



(51) МПК
C07D 213/75 (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010136738/04, 03.03.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 03.03.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 03.03.2008 EP 08450027.1

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2012 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 10.08.2013 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: DATABASE CHEMCATS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE. COLUMBUS, OHIO, US; RN: 697231-46-2 22 June 2004 (2004-06-22). TimTec Stock Library. 20 November 2007 (2007-11-20). TIMTEC, INC. HARMONY BUSINESS PARK 301-A NEWARK, DE, 19711 USA. GB 1162727 A, 27.08.1969. TADAO ASAMI et al. Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety. 2007, WILEY -VCH, p.175-187. RU 2126396 C1, 20.02.1999.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 04.10.2010

(86) Заявка РСТ:
 EP 2009/052494 (03.03.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2009/109570 (11.09.2009)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская, 15, офис 5, BOX 1125, ООО "ПАТЕНТИКА", М.И. Ниловой

(72) Автор(ы):

**ЙОНАК Клаудия (АТ),
 РОЖОН Вилфрид (АТ)**

(73) Патентообладатель(и):

**ГМИ-ГРЕГОР-МЕНДЕЛЬ-ИНСТИТУТ
 ФЮР МОЛЕКУЛАРЕ
 ПФЛАНЦЕНБИОЛОГИ ГМБХ (АТ)**

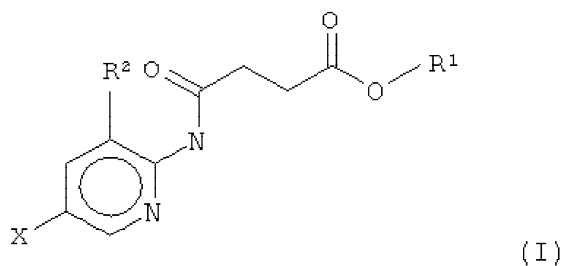
RU 2 4 8 9 4 2 4 C 2

RU 2 4 8 9 4 2 4 C 2

(54) ИНГИБИТОРЫ ДЛЯ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА БРАССИНОСТЕРОИДОВ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение описывает применение соединения, имеющего формулу (I)



, где X представляет собой F, Cl, Br или I; R¹ представляет собой CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ или C₃H₅R³R⁴; R² представляет собой H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ или

C₂H₃R³R⁴; и R³ и R⁴ независимо представляют собой X, OH или NH₂, для обработки растений, в частности, для увеличения роста растений, повышения урожайности и/или обеспечения устойчивости к стрессу, кроме того, изобретение описывает метиловый эфир 4-[(5-йодпирид-2-ил)амино]-4-оксобутановой кислоты, а также способ получения данного соединения. Технический результат: получено и описано новое соединение, которое может быть полезно для обработки растений с целью увеличения роста растений. 7 н. и 1 з.п. ф-лы, 1 прим., 1 табл., 6 ил.

R U 2 4 8 9 4 2 4 C 2

R U 2 4 8 9 4 2 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 213/75 (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010136738/04, 03.03.2009**(24) Effective date for property rights:
03.03.2009

Priority:

(30) Convention priority:
03.03.2008 EP 08450027.1(43) Application published: **10.04.2012 Bull. 10**(45) Date of publication: **10.08.2013 Bull. 22**(85) Commencement of national phase: **04.10.2010**(86) PCT application:
EP 2009/052494 (03.03.2009)(87) PCT publication:
WO 2009/109570 (11.09.2009)

Mail address:

**190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
ofis 5, VOKh 1125, OOO "PATENTIKA", M.I.
Nilovoj**

(72) Inventor(s):

**JONAK Klaudija (AT),
ROZhON Vilfrid (AT)**

(73) Proprietor(s):

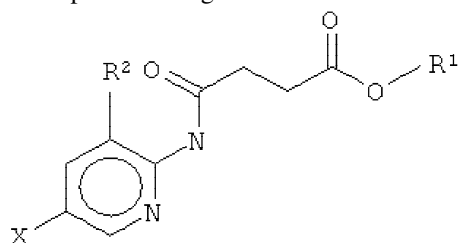
**GMI-GREGOR-MENDEL'-INSTITUT FJuR
MOLEKULARE PFLANTsENBIOLOGI GMBKh
(AT)**

(54) **INHIBITORS FOR TRANSFER OF SIGNAL OF BRASSINOSTEROIDS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention describes application of a compound having a formula



(I)

, where X is F, Cl, Br or I; R¹ is CH₃, C₂H₅,

C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ or C₃H₅R³R⁴; R² is H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ or C₂H₃R³R⁴; and R³ and R⁴ are independently X, OH or NH₂, for treatment of plants, in particular, for increased growth of plants, higher crop capacity and/or provision of resistance to stress, besides, the invention describes methyl ether 4-[(5-iodinepyridine-2-yl)amino]-4-oxobutanoic acid, and also a method to produce this compound.

EFFECT: new compound is produced and described, which may be useful for treatment of plants in order to increase plant growth.

8 cl, 1 ex, 1 tbl, 6 dwg

Изобретение относится к ингибиторам передачи сигнала brassиностероидов.

Брассиностероиды представляют собой растительные стероидные гормоны, вовлеченные во многие процессы, включая рост и деление клеток, рост пыльцевой трубки, развитие сосудистой ткани, старение и модуляцию реакций на стресс.

Брассиностероиды образуются из предшественников - стеролов. Многие ферменты, участвующие в биосинтезе brassиностероидов, были идентифицированы путем анализа мутантов *Arabidopsis thaliana*, таких как *dwf1*, *cbbl*, *dwf4*, *cpd*, *det2* и *stel/dwf7*. В последнее время анализ мутации *dx* томата позволил идентифицировать фермент, участвующий в последней стадии биосинтеза brassиностероидов, а именно, в превращении кастастерона в brassинолид, самый активный brassиностероид. Два гомолога *Arabidopsis thaliana* смогли идентифицировать с помощью подхода "ген-кандидат". Данные ферменты, как и DWF4 и CPD, относятся к семейству монооксигеназ цитохрома P450.

Брассинолид различают посредством рецепторной киназы BRI1 и ее корцептора ВАК1, которые в отличие от стероидных рецепторов животных локализируются в клеточной мембране. Сигнал передается в ядро посредством невыясненных до сих пор механизмов и регулирует GSK-3/Shaggy-подобные киназы, включенные в передачу сигнала brassиностероидов: BIN2/UCU1, ASKL, ASK ζ и ASK θ (Vert and Chory, 2006). Данные киназы фосфорилируют транскрипционные факторы, относящиеся к семейству BES1/BZR1, в консервативном мотиве, состоящем из восьми смежных повторов последовательности SXXXS. Таким образом, активность данных транскрипционных факторов блокируется, так как только их нефосфорилированные варианты могут связываться с ДНК и регулировать экспрессию генов. Дефосфорилированию способствует ядерная протеинфосфатаза BSU1 и ее гомологи BSL 1-3. Более того, белки 14-3-3 могут связывать фосфорилированные BZR1 и BES1, которые могут способствовать их релокализации в цитоплазму.

Несмотря на то, что известен ряд ферментов, участвующих в синтезе и передаче сигнала brassиностероидов, доступно очень малое число ингибиторов. Первый известный селективный ингибитор синтеза brassиностероидов представлял собой КМ-01 (Kim et al., 1998). Применение данного ингибитора было очень ограничено из-за его низкой активности. Исследования, показавшие что ингибитор биосинтеза гиббереллиновой кислоты, униконазол (*uniconazol*), обладает слабым ингибирующим действием на биосинтез brassиностероидов, привели к разработке brassиназола (*brassinazole*) (Min et al., 1999) и Brz2001 (Sekimata et al., 2001).

Аналогичным образом другой ингибитор brassиностероидов идентифицировали путем модификации пропиконазола (*propiconazole*) (Sekimata et al., 2002). «Мишень» действия brassиназола представляет собой гемовое железо монооксигеназы DWF4 цитохрома P450. Brassиназол широко применяют для исследования синтеза и действия brassиностероидов. Кроме того, brassиназол применяли для генетических скринингов (селекции) с выделением мутантов, не реагирующих на данное соединение. Это позволило идентифицировать транскрипционный фактор BZR1.

4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота представляет собой моноамид янтарной кислоты с 2-амино-5-бромпиридином. Было обнаружено, что бром в положении 5 пиридинового кольца и группа карбоновой кислоты являются признаками, имеющими важное значение для ее активности. В последнее время 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота была идентифицирована в качестве ингибитора передачи сигнала brassиностероидов с помощью методов

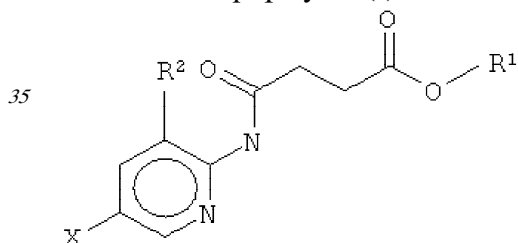
химической генетики. 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота представляет собой нестероидное соединение, индуцирующее конститутивные реакции brassinостероидов в растениях путем ингибирования большинства GSK-3/Shaggy-подобных киназ. *A. thaliana* содержит 10 ASK (GSK-3/Shaggy-подобные киназы *A. thaliana*), которые могут быть подразделены на 4 группы. Киназы группы I (ASK α , ASK γ и ASK ϵ) и киназы группы II (BIN2, ASK ζ и ASK λ) наиболее чувствительны к 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоте. Киназа ASK θ группы III умеренно ингибируется, в то время как вторая киназа группы III, ASK β , не ингибируется. ASK δ , киназа группы IV, также чувствительна к 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоте. Причина данной специфичности неизвестна.

4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксометиловый эфир бутановой кислоты имеет регистрационный номер CAS 697231-46-2. Burdulene et al. (Pharm. Chem. J., 30 (1996): 680-682) в частности описывают реакцию 2-амино-5-бромпиридина с янтарным ангидридом с получением бикинина (bikinin). В GB 1 162 727 A описаны N-замещенные аминокислоты, способствующие росту растений.

Asami et al. (Глава 19 в "Pesticide Chemistry", (2007), WILEY-VCH) сообщают общие сведения о небольших молекулах в науке о пестицидах. Ostaszewski et al. (J. Molec. Struct., 474(1999): 197-206) описывают исследования конформации молекул амидоэфиров пиридина, содержащих один и два заместителя. Roma et al. (Bioo. Med. Chem., 8 (2000): 751-768) сообщают о содержащих заместители пиримидин-4-онах. В WO 2008/049729 A1 описаны нестероидные миметики brassinостероидов.

Задача настоящего изобретения заключается в получении дополнительных ингибиторов передачи сигнала brassinостероидов, подобных 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоте. Предпочтительно, ингибирующая активность новых катализаторов *in vivo* должна быть выше ингибирующей активности 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоты.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложено применение соединения формулы (I)



где X представляет собой F, Cl, Br или I;

R¹ представляет собой CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ или C₃H₅R³R⁴;

R² представляет собой H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ или C₂H₃R³R⁴; и

R³ и R⁴ независимо представляют собой X, OH или NH₂,

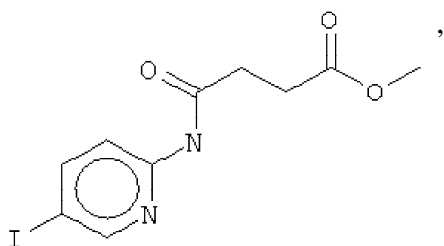
для обработки растений, в частности для увеличения роста растений, повышения урожайности и/или обеспечения устойчивости к стрессу.

В соединениях, где R¹ представляет собой пропильный остаток (т.е. соединение представляет собой пропиловый эфир), C₃H₇, C₃H₆R³ или C₃H₅R³R⁴ могут быть присоединены через атом O к карбонилу посредством крайних атомов C (н-пропил) или посредством центрального атома C (изопропил).

Согласно настоящему изобретению предложены варианты эфиров 4-[(5-бром-2-

пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоты, образованные небольшими алифатическими спиртами, возможно содержащими в качестве заместителей галоген, ОН или NH₂. Представители данных вариантов эфиров 4-[(5-бром-2-
 5 пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоты (R1=H) согласно настоящему изобретению обладают улучшенными физико-химическими свойствами для введения растениям (обработка и поглощение *in vivo* растениями или клетками растений). С помощью настоящего изобретения может быть показано, что по меньшей мере некоторые члены данной группы неожиданно продемонстрировали проявление
 10 улучшенной ингибирующей активности *in vivo* (т.е. во время введения растениям или клеткам растений) в отношении киназ, включенных в передачу сигнала brassinosteroidов, по сравнению с 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислотой.

В частности, соединение, имеющее формулу (II)



а именно, метиловый эфир 4-[(5-йодпирид-2-ил)амино]-4-оксобутановой кислоты, продемонстрировало значительно улучшенное действие *in vivo* по сравнению с 4-[(5-
 25 бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислотой. Cl- и Br-варианты формулы (II) также являются в частности предпочтительными. Другое предпочтительное соединение представляет собой этилатную форму формулы (I), то есть соединение, где R¹ представляет собой C₂H₅ и R² представляет собой H. В данной этилатной
 30 форме I-, Br- и Cl-соединение является предпочтительным.

Соединения согласно настоящему изобретению представляют собой миметики brassinosteroidов, которые могут быть использованы в технологии выращивания растений, например, для увеличения роста растений, устойчивости к биотическому
 35 и/или абиотическому стрессу или урожайности. С помощью настоящего изобретения можно повышать урожай биомассы.

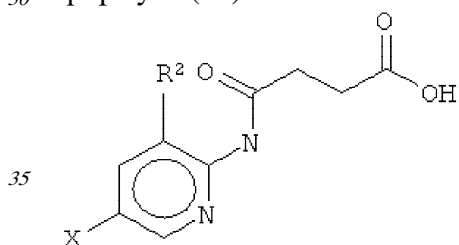
Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции для увеличения роста растений и/или урожайности, содержащей эффективное количество соединения согласно формуле (I) или (II). Указанное «эффективное количество» может быть легко
 40 установлено специалистом в данной области техники путем применения лабораторной модели к внелабораторной обработке. Соединение согласно настоящему изобретению может быть использовано в эффективной концентрации в зависимости от условий в соответствующей области. Подходящие концентрации могут находиться в диапазоне
 45 (мкмоль/л) от низкой до средней, например, от 1 до 500 мкмоль/л, предпочтительно от 5 до 100 мкмоль/л. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть растворены в органических растворителях, подходящих и разрешенных в технологии выращивания растений и сельском хозяйстве, предпочтительно в ДМСО или этаноле, и разбавлены до необходимой концентрации водой или водными растворами буферов
 50 и/или способствующих росту растений соединений, и/или средств защиты растений.

В соответствии с настоящим изобретением композицию согласно настоящему изобретению применяют для обработки растений. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации, соединения формулы (I) или (II) применяют

в качестве гербицидов. В связи с тем, что применение для стимуляции роста растений, как правило, осуществляют в диапазоне концентраций 1-10 мкМ или даже ниже, применение в качестве гербицида предпочтительно осуществляют в концентрациях, равных 50 мкМ или больше, например, 50-500 мкМ.

5 Настоящее изобретение также относится к способу получения соединения согласно формуле (II), в котором 2-амино-5-йодпиридин подвергают реакции с метилсукцинилгалогенидом, предпочтительно метилсукцинилхлоридом. 2-амино-5-йодпиридин растворяют в подходящем растворителе, предпочтительно
10 тетрагидрофуране, также содержащем четвертичный амин, предпочтительно триэтиламин (предпочтительно в молярном избытке (в частности 10-40%) по сравнению с 2-амино-5-йодпиридином). Затем метилсукцинилгалогенид (предпочтительно в том же растворителе, что и 2-амино-5-йодпиридин) добавляют (предпочтительно в небольшом молярном избытке (в частности 2-10%)) таким
15 образом, чтобы температура не поднималась выше 50°C, предпочтительно не выше 45°C, в частности не выше 40°C. Затем реакционную смесь можно дополнительно перемешивать в течение 5-60 минут при температуре 20-40°C, в частности при комнатной температуре (25°C). Затем добавляют воду и снижают рН (предпочтительно путем добавления соляной кислоты) до рН ниже 6,5, в частности до
20 примерно 6. Затем продукт может быть экстрагирован подходящим растворителем для экстракции, например, диэтиловым эфиром, и промыт (например, разбавленной слабой кислотой, такой как 1% уксусная кислота). Перед выпариванием эфира при пониженном давлении остаточная вода может быть удалена гигроскопическими
25 веществами, такими как безводный сульфат натрия. Перекристаллизация может быть выполнена, например из 95% этанола или толуола с получением почти белого продукта.

Настоящее изобретение также относится к способу получения соединения согласно формуле (III)



и его последующей этерификации или алкилированию с получением соединения согласно формуле (II) (X представляет собой I и R² представляет собой H). Данный способ согласно настоящему изобретению отличается тем, что 2-амино-5-йодпиридин подвергают реакции с янтарным ангидридом с получением соединения, имеющего формулу (III). Карбоксильная группа данного соединения может быть затем этерифицирована или алкилирована с получением соединения, имеющего формулу (II).

45 Более подробно, для получения соединения согласно формуле (III) 2-амино-5-йодпиридин растворяют в подходящем растворителе, предпочтительно тетрагидрофуране. Затем янтарный ангидрид (предпочтительно в том же растворителе, что и 2-амино-5-йодпиридин) добавляют (предпочтительно в молярном
50 избытке (в частности 10-40% избытке) по сравнению с 2-амино-5-йодпиридином) и смесь нагревают в колбе с обратным холодильником в течение подходящего количества времени, чтобы реакция прошла в необходимой степени, предпочтительно в течение 30 минут - 5 часов, более предпочтительно в течение 1-4 часов, в частности 2

часов. Неочищенный продукт может быть получен путем охлаждения реакционной смеси, например, до 4°C в течение нескольких часов (например, 1-10 часов).

Неочищенный продукт может быть перекристаллизован, например, из 95% этанола.

5 Затем свободная кислота согласно формуле (III) может быть алкилирована с использованием метилгалогенида, диметилсульфата или diazometана или этерифицирована $\text{CH}_3\text{-OH}$ с получением вещества согласно формуле (II).

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения 2-амино-5-йодпиридин подвергают взаимодействию с метилсукцинилхлоридом.

10 Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и фигурами.

Фиг.1: Некоторые пиридиламинопроизводные ингибируют киназы ASK., *in vitro*. Гибридные белки GST-ASK инкубировали с МБР (основной белок миелина) в качестве субстрата и $\gamma\text{-}[32\text{P}]\text{-ATP}$ в качестве косубстрата в отсутствии (-) или присутствии различных производных (цифры соответствуют Таблице 1). Соединения 1-9 (левый блок) отличаются алифатической боковой цепью. Влияние положения гетероциклического азота тестировали с помощью соединений 3 и 11 (средний блок; показанная молекулярная структура представляет собой соединение 11). Правый блок показывает влияние водородного заместителя пиридинового кольца. Указанные соединения использовали в концентрации, равной 10 мкМ. Белки разделяли путем SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и введенный радиоактивный фосфат детектировали с использованием фосфорного экрана с длительным послесвечением (storage phosphor imager screen).

25 Фиг.2: Соединение 15 демонстрирует самую высокую активность. GST-BIN2 инкубировали с МБР и $\gamma\text{-}[32\text{P}]\text{-ATP}$ в отсутствии или присутствии соединений 3, 14 и 15 в концентрации, равной 10 мкМ. Белки разделяли путем SDS-PAGE и фосфорилирование МБР количественно определяли с использованием фосфорного экрана с длительным послесвечением. Остаточную активность выражают в % от контроля. Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали по данным четырех независимых анализов.

Фиг.3: Действия на фенотип мутантов brassinosterоидов. 7-дневные всходы мутанта *срд* синтеза brassinosterоидов и мутанта *bril-1* передачи сигнала переносили в среду $1/2$ MS, содержащую 1 мкМ эпи-brassinolid (Epi-BL) или соединения 10 и 15 в концентрации, равной 30 мкМ., и инкубировали в течение 7 дней в условиях длинного дня. Все изображения получали с одинаковым увеличением. Полоса представляет собой 1 мм.

40 Фиг.4: Соединения 10 и 15 представляют собой сильные ингибиторы *in vivo*. Протопласты *A. thaliana* котрансформировали с помощью экспрессионных конструкций BZR1-CFP и Мус-меченых ASK ζ и подвергали воздействию увеличивающихся концентраций соединений 10 и 15. BES1-CFP и ASK ζ -Мус детектировали путем вестерн-блоттинга (western blot analysis) с использованием поликлональных антител анти-GFP и моноклональных антител анти-Мус соответственно. Окрашивание Кумасси R250 представлено в качестве контроля нагрузки. В зависимости от активности киназы ASK ζ BZR1-CFP можно наблюдать в фосфорилированной или нефосфорилированной форме (показано стрелками).

50 Применение ингибитора не влияло на соотношение двух полос ASK ζ -Мус, обозначающих посттрансляционную модификацию данного белка.

Фиг.5: Этерифицированные соединения быстро гидролизуются в растениях. Всходы *A. thaliana* пропитывали средой $1/2$ MS, содержащей 50 мкМ соединения 10.

Контрольные образцы отбирали перед пропитыванием (А) и анализировали путем ВЭЖХ. Продукт биотрансформации (обозначенный Р) соединения 10 можно обнаружить по истечении 15 минут (В). Хроматограмма смеси соединений 10, 15 и 17 (меченых С10, С 15 и С17 соответственно) представлена для сравнения (С). Небольшие графики, помещенные на хроматограммы, демонстрируют УФ-спектры пиков в диапазоне 220-360 нм. mAu, милли-единицы поглощения, зафиксированные при 250 нм.

Фиг.6: Метилирование увеличивает тканевую проницаемость. Всходы *A. thaliana* инкубировали в 50 мкМ растворах соединений 10 и 15 в среде $1/2$ MS. Образцы отбирали после указанного времени и уровни *in situ* соединения 15 анализировали путем ВЭЖХ. Сплошная линия отображает результаты для растений, инкубированных с соединением 10, а пунктирная линия - результаты для соединения 15. Средние и стандартные отклонения рассчитывали по данным трех независимых анализов.

ПРИМЕРЫ

Важное значение длины и пространственной конфигурации алифатической боковой цепи, а также положения гетероциклического азота выявляли путем синтеза ряда производных, обладающих структурой, схожей с 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислотой, и варьирования длины алифатической боковой цепи от двух до шести атомов углерода. Более того, пространственную структуру модифицировали путем введения двойной связи. Для получения более активного ингибитора получали производные, содержащие фтор-, хлор-, бром- и йод-заместители в положении 5 пиридинового кольца. Синтезированные соединения тестировали *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, определяли клеточную проницаемость выбранных соединений.

Материалы и способы


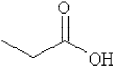
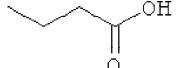
Химические вещества

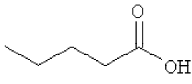
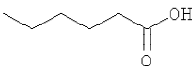
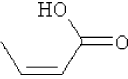
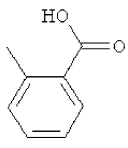
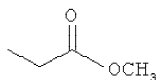
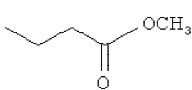
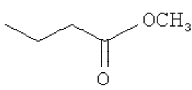
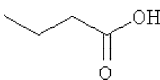
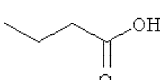
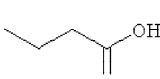
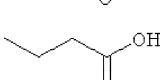
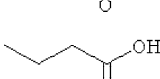
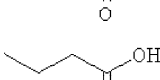
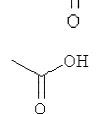
Химические вещества, используемые для синтеза соединений, приобретали в компании "Fluka" (Букс, Швейцария) или "Aldrich" (Штайнхайм, Германия).

Использовали растворители для ВЭЖХ и ТСХ фирмы "Roth" (Карлсруэ, Германия).

Синтез

Соединения для реакции и выходы продуктов приведены в Таблице 1.

Соединения, синтезированные и проанализированные на предмет биологической активности		Таблица 1						
		Соединения 1-10, 2-17		Соединение 11				
№	Соединения для реакции	Способ	X	R	Выход	t_R^a	$\lambda_1; \lambda_2^b$	pKa ^c
1	2-Амино-5-хлорпиридин, Метилноксалилхлорид	D	Cl		39%	5,6	254; 291	
2	2-Амино-5-хлорпиридин, Метилмалонилхлорид	D	Cl		30%	5,9	245; 287	
3	2-Амино-5-хлорпиридин Янтарный ангидрид	A	Cl		54%	8,6	245; 287	5,4

4	2-Амино-5-хлорпиридин, Глутаровый ангидрид	A	Cl		71%	9,9	245; 288
5	2-Амино-5-хлорпиридин, Метиладипоилхлорид	D	Cl		20%	11,5	245; 288
6	2-Амино-5-хлорпиридин, Малениновый ангидрид	A	Cl		22%	7,5	222; 298
10	2-Амино-5-хлорпиридин, Фталевый ангидрид	A	Cl		63%	9,1	249; 289
15	2-Амино-5-хлорпиридин, Метилмалонилхлорид	C	Cl		41%	14,6	
9	2-Амино-5-хлорпиридин, Метилсукцинилхлорид	C	Cl		33%	15,7	245; 288
20	2-Амино-5-йодпиридин, Метилсукцинилхлорид	C	I		30%	17,8	252; 293
11	5-Амино-2-хлорпиридин, Янтарный ангидрид	A	Cl		69%	6,7	248; 284
25	2-Аминопиридин, Янтарный ангидрид	A	H		74%	4,2	235; 276 4,9
13	2-Амино-5-фторпиридин, Янтарный ангидрид	A	F		68%	5,7	235; 283
30	2-Амино-5-бромпиридин, Янтарный ангидрид	A	Br		65%	9,6	247; 289 5,6
15 ^d	2-Амино-5-йодпиридин, Янтарный ангидрид	A	I		35%	10,7	252; 292 5,8
35	2-Амино-5-нитропиридин, Янтарный ангидрид	B	NO ₂		29%	9,1	221; 350
17	2-Амино-5-йодпиридин, Янтарный ангидрид	D	I		28%	17,9	253; 291

40

^a Время удерживания в минутах.

^b Максимумы поглощения в нм (при pH 4,8)

^c pK_a (отрицательны и десятичный логарифм константы диссоциации) карбоновой кислоты определяли в 50% (в объемном отношении) метаноле.

45

^d Соединения 10, 14 и 15 также называются метиловым эфиром 4-[(5-йодпирид-2-ил)амино]-4-оксобутановой кислоты, 4-[(5-бромпирид-2-ил)амино]-4-оксобутановой кислотой и 4-[(5-йодпирид-2-ил)амино]-4-оксобутановой кислотой, соответственно.

50

Способ А: Раствор 25 мМ ангидрида дикарбоновой кислоты, растворенного в 15 мл тетрагидрофурана (10 мл для фталевого ангидрида), помещали в круглодонную колбу, оснащенную обратным холодильником, и добавляли 20 мМ амина, растворенного в 10 мл тетрагидрофурана. Смесь нагревали в колбе с обратным холодильником в течение двух часов. Продукт начинал кристаллизоваться в конце реакции. Кристаллизацию завершали путем охлаждения до 4°C в течение нескольких

часов. Неочищенный продукт фильтровали с отсасыванием и перекристаллизовывали из 95% этанола, за исключением производного фталиевой кислоты, которое перекристаллизовывали из 80% ацетонитрила.

5 Способ В: Раствор 20 мМ 2-амино-5-нитропиридина, растворенного в 30 мл тетрагидрофурана, помещали в круглодонную колбу и добавляли 25 мМ твердого янтарного ангидрида. К колбе присоединяли обратный холодильник и нагревали смесь в мягких условиях кипения в течение двух часов. Затем реакционную смесь охлаждали до -20°C в течение нескольких дней. Неочищенный продукт фильтровали с
10 отсасыванием и перекристаллизовывали из горячей воды.

 Способ С: 20 мМ амина растворяли в смеси 40 мл тетрагидрофурана и 3,5 мл (25 мМ) триэтиламина и помещали в трехгорлую круглодонную колбу, оснащенную обратным холодильником, капельной воронкой и термометром. Реакционную смесь смешивали путем магнитного перемешивания. Через капельную воронку медленно
15 добавляли раствор 21 мМ хлорангидрида, растворенного в 10 мл тетрагидрофурана, с такой скоростью, чтобы температура не была выше 40°C. После добавления всего хлорида реакционную смесь перемешивали в течение еще 15 минут при комнатной температуре. Затем указанную смесь добавляли к 200 мл холодной воды и рН
20 доводили до 6 разбавленной соляной кислотой. Продукт три раза экстрагировали 50 мл диэтилэфира (каждый раз) и смешанные эфирные экстракты промывали 50 мл 1% уксусной кислоты. Перед выпариванием эфира при пониженном давлении остаточную воду удаляли безводным сульфатом натрия. Желтоватый остаток перекристаллизовывали из 95% этанола (хлорпроизводные) или толуола
25 (йодпроизводное) с получением почти белого продукта.

 Способ D: 21 мМ хлорангидрида растворяли в 10 мл тетрагидрофурана и добавляли к смеси 20 мМ 2-амино-5-хлорпиридина, 3.5 мл (25 мМ) триэтиламина и 40 мл тетрагидрофурана, как описано в способе С. Смесь перемешивали в течение 15
30 минут перед фильтрацией с удалением гидрохлорида триэтиламина. Твердое вещество промывали 10 мл тетрагидрофурана и смешанные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. В случае оксалилпроизводного остаток растворяли в 90 мл горячего 95% этанола и горячий раствор фильтровали. Смесь перемешивали и добавляли 40 мМ КОН, растворенного в 10 мл воды, с такой скоростью, чтобы
35 температура не была выше 40 С. Реакцию завершали путем перемешивания в течение еще 10 минут. Продукт отделялся в виде белой соли калия, которую собирали путем отсасывания. Остаток растворяли в 100 мл (йодпроизводное: 250 мл) горячей воды и фильтровали. К горячему фильтрату добавляли соляную кислоту до рН, равного 2.
40 Продукт отделялся в виде свободной кислоты во время инкубации при 4°C в течение ночи. Затем продукт очищали путем перекристаллизации из 95% этанола.

 В случае малонил- и адипоилпроизводных остаток растворяли в 200 мл MeOH и фильтровали. Раствор помещали в трехгорлую круглодонную колбу, оснащенную обратным холодильником, капельной воронкой и термометром, и нагревали до 50°C.
45 При перемешивании смеси через капельную воронку быстро добавляли 40 мМ КОН, растворенного в 40 мл воды, и температуру поддерживали при 50°C. Реакцию завершали путем перемешивания в течение еще 10 минут при той же температуре. Избыток КОН нейтрализовали путем добавления 40 мМ NH₄Cl, растворенного в 10
50 мл воды. Большую часть растворителя удаляли при пониженном давлении, а остаток растворяли в воде (примерно 200 мл) и фильтровали. К прозрачному фильтрату добавляли муравьиную кислоту до рН, равного 3. Продукт отделялся в виде белых кристаллов во время инкубации при 4°C в течение ночи. Малонил- и

адипоилпроизводные очищали путем перекристаллизации из 95% или 50% этанола соответственно.

Анализ чистоты синтезированных соединений

5 Тонкослойная хроматография (ТСХ): указанные соединения растворяли в этаноле и наносили в виде пятен на пластины с предварительно нанесенным силикагелем 60 F254 (Merck, Дармштадт, Германия). Пластины оставляли в смеси
 этилацетат/петролейный эфир/уксусная кислота/вода = 100/60/1/1, чтобы растворитель поднялся. Гашение флюоресценции наблюдали при облучении пластины
 10 коротковолновым УФ (254 нм). Некоторые соединения демонстрировали автофлюоресценцию, которую наблюдали при средневолновом УФ-облучении (302 нм).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ): Система ВЭЖХ включала насос Dionex P680, автодозатор ASI-100 и фотодиодный матричный
 15 детектор PDA-100. Систему оснащали колонкой Macherey-Nagel 250 мм × 4 мм Nucleosil 100-5 C 18, которую предварял 2 мкм встроенный фильтр Valco. Постоянную скорость потока, равную 1 мл/мин, поддерживали градиентом растворителя А (20 мМ уксусная кислота, доведенная до рН, равного 4,8, с
 помощью NaOH в 15% ацетонитриле) и растворителя В (20 мМ уксусная кислота,
 20 доведенная до рН, равного 4,8, с помощью NaOH в 60% ацетонитриле). Элюирование начинали изократическим потоком растворителя А в течение 1 минуты. Затем концентрацию растворителя В линейно повышали до 100% в течение 19 минут и поддерживали изократической в течение еще 2 минут перед ее уменьшением до 0% в течение одной минуты. Колонку уравнивали растворителем А в течение 5 минут
 25 перед введением следующего образца. УФ-спектры регистрировали от 220 до 400 нм с интервалами 1 нм. Для количественного определения использовали поглощение при 250 нм с шириной полосы 10 нм.

Определение значений рКа

30 Взвешивали 50-100 мг соединения и растворяли в 50 мл 50% (в объемном отношении) метанола. Кривую титрования с использованием 50 мМ NaOH в качестве стандартного раствора снимали с помощью рН-метра Greisinger electronics GPHR 1400A.

Точку эквивалентности определяли методом отношения разностей ($\Delta\text{pH}/\Delta V_{\text{NaOH}}$) и рКа, полученной из кривой титрования при 50% нейтрализации.

35 Анализы киназной активности *in vitro* и *in vivo* ASK экспрессировали в виде GST-гибридных белков в BL21 E.coli. Анализы киназной активности *in vitro* осуществляли путем инкубации 50 нг GST-гибридного белка, 10 мкг основного миелинового белка (MBP; Sigma, St Louis, MO) в качестве субстрата и 0,15 МБк γ -[32P]-АТФ в качестве
 40 косубстрата при 25°C в течение 30 минут. Реакционный буфер содержал: 20 мМ HEPES рН 7,4, 15 мМ MgCl₂, 5 мМ EGTA и 1 мМ DTT. Для первоначальных экспериментов включали охлажденный АТФ в концентрациях до 3 мМ. Продукты реакции разделяли путем SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и количество радиоактивности, введенное в MBP,
 45 количественно определяли с использованием фосфорного экрана storage phosphor imager screen Amersham и Molecular Imager FX Biorad. Киназную активность *in vivo* детектировали путем анализов фосфорилирования на замедление подвижности в геле с использованием BZR1-CFP в качестве субстрата.

50 Физиологические тесты

Всходы CoЮ или bril-1 *Arabidopsis thaliana* выращивали *in vitro* в планшетах 1/2 MS, содержащих 1% сахарозу в ростовой камере в условиях длинного дня (16 часов свет с 50 мкЕ·м⁻²·с⁻¹, 8 часов темнота) в течение 7 дней. Затем их переносили в планшеты с

добавлением ингибиторов в разных концентрациях и спустя 7 дней наблюдали действия на фенотип.

Анализ растительных экстрактов методом ВЭЖХ

5 Двухнедельные всходы *CoIO A. thaliana* пропитывали в вакууме $1/2$ MS или $1/2$ MS, содержащей 100 мкМ соединения 10, как описано ранее (Rozhon et al., 2005). Образцы отбирали через 15 минут и через 48 часов, промывали водой и растирали в жидком азоте в мелкодисперсный порошок. Взвешивали 100 мг порошка в реакционную пробирку и добавляли 1 мл буфера для экстракции (20 мМ TRIS/HCl pH 6,8, 10 растворенный в 20% ацетонитриле). После инкубации в течение 30 минут в шейкере, настроенном на 800 об/мин, смесь центрифугировали и надосадочную жидкость фильтровали через 0.2 мкм фильтр. Экстракты анализировали путем ВЭЖХ с теми же параметрами, что указаны выше.

15 Анализ клеточной проницаемости

Двухнедельные всходы *CoIO A. thaliana* переносили в среду $1/2$ MS, содержащую 50 мкМ ингибитора. После указанных моментов времени образцы удаляли, промывали водой, сушили фильтровальной бумагой и замораживали в жидком азоте. Для анализа растительный материал растирали в мелкодисперсный порошок в ступке, 20 предварительно охлажденной жидким азотом. Приблизительно 100 мг порошка взвешивали в 1,5 мл реакционные пробирки и добавляли 1 мл 20 мМ TRIS/HCl pH 9,0. В качестве внутреннего стандарта добавляли 50 мкл 200 мкМ реакционной массы соединения 4. Экстракцию осуществляли при 80°C в течение 30 минут в 25 термомиксере Eppendorf, настроенном на 800 об/мин. Экстракт центрифугировали в течение 5 минут при 15000 g и собирали прозрачную надосадочную жидкость. Прозрачный раствор подкисляли путем добавления 25 мкл 4М фосфорной кислоты и центрифугировали в течение двух минут при 15000 g. Надосадочную жидкость сразу же загружали в 100 мг РН картридж для твердофазной экстракции (Varian, Lake Forest, 30 СА), кондиционированный 1 мл ацетонитрила и два раза 1 мл 100 мМ фосфорной кислоты. Колонки промывали 1 мл 100 мМ фосфорной кислоты и сушили путем использования вакуума в течение 1 минуты. Затем проводили элюирование 1 мл 100 мМ TRIS/HCl pH 9,0, содержащего 5% ацетонитрил. Элюат подкисляли путем 35 добавления 15 мкл 4М фосфорной кислоты и использовали для ВЭЖХ, как описано выше.

Результаты

Синтез

40 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановую кислоту и другие производные получали путем образования амидов из замещенных аминопиридинов и ангидридов циклических карбоновых кислот или хлоридов метилэфиров дикарбоновых кислот (Таблица 1). В последнем случае метальную группу впоследствии удаляли путем щелочного гидролиза, если необходимо. Чистоту подтверждали методами ТСХ 45 и ВЭЖХ. На пластинах ТСХ с поднявшимся растворителем можно было наблюдать только одно пятно и пик необходимого соединения представлял собой по меньшей мере 95% от общей площади всех пиков на хроматограмме ВЭЖХ.

Ингибирование ASK in vitro

50 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота представляет собой сильный ингибитор ASK группы I и группы II. ASK θ , ASK группы III, умеренно ингибируется. Вторая киназа данного класса, ASK β , и киназа группы IV ASK δ не ингибируются. Представителей всех групп экспрессировали в качестве рекомбинантных гибридных белков GST в *E.coli*. Активность синтезированных

соединений в отношении выбранных ASK анализировали путем анализов киназной активности *in vitro* с использованием MBP (основного миелинового белка) в качестве субстрата и γ -[32P]-АТФ в качестве косубстрата (Фиг.1).

5 Соединения 1-5 синтезировали для исследования эффекта от изменения длины алифатической боковой цепи. Самое активное соединение, №3, содержало цепь, состоящую из 4 атомов углерода (Фиг.1). Глутарильные (№4, 5 атомов углерода) и адипоильные (№5, 4 атома углерода) производные обладали значительно более низкой активностью, в то время как более короткие производные (№1 и 2, 2 или 3
10 атома углерода соответственно) почти не оказывали действия. В результате введения двойной связи в боковую цепь оптимальной длины активность полностью исчезала (Фиг.1, соединение б). Это означает, что пространственная конфигурация имеет крайне важное значение. Для исследования того, имеет ли карбоксильная группа алифатической цепи ключевое значение для активности или достаточно оксогруппы,
15 включали соединения 9 и 10, представляющие собой метилированные варианты соединений 3 и 15 соответственно. Кроме того, тестировали соединение 8, которое представляет собой структурный изомер соединения 3. Как показано на Фиг.1, метилированные варианты демонстрировали существенно сниженные ингибирующие
20 эффекты, тем самым подтверждая важное значение терминальной карбоксильной группы.

После идентификации оптимальной боковой цепи более подробно исследовали гетероциклическое кольцо. Оба соединения 3 и 11 содержат амидосукцинильную боковую цепь, но отличаются положением гетероциклического азота. Исследования
25 киназной активности показали, что соединение 3 является более активным (Фиг.1), демонстрируя, что гетероциклический азот должен находиться рядом с положением, несущим заместитель амидоянтарной кислоты. Предшествующие данные указывали на то, что заместитель бром в положении 5 пиридинового кольца имеет ключевое
30 значение для биологической активности 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоты. Для тестирования влияния других заместителей синтезировали соединения. 12-16. Как показано на Фиг.1, хлор-, бром- и особенно йодпроизводные проявили высокую активность. Данная степень активности может
35 быть подтверждена путем количественного определения остаточной киназной активности BIN2 (Фиг.2). В отличие от этого, фторсоединение проявляло очень низкую активность, а незамещенные производные и нитропроизводные были неактивными.

Все исследуемые соединения обладали схожей специфичностью к ASK. Активные
40 производные сильно ингибировали ASK α , BIN2 и ASK ζ , в то время как ASK θ была лишь умеренно ингибирована. Действие тестируемых соединений на ASK β и ASK δ было незначительным.

Ингибирование ASK *in vivo*

Отрицательная регуляция активности ASK имеет ключевое значение для передачи
45 сигнала brassinостероидов. ASK конститутивно активны в мутантах *cpd* и *bril-1*, являющихся «дефектными» в биосинтезе или передачи сигнала brassinостероидов соответственно. Это приводит к тому, что растения значительно отстают в росте и имеют темно-зеленые закрученные вниз листья и укороченные гипокотили.
50 Применение эпибрассинолида, синтетического brassinостероида, «спасает» *cpd*, но не *bril-1*, в то время как 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота «спасает» обоих мутантов. Для скрининга активности *in vivo* мутанты *cpd* и *bril-1* переносили в среды, содержащие производные 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-

оксобутановой кислоты в концентрации 30 мкМ. Всходы, обработанные активными соединениями, демонстрировали широкие листья, увеличенные длины гипокотилей и имели светло-зеленый цвет. Активность в отношении «спасения» фенотипа коррелировала с результатами анализа *in vitro*. Однако интерес представляет тот факт, что соединение 10 было высокоактивным *in vivo*, но демонстрировало небольшую активность *in vitro* (Фиг.3).

По причине данного неожиданного результата влияние ингибирования на активнорть ASK *in vivo* анализировали прямым способом. Было показано, что некоторые ASK фосфорилируют факторы транскрипции BZR1, BES1 и BEN2 *in vivo*. Это приводит к сдвигу электрофоретической подвижности данных факторов транскрипции, что позволяет детектировать киназную активность *in vivo*. Протопласты *A.thaliana* котрансформировали с конструкциями CFP-меченого BZR1 и Мус-меченой ASK ζ . Указанные два белка были выбраны, поскольку они хорошо экспрессированны в системе протопластов. Трансформированные протопласты инкубировали с различными концентрациями соединений 10 и 15, а затем BZR1-CFP и ASK ζ -Мус анализировали путем вестерн-блоттинга. В соответствии с фенотипическими тестами этерифицированное соединение 10 было высокоактивным как его аналог 15 в виде свободной кислоты (Фиг.4). Схожие результаты также получали для пары 3 и 9.

Для исследования данных противоречивых результатов изучали преобразования соединения 10 *t vivo*. Всходы пропитывали соединением 10, а затем растительные экстракты анализировали методом ВЭЖХ. Можно было наблюдать только следы соединения 10, но появился новый пик, обозначенный P (Фиг.5A и 5B). Данный пик можно идентифицировать по времени удерживания, равному 10,7 минут, и его УФ-спектру с максимумами поглощения при 252 и 292 нм, как соединение 15 (Фиг.5B и 5C). Следовательно, соединение 10 нестабильно *t vivo*, но легко превращается в высокоактивное соединение 15, что объясняет разную активность соединения 10 *in vitro* и *in vivo*. Схожие результаты получали для пары 3 и 9.

Тканевая проницаемость

Клеточная проницаемость вещества представляет собой имеющую важное значение характеристику, влияющую на его активность *in vivo*. Поглощение соединений 10 и 15 растениями определяли путем обработки всходов растворами данных соединений и последующим количественным определением интернализированных концентраций ингибитора (Фиг.6). Поскольку соединение 10 быстро превращается в соединение 15, измеряли только концентрацию *in situ* соединения 15. Концентрации *in situ* обоих соединений увеличивались в первые три часа, а затем достигали плато. Важно отметить, что внутренние концентрации растений превышали концентрации среды. В то время как 50 мкМ присутствовали в среде, концентрации *in situ*, равные примерно 90 мкМ, можно было измерить в случае соединения 15 и до 190 мкМ в случае использования соединения 10. Следовательно, метилированное соединение демонстрировало более высокую тканевую проницаемость и достигало более высокой концентрации в растениях.

В последние годы был совершен огромный прогресс в понимании передачи сигнала brassinостероидов в *Arabidopsis thaliana* путем анализа мутантов. На сегодняшний день известны три рецептора и один корецептор brassinостероидов. По-видимому, по меньшей мере четыре ASK включены в фосфорилирование шести BES1/BZR1-подобных факторов транскрипции и четыре фосфатазы способны превращать их обратно в нефосфорилированную форму. Все указанные белки представляют собой

потенциальные мишени для ингибиторов. Заметным преимуществом ингибиторов по сравнению с мутантами является их непосредственная применимость к различным генетическим средам и видам. Кроме того, отдельные мутанты часто демонстрируют отсутствие фенотипов или слабые фенотипы вследствие функциональной избыточности. Поскольку гомологичные белки часто подвергаются прицельному воздействию этих же соединений, функциональную избыточность можно преодолеть путем исследований ингибиторов.

Доступен ряд ингибиторов для GSK-3 α и GSK-3 β , гомологов ASK человека. Однако попытки использовать данные соединения для GSK-3/Shaggy-подобных киназ растений не увенчались успехом. В скрининге химической генетики 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановую кислоту в последнее время идентифицировали как первое вещество, которое специфически препятствует передаче сигналов brassinosterоидов. Генетические и биохимические подходы выявили, что 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота воздействует на передачу сигналов brassinosterоидов путем ингибирования ASK. GSK-3/Shaggy-подобные киназы представляют собой ключевые регуляторы передачи сигнала гормонов и модулируют устойчивость к стрессу; крайне необходимо лучшее понимание действия 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоты.

Для решения данного вопроса и идентификации ингибиторов, обладающих улучшенной активностью, синтезировали ряд соединений, имеющих структуры, аналогичные 4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановой кислоте, и исследовали их ингибирующую активность в отношении GSK-3/Shaggy-подобных киназ *in vitro* и *in vivo*. Более того, исследовали фенотипическую реакцию растений на данные соединения. Во-первых, анализировали влияние длины алифатической боковой цепи, содержащей карбоксильную группу. Поскольку предварительные результаты показали, что хлорпроизводное может быть в некоторой степени более активным по сравнению с бромпроизводным, 2-амино-5-хлорипиридин использовали для синтеза группы соединений, отличающихся только длиной алифатической боковой цепи. Анализы киназной активности *in vitro* выявили, что ингибирующая активность данных соединений была самой высокой в случае боковой цепи, состоящей из 4 атомов углерода. Более того, пространственная конфигурация имела ключевое значение. Введение цис-двойной связи в боковую цепь, состоящую из 4 атомов углерода, оптимально числа, приводило к неактивному соединению (№6). Цис-двойная связь вызывает изгиб в алифатической цепи, приводящий к другому расположению терминальной карбоксильной группы. Это и результаты соединений, обладающих разными длинами боковых цепей, означают, что карбоксильная группа должна обладать точной геометрической конфигурацией относительно гетероциклического кольца для взаимодействия с ASK.

Доказательство значимости терминальной карбоксильной группы изначально исходит из производного, содержащего незамещенную боковую цепь. Однако это не исключает того, что может быть достаточно этерифицированной карбоксильной группы, которая по-прежнему может участвовать в водородных взаимодействиях. Соответственно, включали соединения 8, 9 и 10, представляющие собой метилированные варианты соединений 2, 3 и 15 соответственно. Все три вещества демонстрировали небольшую активность или отсутствие активности *in vitro* по отношению к тестируемым ASK, тем самым подтверждая, что терминальная карбоксильная группа должна присутствовать в алифатической цепи. Соединения 9 и 10 *in vivo* были активными, так как метильная группа быстро отщеплялась, вероятно

посредством эстераз, и таким образом карбоксильная группа восстанавливалась. Поскольку карбоксильная группа алифатической цепи заряжена при внутриклеточном рН, она может быть вовлечена в ионные взаимодействия с ASK, например, с остатком лизина или аргинина. В качестве альтернативы она может быть включена в водородную связь. Аналогичным образом азот пиридинового кольца также может быть вовлечен в водородную связь или ионное взаимодействие с белком. Было показано, что замена пиридинового кольца на бензольное кольцо приводит к существенному снижению ингибирующей активности. Для более подробного исследования значимости гетероциклического кольца синтезировали соединение 11, отличающееся от высокоактивного соединения 3 только положением гетероциклического азота. Тесты *in vitro* выявили, что соединение 11 является неактивным, тем самым указывая на то, что гетероциклический азот должен быть расположен рядом с амидосукцинильной боковой цепью для получения сильного ингибитора. Интересно то, что результаты настоящего изобретения показали, что активность соединений возрастала с порядковым номером галогенового заместителя в положении 5 пиридинового кольца, несмотря на то, что предварительные данные указывали на противоположный эффект. Йодпроизводное (№15) обладало самой высокой активностью, в то время как фторпроизводное (№13) было наименее активным. Из-за гидрофобности данная структурная часть ингибитора может быть вовлечена в ван-дер-ваальсовы взаимодействия с киназой. Для ван-дер-ваальсовых притяжений расстояние между взаимодействующими атомами имеет ключевое значение. Они быстро снижаются при увеличении расстояний и являются эффективными только тогда, когда атомы расположены достаточно близко друг к другу. Ван-дер-ваальсов радиус, характеризующий оптимальное для взаимодействия расстояние, увеличивается с периодом в группе периодической таблицы элементов. Например, ван-дер-ваальсовы радиусы составляют 0,22 нм для атома йода и 0,14 нм для атома фтора. Помимо этого, длина ковалентной связи между углеродом пиридинового кольца и йодом также больше по сравнению с длиной связи с другими галогенами. Соответственно, структура йодпроизводного может обладать идеальными свойствами для связывания с гидрофобным карманом ASK. Кроме того, гидрофобность соединений возрастает с порядковым номером галогенового заместителя, на что указывает увеличенное время удерживания в ОФ ВЭЖХ (Таблица 1), что может дополнительно способствовать гидрофобным взаимодействиям.

Анализы тканевой проницаемости выявили, что поглощение соединений, особенно этерифицированных, происходило быстро. Интересно то, что концентрации *in situ* превышали концентрации окружающей среды в несколько раз. Это может быть объяснено значениями pK_a указанных соединений (Таблица 1). Например, значение pK_a производного 15 составляет 5,8, что означает, что при рН 5,8, рН используемой среды, 50% указанного соединения диссоциировано, а, следовательно, отрицательно заряжено, тогда как 50% недиссоциировано. При внутриклеточном рН, равном 7,4, менее 3% указанного соединения недиссоциировано. Т.к. только недиссоциированная, липофильная форма может эффективно проходить через биомембраны, соединения удерживаются в клетке и накапливаются до концентраций, превышающих концентрации окружающей среды. Данное зависимое от рН поглощение сходно с поглощением для растительного гормона ауксина, в котором управляемая рН диффузия способствует транспорту в клетку. Этерифицированные соединения, например №10, не зависят от рН, являются высоколипофильными и могут проходить

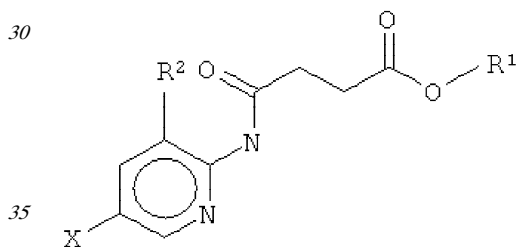
через мембраны. В клетке они быстро гидролизуются в соответствующие кислоты, которые депротонируются с образованием гидрофильного аниона. Интересно отметить, что скорость поглощения соединения 10 была примерно в два раза больше скорости поглощения соединения 15, что коррелирует с участками, способными к диффузии через мембрану. В то время как 100% соединения 10 находится в липофильной форме, только 50% соединения 15 недиссоциировано, а, следовательно, достаточно липофильно. Это может объяснить разные скорости поглощения. В совокупности, соединение 15, также называемое йод-4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота, представляло собой самое активное соединение *in vitro* и демонстрировало высокую ингибирующую активность *in vivo*. Метилированный вариант данного соединения, метилйод-4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота (соединение 10), демонстрировал очень быстрое поглощение и, следовательно, представляет собой предпочтительный ингибитор ASK для исследований *in vivo*. Известно, что некоторые GSK3/Shaggy-подобные киназы быстро активируются в ответ на стресс. Благодаря своей исключительной и быстрой клеточной проницаемости метилйод-4-[(5-бром-2-пиридинил)амино]-4-оксобутановая кислота и родственные соединения будут иметь чрезвычайно важное значение для исследования роли данного семейства киназ в ранней стрессовой передаче сигнала.

ССЫЛКИ:

Kim et al., Bioorg Med Chem 6 (1998), 1975-1982. Min et al., Bioorg Med Chem Lett 9 (1999), 425-430. Rozhon et al., Anal Bioanal Chem 382 (2005), 1620-1627. Sekimata et al., J Agric Food Chem 50 (2002), 3486-3490. Sekimata et al., Planta 213 (2001), 716-721 Vert et al., Nature 441 (2006), 96-100.

Формула изобретения

1. Применение соединения, имеющего формулу (I)



(I)

где X представляет собой F, Cl, Br или I;

R¹ представляет собой CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ или C₃H₅R³R⁴;

R² представляет собой H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ или C₂H₃R³R⁴; и

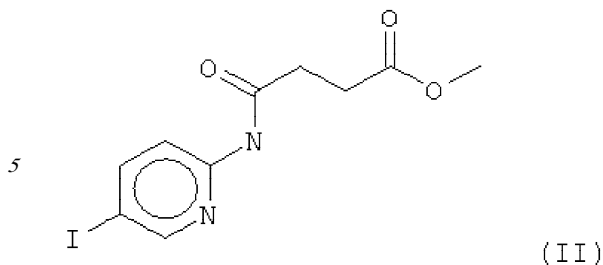
R³ и R⁴ независимо представляют собой X, OH или NH₂,

для обработки растений, в частности, для увеличения роста растений, повышения урожайности и/или обеспечения устойчивости к стрессу.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что R¹ представляет собой CH₃, R² представляет собой H и X представляет собой I.

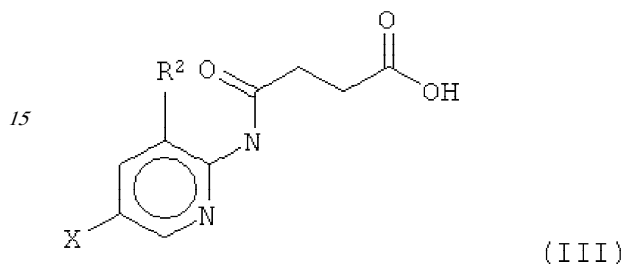
3. Композиция для увеличения роста растений и/или повышения урожайности, и/или устойчивости к стрессу, содержащая эффективное количество соединения, имеющего формулу (I), предпочтительно формулу (II).

4. Соединение, имеющее формулу (II)



10 5. Способ получения соединения по п.4, отличающийся тем, что 2-амино-5-йодпиридин подвергают реакции с метилсукцинилхлоридом.

6. Способ получения соединения, имеющего формулу (III)



20 где X представляет собой I и R² представляет собой H, отличающийся тем, что 2-амино-5-йодпиридин подвергают взаимодействию с янтарным ангидридом.

25 7. Способ получения соединения, имеющего формулу (II), в котором соединение, имеющее формулу (III), где X представляет собой I и R² представляет собой H, алкилируют метилгалогенидом, диметилсульфатом или диазометаном или этерифицируют CH₃OH.

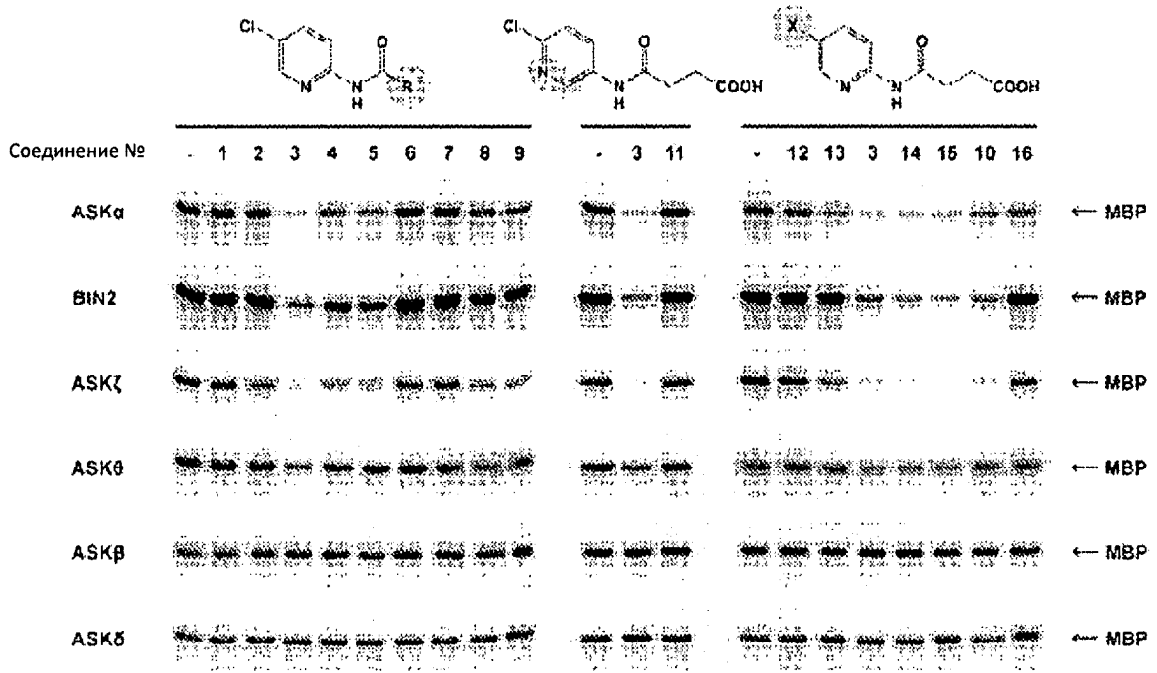
30 8. Применение соединения, имеющего формулу (I) или (II), как определено по п.1 или 4, в качестве гербицида.

35

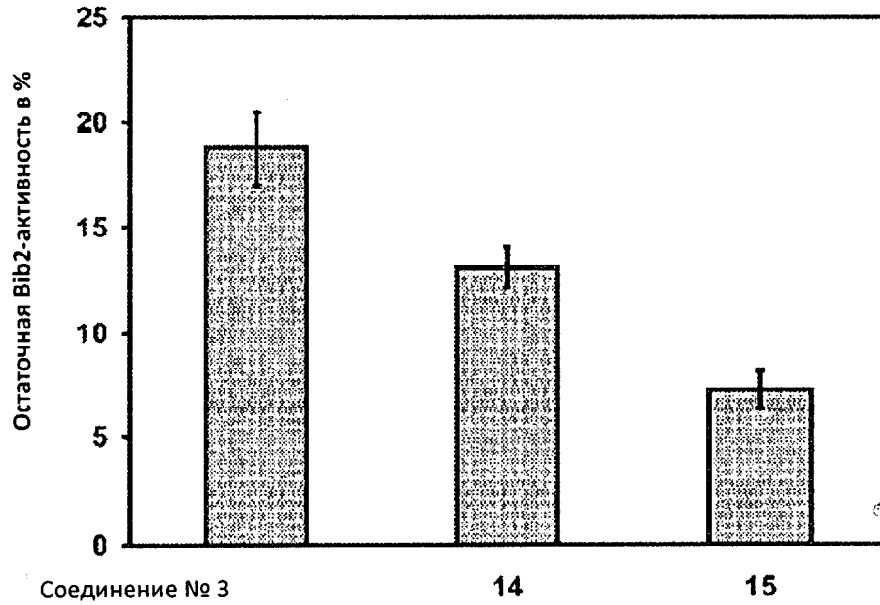
40

45

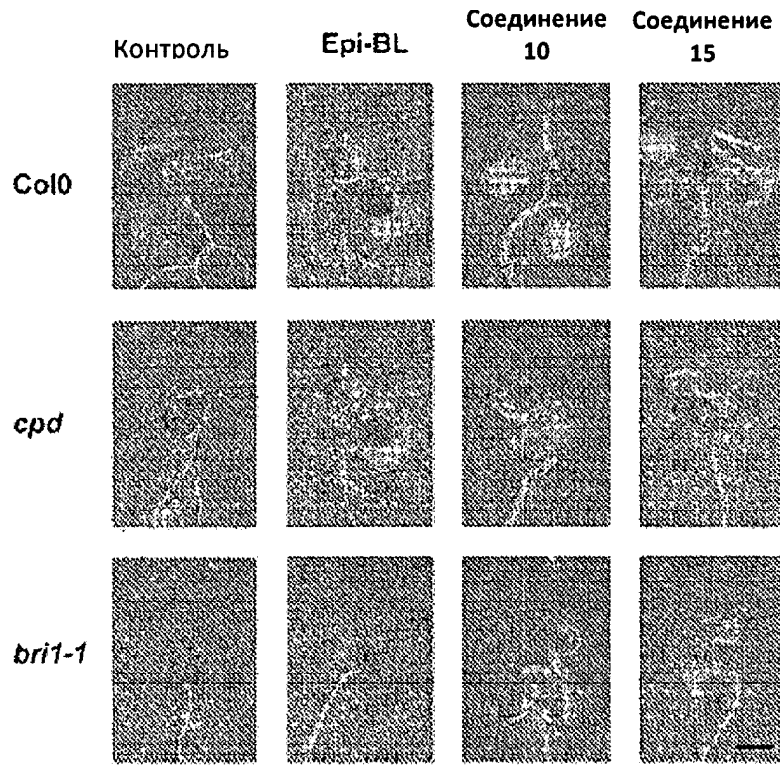
50



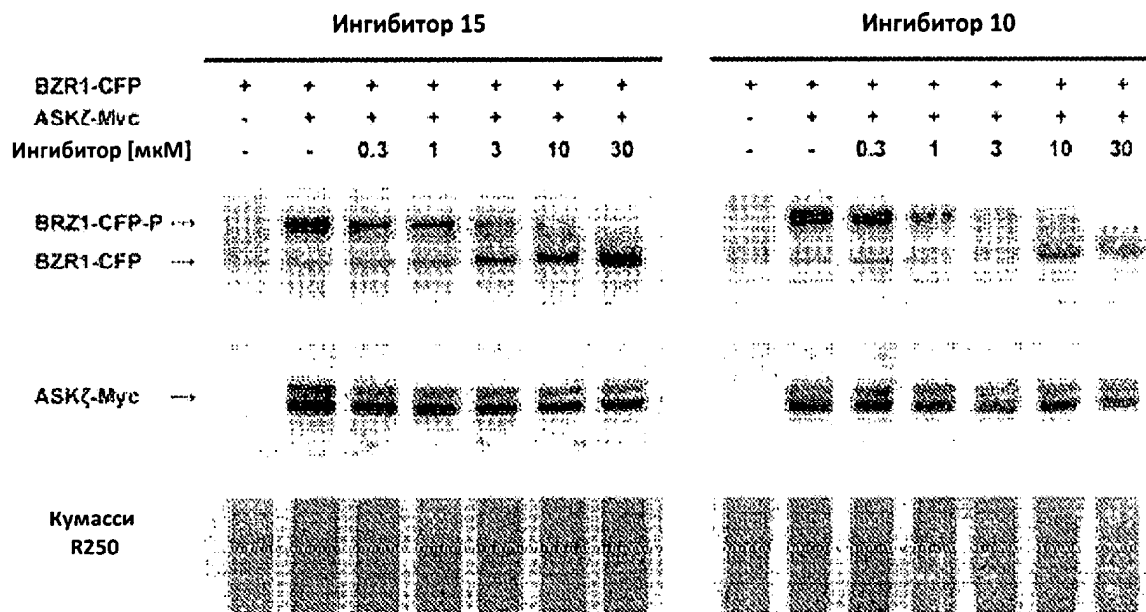
ФИГ. 1



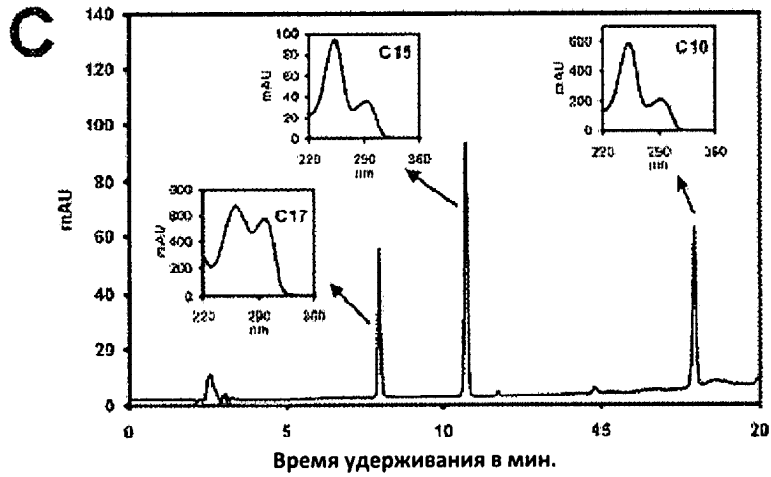
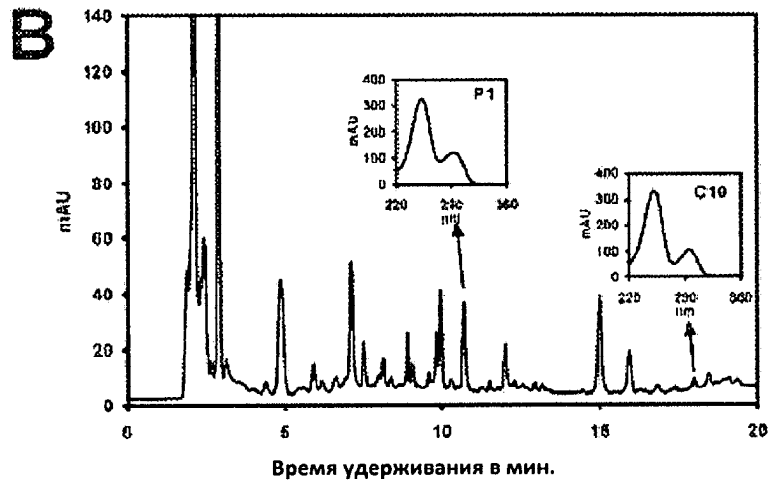
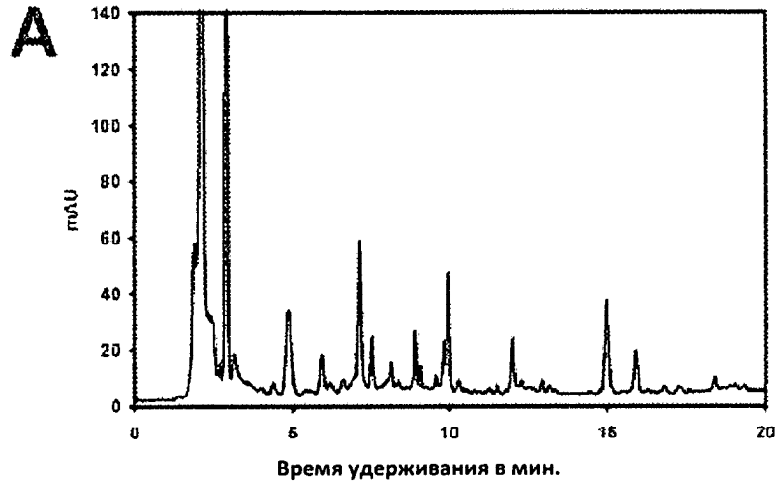
ФИГ. 2



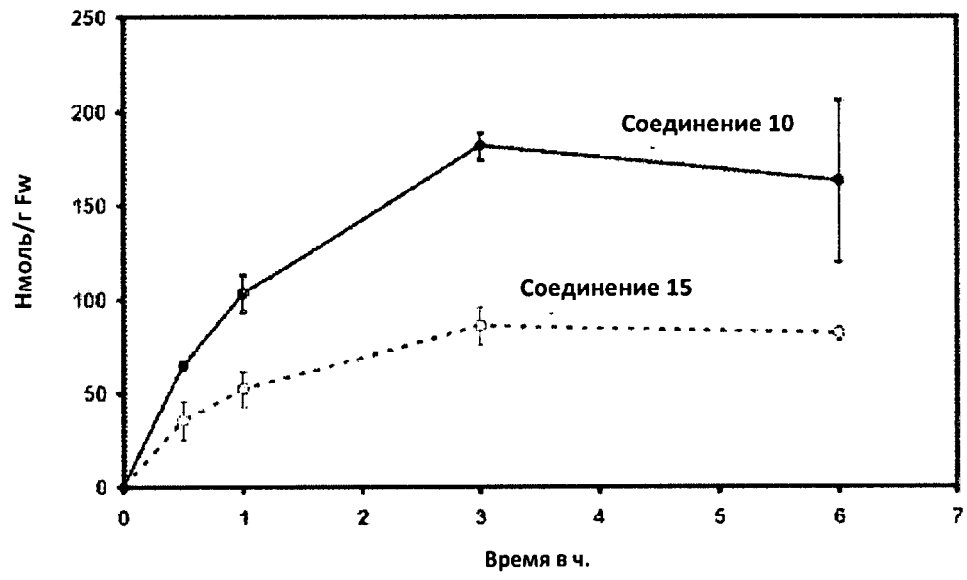
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6