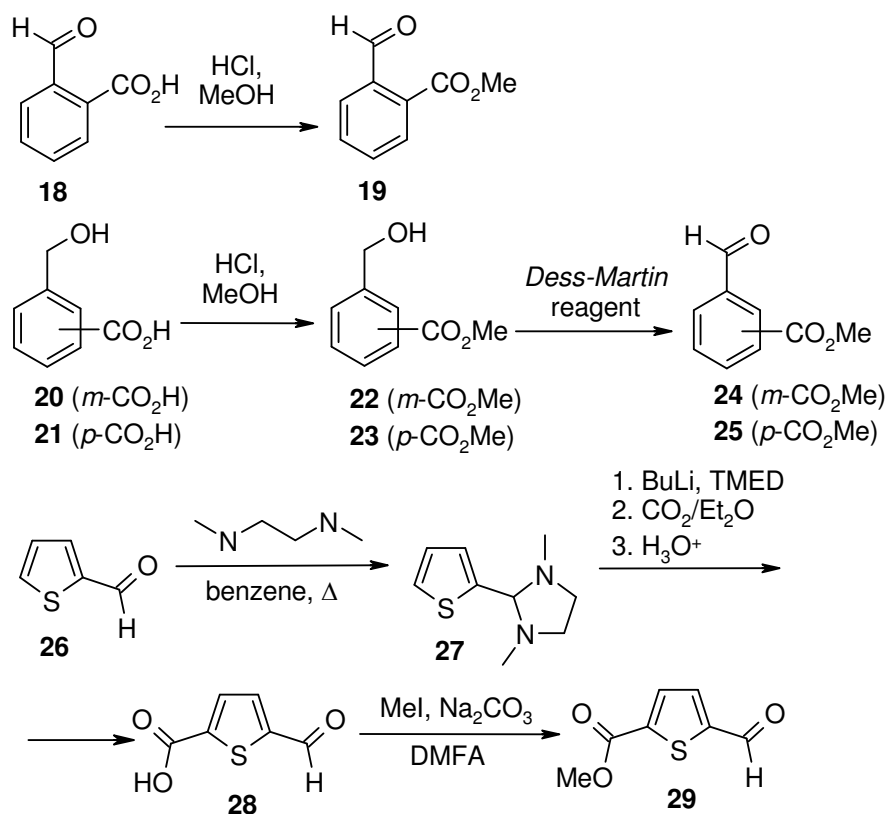


Figure 10. Preparation of starting aldehydes **19**, **24**, **25** and **29**

Isoxazolone **33** was synthesized from isophthalic acid **30** in analogy with the synthesis of isoxazolone **11** described earlier. Isoxazolones **11** and **33** were converted to the dicarboxylic acids **7.11-7.14** and **36.1-36.3**, by the methods A and C, that had been worked out for the synthesis of the series **7** (Figure 11).

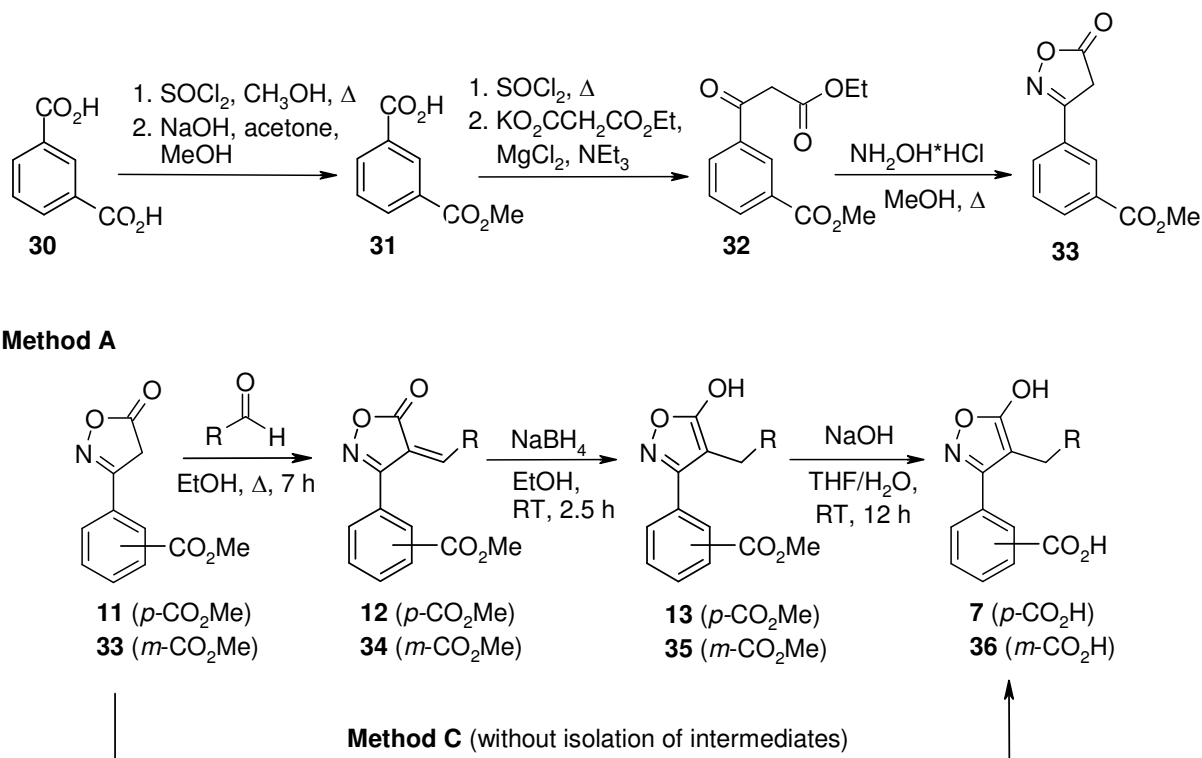


Figure 11. Preparation of dicarboxylic acids **7** and **36**

GCP II inhibitory activity of dicarboxylic acids is shown in figure 12. Dicarboxylic acids **7.12** (IC<sub>50</sub>=1 μM), **7.14** (IC<sub>50</sub>=1 μM) and **36.3** (IC<sub>50</sub>=3 μM) displayed highest inhibitory activity. This inhibitory activity is comparable to the activity of the most active compounds from the series **7**, suggesting, that optimal spatial disposition of the second carboxylic group has not been found and it was necessary to continue optimization of 3-phenyl-5-hydroxyisoxazole scaffold.

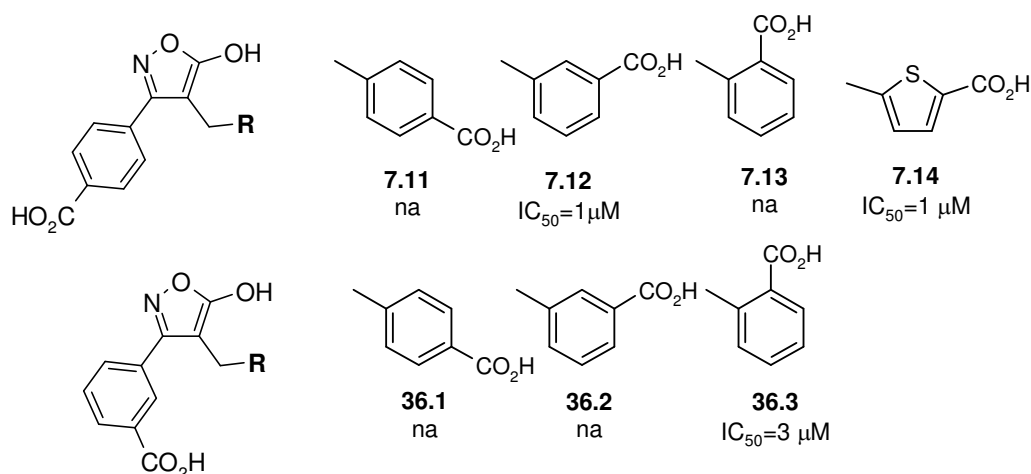


Figure 12. GCP II inhibitory activity of dicarboxylic acids **7** and **36**

### Modification of 4-Carboxyphenyl Fragment in the Scaffold of Compounds **7**

We decided to introduce additional functional groups to the 4-carboxyphenyl part of the base structure **7**, that would potentially bind to zinc ions or amino acid residues in the active site of the enzyme. The most active and lipophilic representatives from the series **7** – **7.2**, **7.5** and **7.9** were selected as reference compounds for the modification.

Initially, for the synthesis of target compounds we tried to develop synthetic method that employs arylbromides as versatile building blocks for transition metal catalyzed cross-coupling reactions. Bromine containing esters **40**, necessary for the functionalization, were synthesized from 2-bromoterephthalic acid **37** using method developed for the synthesis of series **7** (Figure 13).

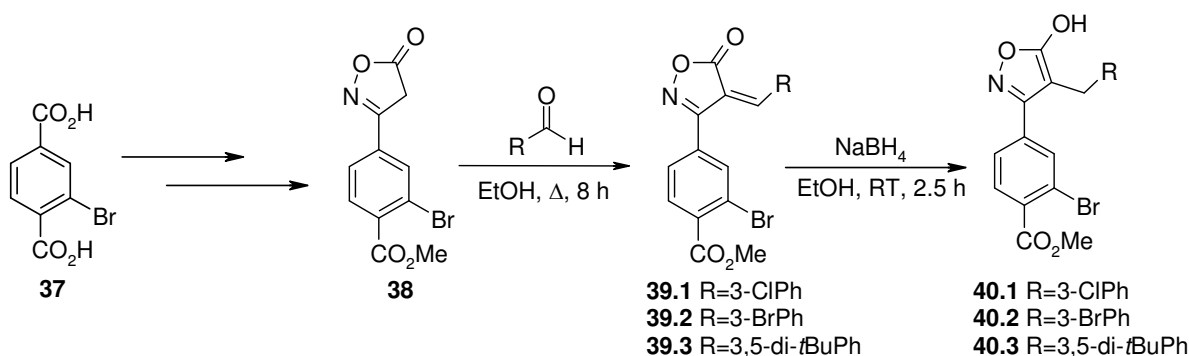


Figure 13. Preparation of 2-bromobenzoic acid methylesters **40.1-40.3**

Unfortunately, our attempts to find optimal Pd(0) catalyzed *Suzuki-Miyaura* and *Heck* conditions for functionalization of compounds **40.1** and **40.3** were unsuccessful (Figure 14). The presence of the product in the reaction mixture was not observed in any of the experiments. It could be explained by incompatibility of unprotected 5-hydroxyisoxazole with



Pd(0) catalysts. Depending on reaction conditions, either unreacted starting material or unidentified decomposition products were observed in the reaction mixture.

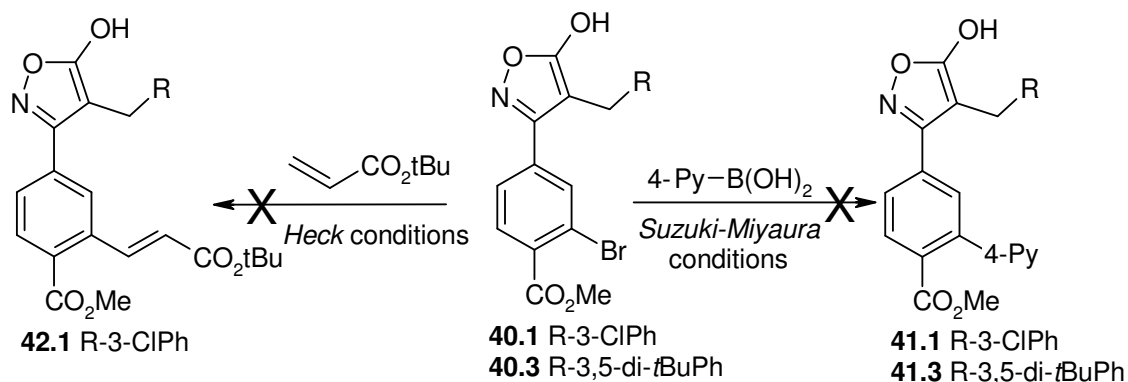


Figure 14. Unsuccessful *Suzuki-Miyaura* and *Heck* reaction conditions

Compounds **40.1** and **40.2** were successfully transformed to isoxazole carboxylic acids **43.1** and **43.2** (Figure 15). GCP II inhibitory activity of the compounds was determined: both were inactive.

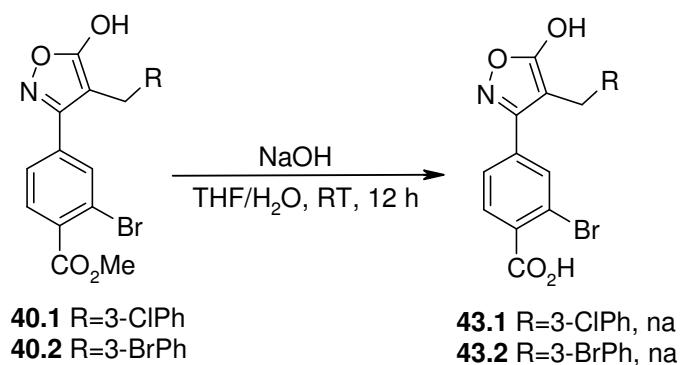
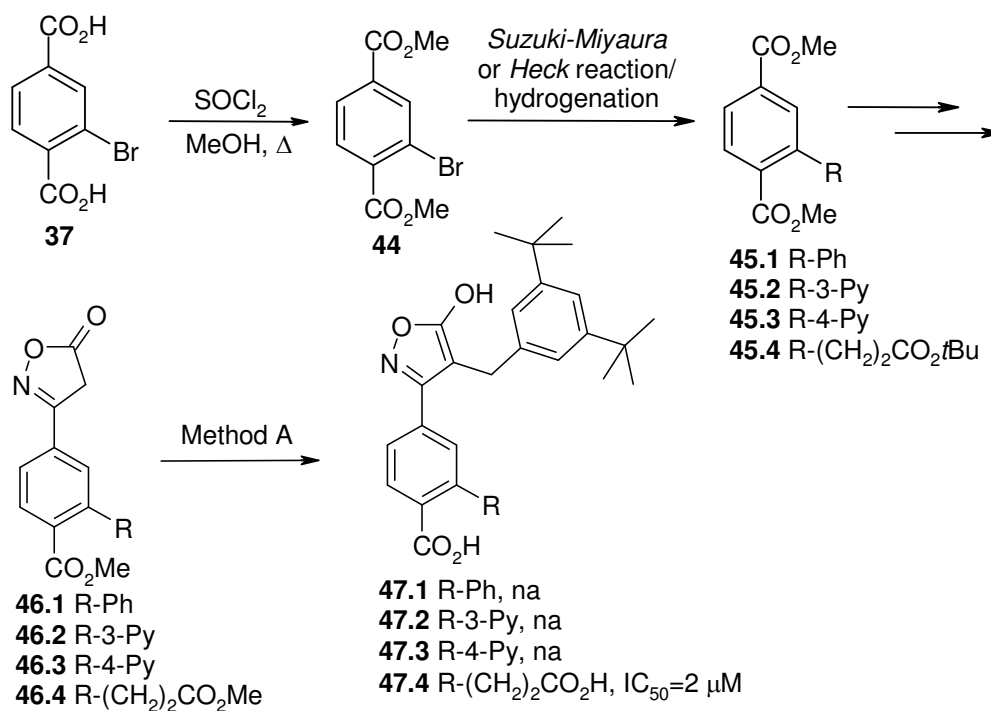


Figure 15. Preparation and GCP II inhibitory activity of bromobenzoic acids **43.1** and **43.2**

As long as modification strategy based on bromo-substituted 3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazoles as building blocks failed, necessary substituents were introduced to the benzene ring in the early stage of the synthesis – before 5-hydroxyisoxazole ring formation. 2-Bromoterephthalic acid diester **44** was functionalized with phenyl, 3- and 4-pyridine and *tert*-butylcarbonyl ethyl groups in *Suzuki-Miyaura* and *Heck* cross-coupling reactions (Figure 16). Conditions of Pd(0) catalyzed reactions were analogous to the conditions used for **40.1** and **40.3** modification. Cross-coupling reactions were performed successfully and products isolated with satisfactory yields. Target 5-hydroxyisoxazoles **47.1** – **47.4** were synthesized from 2-bromoterephthalic acid **37**. After functionalization in *Suzuki-Miyaura* and *Heck* cross-

coupling reactions one ester group in the diesters **45.1** – **45.4** was selectively hydrolyzed. Then, by methods developed earlier, isoxazolones **46.1** – **46.4** were synthesized and used as substrates for the preparation 5-hydroxyisoxazoles **47.1** – **47.4**. It was observed that in the case of carboxyethyl- analogue complete transesterification of *tert*-butyl ester occurred during the condensation of  $\beta$ -ketoester with hydroxylamine in methanol.



Suzuki-Miyaura and Heck reaction conditions: when R - Ph, 3-Py, 4-Py: R-B(OH)<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; when R - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu (1) *tert*-butylacrilate, Pd(OAc)<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, DMF, (2) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C

Figure 16. Preparation and GCP II inhibitory activity of bromobenzoic acids **47.1-47.4** substituted in the 2nd position

In order to provide additional binding with zinc ions or amino acid residues in the active site of the enzyme, we decided to introduce nitrogen containing functional groups to the 3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole scaffold.

Synthesis of compounds **55-58** was started from commercially available 2-aminoterephthalic acid monomethylester **48** (Figure 17). After protection of the amino function, carboxylic acid was converted to  $\beta$ -ketoester **50**. Then, after condensation of  $\beta$ -ketoester with hydroxylamine we isolated isoxazolone **51**, which in *Knoevenagel* reaction with 3,5-di-*tert*-butylbenzaldehyde was converted to arylidenisoxazolone **52**. During the reduction of the double bond in **52**, partial *N*-acyl group cleavage has occurred. Both compounds, **53** and **54**, were separated chromatographically and ester groups were hydrolyzed

in each of them separately to give 2-acetylamino-4-[4-(3,5-di-*tert*-butylbenzyl)-5-hydroxyisoxazol-3-yl]benzoic acid **55** and 2-amino-4-[4-(3,5-di-*tert*-butylbenzyl)-5-hydroxyisoxazol-3-yl]benzoic acid **56**.

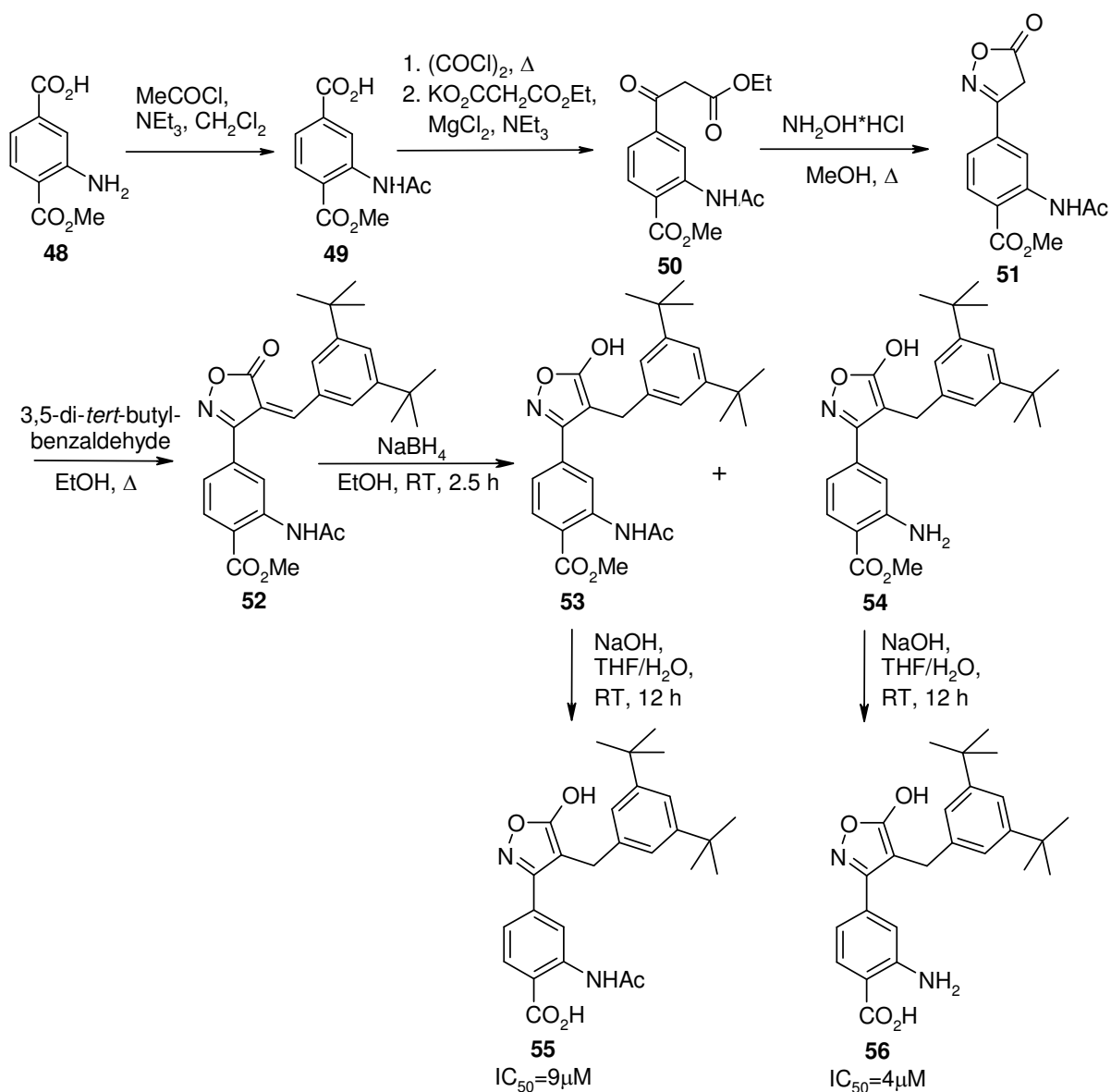


Figure 17. Preparation and GCP II inhibitory activity of *N*-acetylamino benzoic acid **55** and aminobenzoic acid **56**

Then *N*-ethoxycarbonyl and *N*-ethylaminocarbonyl derivatives of the compound **56** were synthesized. Initially, we attempted the synthesis of *N*-ethoxycarbonyl derivative **57** starting from ester **54**. Unfortunately, during the methylester hydrolysis, partial cleavage of *N*-ethoxycarbonyl group has occurred. Thus, the synthesis of both acyl and urea derivatives was performed starting from free amino acid **56**. *N*-Ethoxycarbonyl derivative **57** and *N*-ethylaminocarbonyl derivative **58** were prepared following literature procedures (Figure 18).

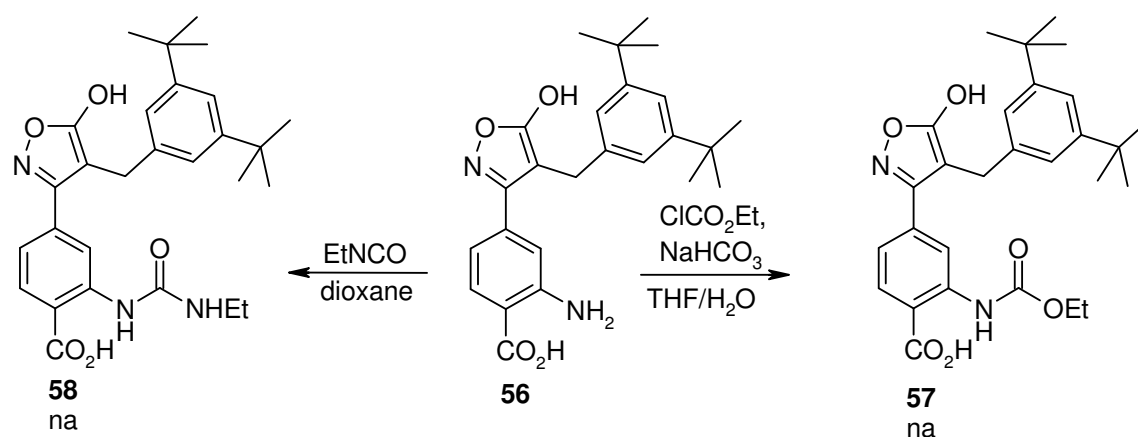


Figure 18. Preparation and GCP II inhibitory activity of *N*-ethoxycarbonyl derivative **57** un *N*-ethylaminocarbonyl derivative **58**

Bromine substituted 3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole derivatives **43.1** and **43.2** displayed low GCP II inhibitory activity. Introduction of aromatic substituents into the 3rd position of 4-carboxyphenyl fragment also did not improve inhibitory activity (compounds **47.1-47.3**). Introduction of carboxyethyl group, as well as aminofunctionality into the 3rd position of 4-carboxyphenyl fragment gave compounds **47.4**, **55-57** with inhibitory activity similar or lower than that of the reference compounds from the series **7**.

These results show that proper functional groups that would provide additional binding to zinc ions or amino acid residues in the active site of the enzyme were not found during modification of 4-carboxyphenyl fragment.

## Conclusions

1. 4-Arylmethyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole scaffold has been identified and new, fairly active GCP II inhibitors were developed on the basis of the scaffold;
2. Synthetic method has been developed for the preparation of 4-arylmethyl-3-(4-nitrophenyl)- and 4-arylmethyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole from the corresponding dicarboxylic acids. This method is suitable for the introduction of various substituents into the 4th position of 5-hydroxyisoxazole;
3. Synthetic method has been adjusted to parallel synthesis and a library of 38 compounds was prepared;
4. It has been shown experimentally that condensation of 4-(2-ethoxycarbonylacetyl)benzoic acid methyl ester with hydroxylamine under neutral reaction conditions leads to formation of 5-hydroxyisoxazole, while under basic conditions 3-hydroxyisoxazole cycle is formed;
5. It has been shown that mono-hydrolysis of less sterically hindered ester group in terephthalic acids dimethylesters substituted in the 2nd position of benzene ring proceeds selectively;
6. 5-Hydroxyisoxazole as a core heterocycle in arylmethyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole can be replaced with 3-hydroxyisoxazole without significant loss of GCP II inhibitory activity;
7. Bromo-substituted 4-(4-benzyl-5-hydroxyisoxazol-3-yl)benzoic acid methyl esters cannot be used as building blocks in transition metal catalyzed cross-coupling reactions;
8. Bulky substituents are allowed in the benzene ring of 4-arylmethyl substituent in 3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole scaffold thus providing opportunity to increase the overall lipophilicity of the molecules;
9. Introduction of phenyl-, pyridyl-, ethylcarboxy-, amino-, *N*-acetylamino-, *N*-ethoxycarbonyl- and *N*-ethylaminocarbonyl- groups into the 3rd position of 4-carboxyphenyl- fragment of the most lipophilic representative of the series does not improve GCP II inhibitory activity of the compound.

## Darba aprobācija (Abstracts)

1. Z. Bluke, M. Teus, A. Jirgensons Synthesis of Potential Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. Book of Abstracts, RTU 46<sup>th</sup> Student Scientific Conference, April 28-29, Riga, Latvia, 2005;
2. M. Teus, A. Jirgensons, I. Kums, M. Dambrova, C. Parsons. Toward the Development of New Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. Book of Abstracts, FEBS Summer School "Chemistry meets Biology", July 17-29, Spetses, Greece, 2005;
3. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, C. Parsons. The Development of 3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazoles as Novel Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. *Latv. J. Chem.* **2006**, *1*, 84. Paul Walden 4<sup>th</sup> Symposium on Organic Chemistry, September 15-16, Riga, Latvia, 2005;
4. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, C. Parsons. Synthesis and GCP II Inhibitory Activity of 3-Phenyl-5-hydroxyisoxazole Based Dicarboxylic Acids. RTU 46th International Scientific Conference, October 13-15, Riga, Latvia, 2005;
5. M. Teus. The Development of Novel Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. Oral presentation during Prof. Gustavs Vanags Readings, May 25, Riga, Latvia, 2006;
6. M. Teus, A. Jirgensons. The Development of Novel Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. *Drugs of the Future*. **2006**, *31*(suppl. A), 176-177. XIX<sup>th</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry ISMC 2006, August 29 - September 05, Istanbul, Turkey, 2006;
7. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, R. Mezhapuke. The Development of 3-Phenyl-5-hydroxyisoxazole Based Glutamate Carboxypeptidase II Inhibitors. Book of Abstracts, Balticum Organicum Syntheticum 2008, June 29-July 2, Vilnius, Lithuania, 2008, award for the best Latvian poster representation.

## Publikācijas (Publications)

1. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, C. Parsons. Synthesis and GCP II Inhibitory Activity of 3-Phenyl-5-hydroxyisoxazole Based Dicarboxylic Acids. *Scientific Proceedings of RTU*. **2006**, 1(12), 7-15;
2. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, R. Mezhapuke. Synthesis and GCP II Inhibitory Activity of Heterocyclic Analogues of 4-[4-(3-Bromobenzyl)-5-hydroxyisoxazol-3-yl]benzoic Acid. *Chemistry of Heterocyclic Compounds (Engl. Ed.)*. **2007**, 43(11), 1440-1444;
3. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, R. Mezhapuke, C. G. Parsons and W. Danysz. Identification of GCP II Inhibitors Based on 4-Arylmethyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-hydroxyisoxazole Scaffold. *Letters in Drug Design & Discovery* (submitted for publication);
4. M. Teus, A. Jirgensons, M. Dambrova, R. Mezhapuke. Synthesis of 4-(4-Aryl-5-hydroxyisoxazol-3-yl)benzoic Acids Derivatives as Potential GCP II Inhibitors. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* (prepared for publication).