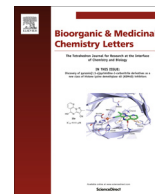




Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-3-carbonitrile derivatives as a new class of histone lysine demethylase 4D (KDM4D) inhibitors



Zhen Fang^{a,d}, Tian-qi Wang^{b,d}, Hui Li^a, Guo Zhang^c, Xiao-ai Wu^a, Li Yang^a, Yu-lan Peng^a, Jun Zou^a, Lin-li Li^c, Rong Xiang^{b,*}, Sheng-yong Yang^{a,*}

^a Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

^b Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

^c Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery System of Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Sichuan 610041, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2017

Revised 17 April 2017

Accepted 1 May 2017

Available online 3 May 2017

Keywords:

KDM4D

Histone lysine demethylase

Epigenetics

Small molecule inhibitor

Structure-activity relationship

ABSTRACT

Herein we report the discovery of a series of new small molecule inhibitors of histone lysine demethylase 4D (KDM4D). Molecular docking was first performed to screen for new KDM4D inhibitors from various chemical databases. Two hit compounds were retrieved. Further structural optimization and structure-activity relationship (SAR) analysis were carried out to the more selective one, compound **2**, which led to the discovery of several new KDM4D inhibitors. Among them, compound **10r** is the most potent one with an IC₅₀ value of 0.41 ± 0.03 μM against KDM4D. Overall, compound **10r** could be taken as a good lead compound for further studies.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

Histone lysine demethylase 4D (KDM4D), also known as JMJD2D, is a typical jumonji domain-containing demethylase, which can catalyze the removal of a methyl group from lysine 9 on histone 3 (H3K9) or H1.4K26.^{1–4} Unlike other widely studied histone demethylase, the studies of KDM4D are just getting started.^{5,6} Despite that biochemical functions of KDM4D have been known, its role in pathogenesis is far from clear,^{7,8} and often opposite in different studies. For examples, a recent study by Bur et al. showed that KDM4D overexpression might lead to a higher risk for resistance to radiotherapy in Hodgkin lymphomas.⁹ Kim et al. revealed that KDM4D was required for colon cancer cell proliferation and survival. However, evidence also showed that KDM4D was able to stimulate p53-dependent gene expression, implying a tumor suppressor gene.¹⁰ The research revealing the net effect, if any, of KDM4D in tumorigenesis is complicated, and not the intention of this investigation. We know that small molecule inhibitors of KDM4D, particularly those with good selectivity, could be used as a tool to help researchers to unravel the action and mechanism.¹¹ Nevertheless, very few KDM4D inhibitors have been reported by now.^{12–15} Our purpose here is to discover potent and

selective KDM4D inhibitors. We hope the compounds discovered could enrich the arsenal of KDM4D inhibitors, and facilitate bio-functional and disease treatment studies related to KDM4D in the further.

To retrieve new KDM4D inhibitors, we firstly performed molecular docking-based virtual screening against various chemical libraries. All the calculations were carried out using the platform of Discovery Studio 3.1 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). The receptor structure for molecular docking was prepared from the crystal structure of jmjC domain of KDM4D (PDB entry: 5FP4). The binding site was defined as a sphere containing the residues that stay within 8 Å from its original ligand, which is large enough to cover the catalytic site. The Charmm force field was assigned. Chemical libraries used in the virtual screening include SKLB (compounds synthesized by our laboratory), Specs (Specs, Inc. Zoetermeer, The Netherlands), and ChemDiv (ChemDiv, Inc., San Diego, CA, USA). All the docking calculations were carried out with the GOLD program.¹⁶ Goldscore¹⁷ was chosen as the scoring function. From the top ranking compounds, ID-Score¹⁸ and RASA¹⁹ were further used to rank the compounds and estimate their synthetic accessibility. Thirty compounds were finally selected for bioactivity validation. Two compounds (**1** and **2**, see Fig. 1) showed inhibition rate more than 50% against KDM4D at the concentration of 10 μM (see Table 1). We also measured the activities of the two hit compounds against other three KDMs, namely KDM2B, KDM3B,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rxiang@nankai.edu.cn (R. Xiang), yangsy@scu.edu.cn (S.-y. Yang).

^d These authors contributed to this work equally.

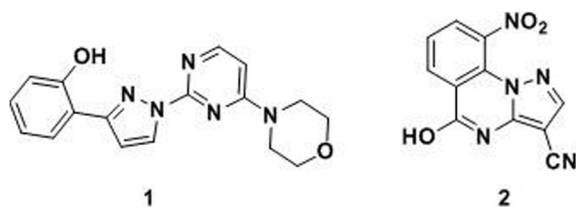


Fig. 1. Chemical structures of the hit compounds.

Table 1
Bioactivities of compounds 1 and 2.

Compound	Inhibition rate @10 μ M ^a			
	KDM4D	KDM2B	KDM3B	KDM5A
1	99.67 $\pm$ 3.96	84.12 $\pm$ 8.21	90.65 $\pm$ 9.16	73.62 $\pm$ 5.83
2	73.33 $\pm$ 19.14	−4.85 $\pm$ 4.72	−2.18 $\pm$ 3.19	23.09 $\pm$ 7.51

^a All assays were conducted in triplicate.

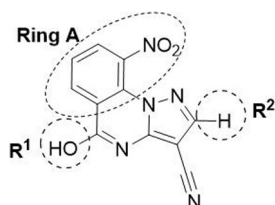


Fig. 2. Schematic showing the focus of structural modifications.

and KDM5A to examine the selectivity roughly; here just the three KDMs are selected because they are available for us at the moment. It was found that only compound 2 showed a better selectivity against KDM4D.

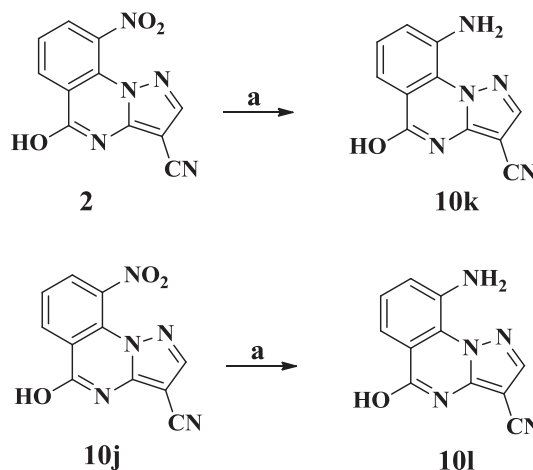
We then carried out a structural optimization to the selective compound, 2. The structural modifications were focused on three regions (see Fig. 2): ring A (nitrobenzene), R¹ (the hydroxyl group), and R² (the hydrogen atom). Various substituents or groups were used to replace the ring A, R¹, and R², and a total of twenty compounds (10a–t) were synthesized.

The synthetic routes for compound 10a–j are depicted in Scheme 1. Acid chloride intermediates 4a–j were first prepared through chlorination of commercially available reagents (3a–j) by thionyl chloride or oxalyl chloride. Nucleophilic substitution reaction between 4d or 4e and 3-amino-1H-pyrazole-4-carbonitrile (6) gave target compounds 10d and 10e. Reaction of 4a–c or 4f–j and 6 produced amide derivatives 5a–c and 5f–j, which then went through a ring close reaction to give target compounds 10a–c and 10f–j. Compounds 10k and 10l were prepared with 2 and 10j, respectively, by Pd/C-catalyzed reduction reactions (see Scheme 2). Target compounds 10m–o were synthesized through very similar reaction routes as those of compounds 10d, 10e (see Scheme 3).

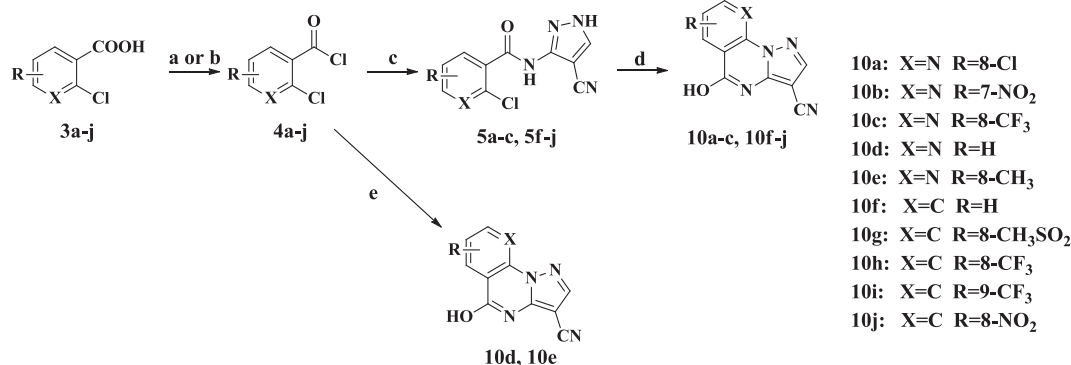
Compounds 10p and 10q were prepared through copper-catalyzed tandem reactions of 2-chloronicotinaldehyde (3p) or 1-(2-chloropyridin-3-yl)ethanone (3q) and 3-amino-1H-pyrazole-4-carbonitrile (6) (see Scheme 4).²⁰

Reaction routes for compounds 10r–t are shown in Scheme 5. Commercially available reagent malononitrile (7) reacted with triethyl orthoacetate derivatives through a Knoevenagel reaction to give intermediate 8a–c, which then reacted with hydrazine hydrate to produce intermediates 9a–c.²¹ Treatment of 4a with 9a–c provided 2-chloro-N-(4-cyano-1H-pyrazol-3-yl)nicotinamide derivatives 5r–t. A ring close reaction of 5r–t was carried out to afford the desired compounds 10r–t.

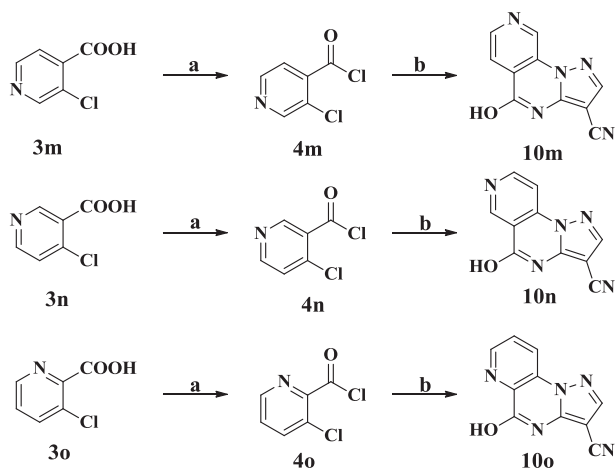
All the synthesized compounds were first tested for their inhibitory rates against KDM4D at the fixed concentration of 10 μ M. Bioactivities for all the compounds are summarized in Table 2. From Table 2, we can see that there are three compounds (10p, 10r, 10s) that showed more potent activities than compound 2. For these compounds whose inhibitory rates are higher than



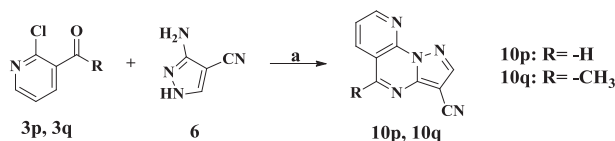
Scheme 2. Synthetic routes for compounds 10k and 10l. Reagents and conditions: (a) Pd/C, methanol, H₂O, 60 °C.



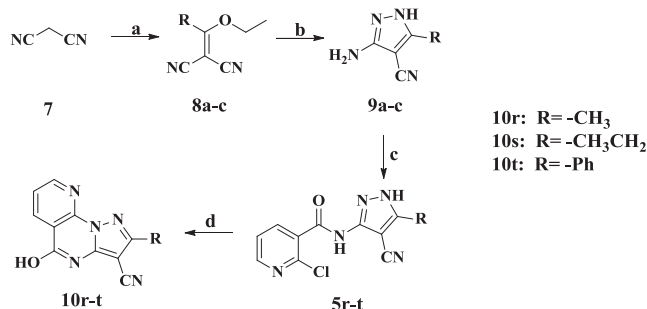
Scheme 1. Synthetic routes for compounds 10a–j. Reagents and conditions: (a) thionyl chloride, DMF, 80 °C; (b) oxalyl chloride, DMF, DCM, 0 °C-rt; (c) 3-amino-1H-pyrazole-4-carbonitrile (6), THF, 0 °C-rt; (d) K₂CO₃, DMF, Argon, 90 °C; (e) 3-amino-1H-pyrazole-4-carbonitrile (6), K₂CO₃, DMF, Argon, 0 °C-rt-140 °C.



Scheme 3. Synthetic routes for compounds **10m–o**. Reagents and conditions: (a) thionyl chloride, DMF, 80 °C; (b) 3-amino-1H-pyrazole-4-carbonitrile, K₂CO₃, DMF, Argon, 0 °C–rt–140 °C.



Scheme 4. Synthetic routes for compounds **10p** and **10q**. Reagents and conditions: (a) CuI, K₂CO₃, ethylenediamine, DMF, Argon, 110 °C.



Scheme 5. Synthetic routes for compounds **10r–t**. Reagents and conditions: (a) triethyl orthoacetate derivatives, Ac₂O, 110 °C; (b) hydrazine hydrate, EtOH, 75 °C; (c) **4a**, TEA, THF, 0 °C–rt; (d) K₂CO₃, DMF, Argon, 140 °C.

compound **2**, further IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) values were measured (see Table 3 and Fig. S1). Among these three compounds, **10r** is the most active one, which contains a pyrido-3-yl at the ring A position, a hydroxyl group at the R¹ position, and a methyl group at the R² position.

We next examined the selectivity of **10r** for KDM4D against other KDMs; again just KDM2B, KDM3B, and KDM5A were included. The results are shown in Table 4. From Table 4, we can see that **10r** displayed almost no activity against KDM2B, KDM3B, and KDM5A (IC₅₀ > 10 μM), indicating that **10r** has a good selectivity for KDM4D against other selected KDMs.

Finally, molecular docking was used again to predict the binding model of the most active compound **10r** in the active pocket of KDM4D. The predicted interaction model between compound

Table 2
Bioactivities of compounds **2** and **10a–t**.

Compound	Inhibition rate @10μM ^a
2	73.33 ± 19.14
10a	58.74 ± 14.49
10b	1.91 ± 7.82
10c	10.41 ± 8.90
10d	20.12 ± 14.90
10e	21.88 ± 16.41
10f	9.03 ± 15.99
10g	9.63 ± 12.44
10h	−0.35 ± 7.90
10i	8.63 ± 13.49
10j	4.75 ± 5.79
10k	62.33 ± 12.60
10l	−2.25 ± 4.57
10m	68.12 ± 18.26
10n	16.40 ± 8.82
10o	5.26 ± 10.52
10p	85.06 ± 3.54
10q	22.90 ± 12.64
10r	88.82 ± 9.58
10s	78.06 ± 6.27
10t	23.61 ± 8.19

^a All assays were conducted in triplicate.

Table 3
Inhibitory activities of compound **2**, **10p**, **10r**, **10s** against KDM4D.

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a
2	3.14 ± 0.18
10p	4.03 ± 1.02
10r	0.41 ± 0.03
10s	1.85 ± 0.14

^a All assays were conducted in triplicate.

Table 4
Inhibitory activities of compound **10r** against selected KDMs.

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a			
	KDM4D	KDM2B	KDM3B	KDM5A
10r	0.41 ± 0.03	>10	>10	>10

^a All assays were conducted in triplicate.

10r and KDM4D is depicted in Fig. 3. From Fig. 3A, B, we can see that compound **10r** suitably resides in the active pocket of KDM4D with the nitrile group pointing towards Fe(II) through forming a coordination interaction between nitrogen of nitrile and Fe(II). There are two hydrogen bonds formed: one is between the 5-position hydroxyl group and Lys245, and the other one is between the pyrazole nitrogen (1-N) and Lys210. It is also obvious that the tri-aromatic-ring of pyrazolo[1,5-a]pyrimido[3,2-e]pyrimidine scaffold of **10r** forms good π–π interactions with the benzene rings of residues Phe189 and Tyr136.

In summary, virtual screening combined with bioactivity validation led to the retrieval of two KDM4D inhibitors. A further structural optimization was carried out on the relatively selective compound **2**. A total of twenty pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carbonitrile derivatives were synthesized. Three compounds showed a higher potency than compound **2**, and **10r** is the most potent one which has an IC₅₀ value of 0.41 ± 0.03 μM. This compound also showed selectivity for KDM4D over KDM family members tested.

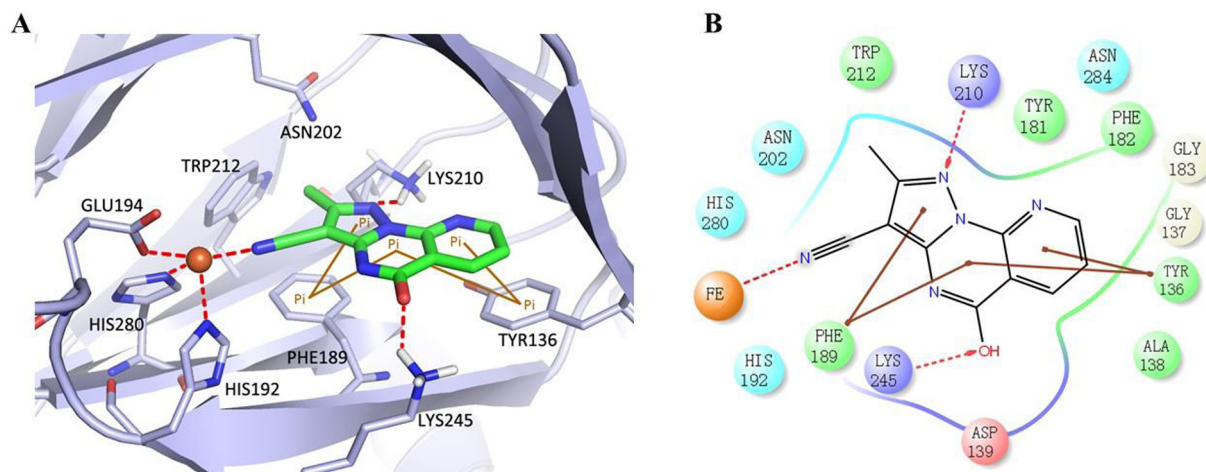


Fig. 3. (A) 3D docking model of compound **10r** in the active pocket of KDM4D. (B) Schematic diagram of binding of compound **10r** to KDM4D. Compound **10r** is color coded with carbon atom by green, nitrogen atom by blue, and oxygen atom by red. Fe(II) is in orange and residues of KDM4D are in light blue. Coordination and hydrogen bonds are shown in red dashed line. The π - π interactions are shown in brown line.

Collectively, compound **10r** could be a good lead compound, and deserves further studies.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the 973 Program (2013CB967204), and the National Natural Science Foundation of China (81325021, 81473140, 81573349).

A. Supplementary data

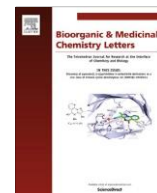
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.002>.

References

- Berry WL, Janknecht R. *Cancer Res.* 2013;73:2936.
- Zoabi M, Nadar-Ponniah PT, Khoury-Haddad H, et al. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:13026.
- Wu R, Wang Z, Zhang H, Gan H, Zhang Z. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:169.
- Whetstone JR, Nottke A, Lan F, et al. *Cell.* 2006;125:467.
- Iwamori N, Zhao M, Meistrich ML, Matzuk MM. *Biol Reprod.* 2011;84:1225.
- Khoury-Haddad H, Nadar-Ponniah PT, Awwad S, Ayoub N. *Cell Cycle.* 2015;14:950.
- Young LC, Hendzel MJ. *Biochem Cell Biol.* 2013;91:369.
- Zhu Y, van Essen D, Sacconi S. *Mol Cell.* 2012;46:408.
- Bur H, Haapasaari KM, Turpeenniemi-Hujanen T, et al. *Anticancer Res.* 2016;36:4677.
- Kim TD, Oh S, Shin S, Janknecht R. *PLoS One.* 2012;7:e34618.
- Westaway SM, Preston AGS, Barker MD, et al. *J Med Chem.* 2016;59:1370.
- Rose NR, Woon EC, Kingham GL, et al. *J Med Chem.* 2010;53:1810.
- Liu L-J, Lu L, Zhong H-J, et al. *J Med Chem.* 2015;58:6697.
- Korczynska M, Le DD, Younger N, et al. *J Med Chem.* 2016;59:1580.
- Hamada S, Suzuki T, Mino K, et al. *J Med Chem.* 2010;53:5629.
- Bissantz C, Folkers G, Rognan D. *J Med Chem.* 2000;43:4759.
- Yamagishi ME, Martins NF, Neshich G, et al. *J Mol Model.* 2006;12:965.
- Li GB, Yang LL, Wang WJ, Li LL, Yang SY. *J Chem Inf Model.* 2013;53:592.
- Huang Q, Li LL, Yang SY. *J Chem Inf Model.* 2011;51:2768.
- Gao L, Song Y, Zhang X, Guo S, Fan X. *Tetrahedron Lett.* 2014;55:4997.
- Li GB, Ma S, Yang LL, et al. *J Med Chem.* 2016;59:8293.

Listas de contenidos disponibles en [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

CARTAS DE QUÍMICA BIOORGÁNICA Y MEDICINAL

página web de la revista: www.elsevier.com/locate/bmcl

DESCUBRIMIENTO DE DERIVADOS DE PIRAZOLO[1,5-A]PIRIMIDINA-3-CARBONITRILLO COMO UNA NUEVA CLASE DE INHIBIDORES DE LA HISTONA LISINA DESMETILASA 4D (KDM4D)

ZHEN FANG^{A,†}, TIAN-QI WANG^{B,D,HUI LI^A, GUO ZHANG^C, XIAO-AI WU^A, LI YANG^A, YU-LAN PENG^A, JUN ZOU^A, LIN-LI LI^C, RONG XIANG^{B,†}, SHENG-YONG YANG^{A,†}}^A Departamento de Medicina Nuclear, Hospital de China Occidental, Universidad de Sichuan, Chengdu, Sichuan 610041, China^B Departamento de Medicina Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Nankai, Tianjin 300071, China^C Laboratorio clave de sistemas de administración de fármacos del Ministerio de Educación, Escuela de Farmacia de China Occidental, Universidad de Sichuan, Sichuan 610041, ChinaARTÍCULO SE
N F O R M A C I O
N

Historia del artículo:

RECIBIDO EL 26 DE ENERO DE 2017

REVISADO EL 17 DE ABRIL DE 2017

ACEPTADO EL 1 DE MAYO DE 2017

DISPONIBLE EN LÍNEA EL 3 DE MAYO DE 2017

Palabras clave:

KDM4D
DESMETILASA DE LISINA DE LA HISTONA
EPIGENÉTICA
INHIBIDOR DE MOLÉCULA
PEQUEÑA RELACIÓN ESTRUCTURA-
ACTIVIDAD

A B S T R A C T O

EN ESTE TRABAJO SE PRESENTA EL DESCUBRIMIENTO DE UNA SERIE DE NUEVAS MOLÉCULAS PEQUEÑAS INHIBIDORAS DE LA HISTONA LISINA DESMETILASA 4D (KDM4D). EN PRIMER LUGAR, SE LLEVÓ A CABO EL ACOPLAMIENTO MOLÉCULAR PARA BUSCAR NUEVOS INHIBIDORES DE KDM4D EN VARIAS BASES DE DATOS QUÍMICAS. SE OBTUVIERON DOS COMPUESTOS DE ÉXITO. SE LLEVÓ A CABO UNA OPTIMIZACIÓN ESTRUCTURAL ADICIONAL Y UN ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR) PARA EL MÁS SELECTIVO, EL COMPUESTO 2, QUE CONDUJO AL DESCUBRIMIENTO DE VARIOS NUEVOS INHIBIDORES DE KDM4D. ENTRE ELLOS, EL COMPUESTO 10r ES EL MÁS POTENTE CON UN VALOR DE IC₅₀ DE 0.41 ± 0.03 μM CONTRA KDM4D. EN GENERAL, EL COMPUESTO 10r PODRÍA TOMARSE COMO UN BUEN COMPUESTO PRINCIPAL PARA FUTUROS ESTUDIOS.

2017 PUBLICADO POR ELSEVIER LTD.

LA HISTONA LISINA DESMETILASA 4D (KDM4D), TAMBIÉN

CONOCIDA COMO JMJD2D, ES UNA DESMETILASA TÍPICA QUE CONTIENE UN DOMINIO JUMONJI, QUE PUEDE CATALIZAR LA ELIMINACIÓN DE UN GRUPO METILO DE LA LISINA 9 DE LA HISTONA 3 (H3K9) O H1K26.¹⁻⁴ A DIFERENCIA DE OTRAS DESMETILASAS DE HISTONAS AMPLIAMENTE ESTUDIADAS, LOS ESTUDIOS SOBRE LA KDM4D NO HAN HECHO MÁS QUE EMPEZAR.^{5,6} A PESAR DE QUE SE CONOCEN LAS FUNCIONES BIOQUÍMICAS DE KDM4D, SU PAPEL EN LA PATOGENESIS NO ESTÁ NADA CLARO,^{7,8} Y A MENUDO ES OPUESTA EN DIFERENTES ESTUDIOS. POR EJEMPLO, UN ESTUDIO RECIENTE DE BUR ET AL. DEMOSTRÓ QUE LA SOBREEXPRESIÓN DE KDM4D PODRÍA CONducIR A UN MAYOR RIESGO DE RESISTENCIA A LA RADIOTERAPIA EN LOS LINFOMAS DE HODGKIN.⁹ KIM ET AL. REVELARON QUE LA KDM4D ERA NECESARIA PARA LA PROLIFERACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DEL CÁNCER DE COLÓN. SIN EMBARGO, TAMBIÉN DEMOSTRARON QUE KDM4D ERA CAPAZ DE ESTIMULAR LA EXPRESIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE P53, LO QUE IMPLICA QUE ES UN GENSUPRESOR DE TUMORES.¹⁰ LA INVESTIGACIÓN QUE REVELA EL EFECTO NETO, SI LO HAY, DE KDM4D EN LA TUMORIGÉNESIS ES COMPLICADA, Y NO ES LA INTENCIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN. SABEMOS QUE LOS INHIBIDORES DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS DE KDM4D, ESPECIALMENTE LOS QUE TIENEN UNA BUENA SELECTIVIDAD, PODRÍAN UTILIZARSE COMO HERRAMIENTA PARA AYUDAR A LOS INVESTIGADORES A DESENTAÑAR LA ACCIÓN Y EL MECANISMO.¹¹ SIN EMBARGO, HASTA AHORA SE HAN DESCRITO MUY POCOS INHIBIDORES DE KDM4D.¹²⁻¹⁵ NUESTRO PROPÓSITO AQUÍ ES DESCUBRIR INHIBIDORES POTENTES Y

† AUTORES CORRESPONDIENTES.

Direcciones de correo electrónico: RXIANG@NANKAI.EDU.CN (R. XIANG), YANGSY@SCU.EDU.CN (S.-Y. YANG).

YANG).

* ESTOS AUTORES HAN CONTRIBUIDO A ESTE TRABAJO A PARTES IGUALES.

INHIBIDORES SELECTIVOS DE KDM4D. ESPERAMOS QUE LOS COMPUESTOS DESCUBIERTOS PUEDAN ENRIQUECER EL ARSENAL DE INHIBIDORES DE KDM4D Y FACILITAR LOS ESTUDIOS BIOFUNCIONALES Y DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON KDM4D EN EL FUTURO.

PARA OBTENER NUEVOS INHIBIDORES DE KDM4D, PRIMERO REALIZAMOS UN CRIBADO VIRTUAL BASADO EN EL ACOPLAMIENTO MOLECULAR CON VARIAS BIBLIOTECAS QUÍMICAS. TODOS LOS CÁLCULOS SE LLEVARON A CABO UTILIZANDO LA PLATAFORMA DISCOVERY STUDIO 3.1 (ACCELRYS INC., SAN DIEGO, CA, USA). LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR PARA EL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SE PREPARÓ A PARTIR DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA DEL DOMINIO JMJC DE KDM4D (ENTRADA PDB: 5FP4). EL SITIO DE UNIÓN SE DEFINIÓ COMO UNA ESFERA QUE CONTIENE LOS RESIDUOS QUE PERMANECEN A MENOS DE 8 Å DE SU LIGANDO ORIGINAL, QUE ES LO SUFICIENTEMENTE GRANDE

COMO PARA CUBRIR EL SITIO CATALÍTICO. SE ASIGNÓ EL CAMPO DE FUERZA CHARMM. LAS BIBLIOTECAS QUÍMICAS UTILIZADAS EN EL CRIBADO VIRTUAL INCLUYEN SKLB (SINTETIZADA POR NUESTRO LABORATORIO), SPECS (SPECS, INC. ZOETER-MEER, PAÍSES BAJOS) Y CHEMDIV (CHEMDIV, INC., SAN DIEGO, CA, EE.UU.). TODOS LOS CÁLCULOS DE ACOPLAMIENTO SE REALIZARON CON EL PROGRAMA GOLD.¹⁶ SE ELIGIÓ COMO FUNCIÓN DE PUNTUACIÓN GOLDScore¹⁷ COMO FUNCIÓN DE PUNTUACIÓN. A PARTIR DE LOS COMPUESTOS MEJOR CLASIFICADOS, SE CALCULARON LAS PUNTUACIONES ID-SCORE¹⁸ Y RASA¹⁹ PARA CLASIFICAR LOS COMPUESTOS Y ESTIMAR SU ACCESIBILIDAD SINTÉTICA. FINALMENTE SE SELECCIONARON TREINTA COMPUESTOS PARA LA VALIDACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD. DOS COMPUESTOS (1 Y 2, VÉASE LA FIG. 1) MOSTRARON UNA TASA DE INHIBICIÓN SUPERIOR AL 50% CONTRA KDM4D A LA CONCENTRACIÓN DE 10 μ M (VÉASE LA TABLA 1). TAMBIÉN SE MIDIÓ LA ACTIVIDAD DE LOS DOS COMPUESTOS CONTRA OTRAS TRES KDMs, A SABER, KDM2B, KDM3B,

[HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.BMCL.2017.05.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.002)

0960-894X/© 2017 PUBLICADO POR ELSEVIER

LTD.

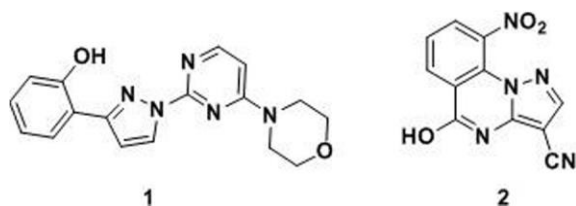


Fig. 1. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS.

Tabla 1

BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS 1 Y 2.

COMPUESTO	TASA DE INHIBICIÓN @10LM ^a			
	kDM4D	kDM2B	kDM3B	kDM5A
1	99.67 ± 3.96	84.12 ± 8.21	90.65 ± 9.16	73.62 ± 5.83
2	73.33 ± 19.14	-4.85 ± 4.72	-2.18 ± 3.19	23.09 ± 7.51

^a TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO.

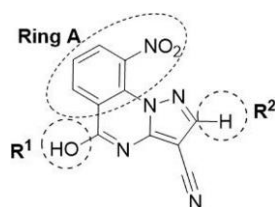


Fig. 2. ESQUEMA QUE MUESTRA EL ENFOQUE DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES.

Y kDM5A PARA EXAMINAR LA SELECTIVIDAD A GRANDES RASGOS; AQUÍ SÓLO SE SELECCIONAN LAS TRES kDM PORQUE ESTÁN DISPONIBLES PARA NOSOTROS EN ESTE MOMENTO. SE COMPROBÓ QUE SÓLO EL COMPUESTO 2 MOSTRABA UNA MAYOR SELECTIVIDAD FRENTE A kDM4D.

A CONTINUACIÓN, LLEVAMOS A CABO UNA OPTIMIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO SELECTIVO, 2. LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES SE CENTRAN EN TRES REGIONES (VÉASE LA FIG. 2): EL ANILLO A (NITROBENCENO), R¹ (EL GRUPO HIDROXILO) Y R² (EL ÁTOMO DE HIDRÓGENO). SE UTILIZARON VARIOS SUSTITUYENTES O GRUPOS PARA REEMPLAZAR EL ANILLO A, R¹, Y R², Y SE SINTETIZARON UN TOTAL DE VEINTE COMBINACIONES (10a-t).

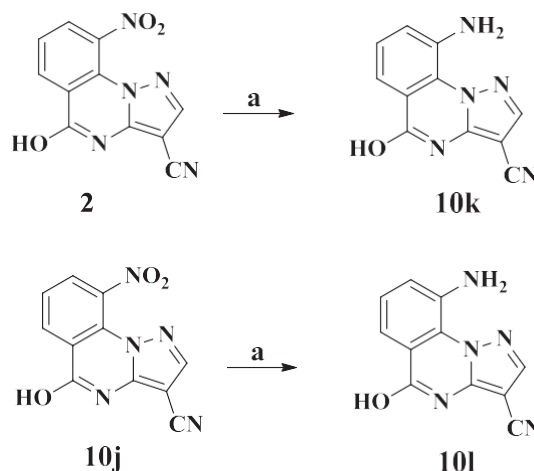
LAS RUTAS DE SÍNTESIS DEL COMPUESTO 10a-j SE DESCRIBEN EN EL ESQUEMA 1. LOS INTERMEDIOS DE CLORURO DE ÁCIDO 4a-j SE PREPARARON PRIMERO MEDIANTE LA CLORACIÓN DE REGENTES DISPONIBLES EN EL MERCADO (3a-j) POR CLORURO DE TIONILO O CLORURO DE OXALILO. LA REACCIÓN DE SUSTITUCIÓN NUCLEOFÍLICA ENTRE 4d o 4e Y 3-AMINO-1H-PIRAZOL-4-CARBONITRILLO (6)

DIÓ LOS COMPUESTOS OBJETIVO 10d Y 10e. LA REACCIÓN DE 4a-c O 4f-j Y 6 PRODUJO LOS DERIVADOS AMIDÍCOS 5a-c Y 5f-j, QUE LUEGO PASARON POR UNA REACCIÓN DE CIERRE DE ANILLO PARA DAR LOS COMPUESTOS OBJETIVO 10a-c Y 10f-j. LOS COMPUESTOS 10k Y 10l SE PREPARARON CON 2 Y 10j, RESPECTIVAMENTE, MEDIANTE REACCIONES DE REDUCCIÓN CATALIZADAS POR Pd/C (VÉASE EL ESQUEMA 2). LOS COMPUESTOS OBJETIVO 10m-o SE SINTETIZARON MEDIANTE RUTAS DE REACCIÓN MUY SIMILARES A LAS DE LOS COMPUESTOS 10d, 10e (VÉASE EL ESQUEMA 3).

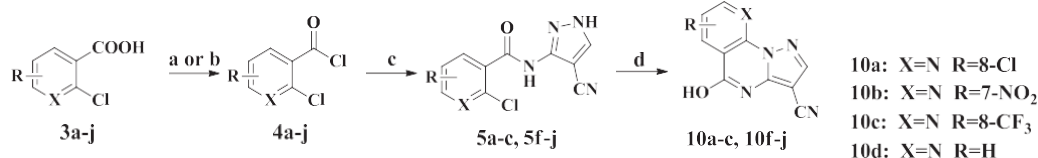
LOS COMPUESTOS 10p Y 10q SE PREPARARON MEDIANTE REACCIONES EN TÁNDEM CATALIZADAS CON COBRE DE 2-CLORONICOTINALDEHÍDO (3p) O 1-(2-CLOROPIRIDINA-3-IL)ETANONA (3q) Y 3-AMINO-1H-PIRAZOL-4-CARBONITRILLO (6) (VÉASE EL ESQUEMA 4).²⁰

LAS RUTAS DE REACCIÓN PARA LOS COMPUESTOS 10r-t SE MUESTRAN EN EL ESQUEMA 5. EL REACTIVO COMERCIALMENTE DISPONIBLE MALONONITRILLO (7) REACCIONÓ CON DERIVADOS DE ORTOACETATO DE TRITILLO MEDIANTE UNA REACCIÓN DE KNOEVENAGEL PARA DAR EL INTERMEDIO 8a-c, QUE LUEGO REACCIONÓ CON HIDRATO DE HIDRACINA PARA PRODUCIR LOS INTERMEDIOS 9a-c.²¹ EL TRATAMIENTO DE 4a CON 9a-c PROPORCIONÓ DERIVADOS DE 2-CLORO-N-(4-CIANO-1H-PIRAZOL-3-IL)NICOTINAMIDA 5r-t. SE LLEVÓ A CABO UNA REACCIÓN DE CIERRE DE ANILLO DE 5r-t PARA OBTENER LOS COMPUESTOS DESEADOS 10r-t.

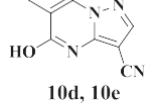
TODOS LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS SE PROBARON PRIMERO POR SUS ÍNDICES DE INHIBICIÓN CONTRA kDM4D A LA CONCENTRACIÓN FIJA DE 10 LM. LAS BIOACTIVIDADES DE TODOS LOS COMPUESTOS SE RESUMEN EN LA TABLA 2. DE LA TABLA 2, PODEMOS VER QUE HAY TRES COMPUESTOS (10p, 10r, 10s) QUE MOSTRARON ACTIVIDADES MÁS POTENTES QUE EL COMPUESTO 2. PARA ESTOS COMPUESTOS LOS ÍNDICES DE INHIBICIÓN SON SUPERIORES A



Esquema 2. RUTAS SINTÉTICAS PARA LOS COMPUESTOS 10k Y 10l. REACTIVOS Y CONDICIONES: (A) Pd/C, METANOL, 4h, 60 °C.

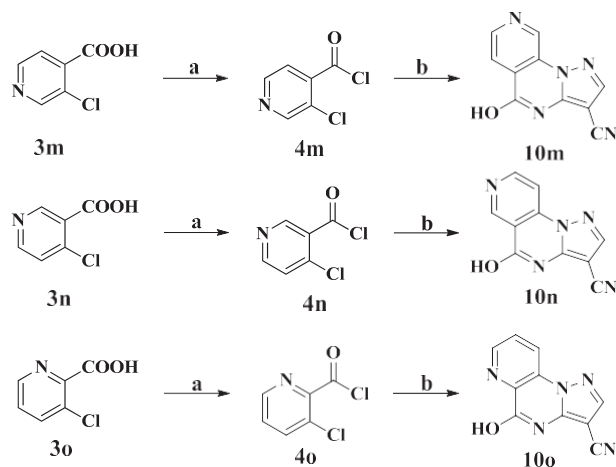


10a: X=N R=8-Cl
10b: X=N R=7-NO₂
10c: X=N R=8-CF₃
10d: X=N R=H

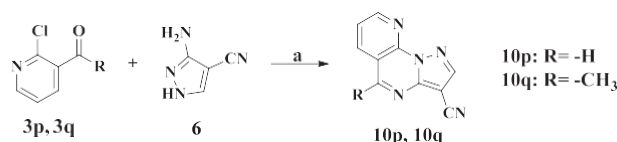


10h: X=C R=8- CF_3
10i: X=C R=9- CF_3
10j: X=C R=8- NO_2

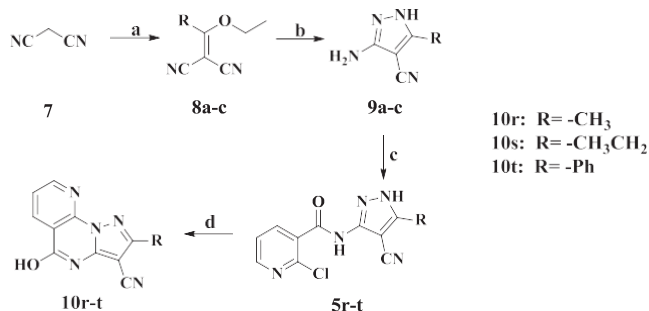
Esquema 1. RUTAS SINTÉTICAS DE LOS COMPUESTOS 10a-j. REACTIVOS Y CONDICIONES: (A) CLORURO DE TIONILO, DMF, 80 °C; (B) CLORURO DE OXALILO, DMF, DCM, 0 °C-rt; (C) 3-AMINO-1H-PIRAZOL-4-CARBONITRILLO (6), THF, 0 °C-RT; (D) K_2CO_3 , DMF, ARGÓN, 90 °C; e) 3-AMINO-1H-PIRAZOL-4-CARBONITRILLO (6), K_2CO_3 , DMF, ARGÓN, 0 °C-RT-140 °C.



Esquema 3. RUTAS SINTÉTICAS PARA LOS COMPUESTOS 10m-o. REACTIVOS Y CONDICIONES: (A) CLORURO DE TIONILO, DMF, 80 °C; (B) 3-AMINO-1H-PIRAZOL-4-CARBONITRILLO, K_2CO_3 , DMF, ARGÓN, 0 °C-RT-140 °C.



Esquema 4. RUTAS SINTÉTICAS DE LOS COMPUESTOS 10p y 10q. REACTIVOS Y CONDICIONES: (A) $COCl_2$, K_2CO_3 , ETILENDIAMINA, DMF, ARGÓN, 110 °C.



Esquema 5. RUTAS SINTÉTICAS PARA LOS COMPUESTOS 10r-t. REACTIVOS Y CONDICIONES: (A) DERIVADOS DE ORTOACETATO DE TRIETILO, Ac_2O , 110 °C; (B) HIDRATO DE HIDRACINA, $EtOH$, 75 °C; (C) 4a, TBA, THF, 0 °C-RT; (D) K_2CO_3 , DMF, ARGÓN, 140 °C.

COMPUESTO 2, SE MIDIERON OTROS VALORES DE IC_{50} (CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA MÁXIMA) (VÉASE LA TABLA 3 Y LA FIG. S1). ENTRE ESTOS TRES COMPUESTOS, EL 10r ES EL MÁS ACTIVO, QUE CONTIENE UN PIRIDO-3-YL EN LA POSICIÓN DEL ANILLO A, UN GRUPO HIDROXILO EN LA POSICIÓN R^1 Y UN GRUPO METILO EN LA POSICIÓN R^2 .

A CONTINUACIÓN EXAMINAMOS LA SELECTIVIDAD DE 10r PARA KDM4D FRENTE A OTRAS KDMs; DE NUEVO SÓLO SE INCLUYERON KDM2B, KDM3B Y KDM5A. LOS RESULTADOS SE MUESTRAN EN LA TABLA 4. DE LA TABLA 4, PODEMOS VER QUE 10r NO MOSTRÓ CASI NINGUNA ACTIVIDAD CONTRA KDM2B, KDM3B, Y KDM5A ($IC_{50} > 10$ IM), INDICANDO QUE 10r TIENE UNA BUENA SELECTIVIDAD PARA KDM4D CONTRA OTRAS KDMs SELECCIONADAS.

FINALMENTE, SE UTILIZÓ DE NUEVO EL DOCKING MOLECULAR PARA PREDICIR EL MODELO DE UNIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO 10r EN EL BOLSILLO ACTIVO DE KDM4D. EL MODELO DE INTERACCIÓN PREDICHO ENTRE EL COMPUESTO

Cuadro 2
BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS 2 Y 10a-t.

COMPUESTO	TASA DE INHIBICIÓN @10LM ^a
2	73.33 ± 19.14
10a	58.74 ± 14.49
10b	1.91 ± 7.82
10c	10.41 ± 8.90
10d	20.12 ± 14.90
10e	21.88 ± 16.41
10f	9.03 ± 15.99
10g	9.63 ± 12.44
10h	-0.35 ± 7.90
10i	8.63 ± 13.49
10j	4.75 ± 5.79
10k	62.33 ± 12.60
10l	-2.25 ± 4.57
10m	68.12 ± 18.26
10n	16.40 ± 8.82
10o	5.26 ± 10.52
10p	85.06 ± 3.54
10q	22.90 ± 12.64
10r	88.82 ± 9.58
10s	78.06 ± 6.27
10t	23.61 ± 8.19

^a TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO.

Cuadro 3
ACTIVIDADES INHIBITORIAS DEL COMPUESTO 2, 10p, 10r, 10s
CONTRA EL KDM4D.

COMPUESTO	IC_{50} (1M) ^a
2	3.14 ± 0.18
10p	4.03 ± 1.02
10r	0.41 ± 0.03
10s	1.85 ± 0.14

^a TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO.

Tabla 4
ACTIVIDADES INHIBITORIAS DEL COMPUESTO 10r CONTRA KDMs SELECCIONADAS.

COMPUESTO	IC_{50} (1M) ^a			
	KDM4D	KDM2B	KDM3B	KDM5A
10r	0.41 ± 0.03	>10	>10	>10

^a TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO.

10r Y KDM4D SE REPRESENTA EN LA FIG. 3. DE LA FIG. 3A, B, PODEMOS VER QUE EL COMPUESTO 10r RESIDE ADECUADAMENTE EN EL BOLSILLO ACTIVO DE KDM4D CON EL GRUPO NITRILLO APUNTANDO HACIA EL FE(II) MEDIANTE LA FORMACIÓN DE UNA INTERACCIÓN DE COORDINACIÓN ENTRE EL NITRÓGENO DEL NITRILLO Y EL FE(II). SE FORMAN DOS ENLACES DE HIDRÓGENO: UNO ES ENTRE EL GRUPO HIDROXILO DE LA 5-POSICIÓN Y LA LYS245, Y EL OTRO ES ENTRE EL NITRÓGENO DEL PIRAZOL (1-N) Y LA LYS210. TAMBIÉN ES EVIDENTE QUE EL ANILLO TRI-AROMÁTICO DEL ANDAMIO DE PIRAZOLO[1,5-ALPIRIMIDINA-3-CARBONITRILLO] DE 10r FORMA BUENAS INTERACCIONES p-p CON LOS ANILLOS BENCÉNICOS DE LOS RESIDUOS PHE189 Y TYR136.

EN RESUMEN, EL CRIBADO VIRTUAL COMBINADO CON LA VALORACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD CONDUJO A LA OBTENCIÓN DE DOS INHIBIDORES DE KDM4D. SE LLEVÓ A CABO UNA OPTIMIZACIÓN ESTRUCTURAL ADICIONAL DEL COMPUESTO 2, RELATIVAMENTE SELECTIVO. SE SINTETIZARON UN TOTAL DE VEINTE DERIVADOS DE PIRAZOLO[1,5-ALPIRIMIDINA-3-CARBONITRILLO]. TRES COMPUESTOS MOSTRARON UNA MAYOR POTENCIA QUE EL COMPUESTO 2, Y EL 10r ES EL MÁS POTENTE QUE TIENE UN VALOR DE IC_{50} DE 0.41 ± 0.03 IM. ESTE COMPUESTO TAMBIÉN MOSTRÓ SELECTIVIDAD POR KDM4D SOBRE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA KDM PROBADOS.

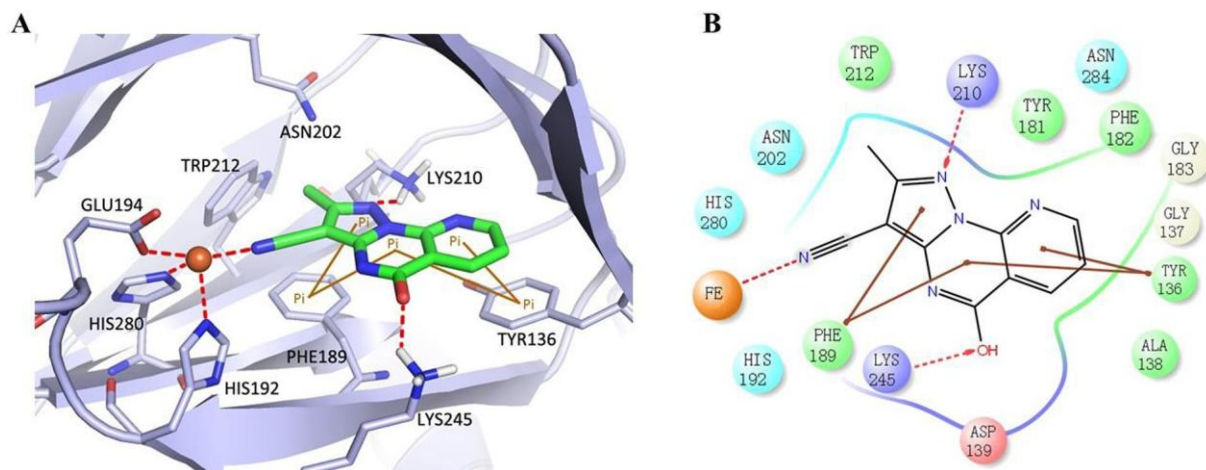


Fig. 3. (A) MODELO DE ACOPLAMIENTO 3D DEL COMPUESTO 10r EN EL BOLSILLO ACTIVO DE KDM4D. (B) DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA UNIÓN DEL COMPUESTO 10r A KDM4D. EL COMPUESTO 10r ESTÁ CODIFICADO POR COLORES CON EL ÁTOMO DE CARBONO EN VERDE, EL ÁTOMO DE NITRÓGENO EN AZUL Y EL ÁTOMO DE OXÍGENO EN ROJO. EL FE(III) ESTÁ EN NARANJA Y LOS RESIDUOS DE KDM4D EN AZUL CLARO. LOS ENLACES DE COORDINACIÓN E HIDRÓGENO SE MUESTRAN EN LÍNEA DISCONTINUA ROJA. LAS INTERACCIONES p-p SE MUESTRAN EN LÍNEA MARRÓN.

EN CONJUNTO, EL COMPUESTO 10r PODRÍA SER UN BUEN COMPUESTO PRINCIPAL Y MERECE MÁS ESTUDIOS.

Conflictos de intereses

LOS AUTORES DECLARAN NO TENER CONFLICTOS DE INTERESES.

Agradecimientos

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROGRAMA 973 (2013CB967204), Y LA FUNDACIÓN NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES DE CHINA (81325021, 81473140, 81573349).

A. Datos complementarios

LOS DATOS SUPLEMENTARIOS ASOCIADOS A ESTE ARTÍCULO PUEDEN ENCONTRARSE, EN LA VERSIÓN ONLINE, EN [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.BMCL.2017.05.002](http://dx.doi.org/10.1016/J.BMCL.2017.05.002).

Referencias

- BERRY WL, JANKNECHT R. *Cancer Res.* 2013;73:2936.
- ZOABI M, NADAR-PONNIAH PT, KHOURY-HADDAD H, ET AL. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:13026.
- WU R, WANG Z, ZHANG H, GAN H, ZHANG Z. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:169.
- WHETSTONE JR, NOTTKE A, LAN F, ET AL. *Cell.* 2006;125:467.
- IWAMORI N, ZHAO M, MEISTRICH ML, MATZUK MM. *Biol Reprod.* 2011;84:1225.
- KHOURY-HADDAD H, NADAR-PONNIAH PT, AWWAD S, AYOUB N. *Cell Cycle.* 2015;14:950.
- YOUNG LC, HENDZEL MJ. *Biochem Cell Biol.* 2013;91:369.
- ZHU Y, VAN ESEN D, SACCANI S. *Mol Cell.* 2012;46:408.
- BUR H, HAAPASAARI KM, TURPENNIEMI-HUJANEN T, ET AL. *Anticancer Res.* 2016;36:4677.
- KIM TD, OH S, SHIN S, JANKNECHT R. *PLoS One.* 2012;7:e34618.
- WESTAWAY SM, PRESTON AGS, BARKER MD, ET AL. *J Med Chem.* 2016;59:1370.
- ROSE NR, WOOD EC, KINGHAM GL, ET AL. *J Med Chem.* 2010;53:1810.
- LIU L-J, LU L, ZHONG H-J, ET AL. *J Med Chem.* 2015;58:6697.
- KORCZYNSKA M, LE DD, YOUNGER N, ET AL. *J Med Chem.* 2016;59:1580.
- HAMADA S, SUZUKI T, MINO K, ET AL. *J Med Chem.* 2010;53:5629.
- BISSANTZ C, FOLKERS G, ROGNAN D. *J Med Chem.* 2000;43:4759.
- YAMAGISHI ME, MARTINS NF, NESTICH G, ET AL. *J Mol Model.* 2006;12:965.
- LI QB, YANG LL, WANG WJ, LI LL, YANG SY. *J Chem Inf Model.* 2013;53:592.
- HUANG Q, LI LL, YANG SY. *J Chem Inf Model.* 2011;51:2768.
- GAO L, SONG Y, ZHANG X, GUO S, FAN X. *Tetrahedron Lett.* 2014;55:4997.
- LI QB, MA S, YANG LL, ET AL. *J Med Chem.* 2016;59:8293.