

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ ім. В.П. КУХАРЯ**

Зінченко Ганна Миколаївна

УДК 547.859+547.828+577.151

**СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ 4,7-ФУНКЦІОНАЛЬНО ЗАМІЩЕНИХ
ПРИДО[2,3-*d*]ПРИМІДИНІВ**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі хімії природних сполук Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук,
старший науковий співробітник
Смолій Олег Борисович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В.П. Кухаря НАН України,
завідувач відділу хімії природних сполук

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, доцент
Бондаренко Світлана Петрівна,
Національний університет харчових технологій,
завідувач кафедри харчової хімії

доктор хімічних наук,
старший науковий співробітник
Дубей Ігор Ярославович,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України,
завідувач відділу синтетичних біорегуляторів

Захист дисертації відбудеться «28» листопада 2019 р. о 10:00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України за адресою: 02094, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України.

Автореферат розісланий «28» жовтня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01

В.О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із пріоритетних завдань біоорганічної хімії є синтез біологічно активних конденсованих гетероциклічних сполук, що містять ядро піримідину. Серед них особливе значення мають піридо[2,3-*d*]піримідини, що представляють інтерес для медицини та фармакології.

За останні роки хімія похідних піридо[2,3-*d*]піримідину набула значного розвитку. Це пов'язано з широким спектром їх біологічної дії. Особливий інтерес у цьому плані викликають амінозаміщені похідні піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону, серед яких знайдені сильні селективні інгібітори CDK4/6 кінази (*Ibrance*), Abl кінази (*PD173955*) та p38 MAP кінази (*Pamaparimod*), що знайшли застосування для лікування автоімунних та онкологічних хвороб.

Відомо, що для синтезу піридо[2,3-*d*]піримідинової системи зазвичай використовують внутрішньомолекулярні циклізації, котрі здійснюються за участю функціоналізованих піримідин-5-карбальдегідів та сполук, що містять активну метиленову групу. Такий підхід є доволі перспективним для структурної модифікації піридо[2,3-*d*]піримідинового циклу різноманітними функціональними групами, проте не забезпечує введення вільної аміногрупи в певні положення піридинового кільця. Тому розробка селективних, простих та ефективних методів отримання функціонально заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину, а також з'ясування перспектив одержаних структур для пошуку біологічно активних сполук є актуальною задачею біоорганічної хімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в рамках бюджетних тем відділу хімії природних сполук Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В.П. Кухаря НАН України «Розвиток методів синтезу, дослідження властивостей і механізмів дії нових потенційно біоактивних сполук» (тема: ЦНП 9.1-12, № держреєстрації 0112U002657), «Інгібітори ферментів: синтез та біологічна активність конденсованих гетероциклічних систем з ядром піримідину» (тема 2.1.10.14-13, № держреєстрації 0113U003094), «Синтез та дослідження конденсованих гетероциклічних систем з ядром піримідину» (тема 2.1.10.14-17, № держреєстрації 0117U000099), «Синтези азотистих гетероциклів і фосфорорганічних сполук та дослідження їх біологічної активності» (тема ЦПФД 1-17, № держреєстрації 0117U000096).

Мета та завдання дослідження. Основна мета роботи полягала у розробці нових та удосконалення вже існуючих підходів до синтезу невідомих раніше функціоналізованих похідних піридо[2,3-*d*]піримідину. Для досягнення цієї мети необхідно було розв'язати наступні завдання:

- 1) розробити зручний метод синтезу нових похідних 7-іміно(оксо)піридо[2,3-*d*]піримідину, що містять алкіламіногрупи в положенні 4 гетероциклічної системи;
- 2) синтезувати нові 4,7-діамінозаміщені похідні піридо[2,3-*d*]піримідину;
- 3) вивчити взаємодію 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з естерами гліцину;

4) розробити препаративний підхід до синтезу похідних 6-амінопіридо[2,3-*d*]-піримідин-7-ону;

5) дослідити інгібувальну активність амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину щодо протеїнкінази СК2 людини.

Об'єкт дослідження – піримідин-5-карбальдегіди, функціоналізовані похідні піридо[2,3-*d*]піримідину.

Предмет дослідження – реакція внутрішньомолекулярної циклізації як метод синтезу похідних піридо[2,3-*d*]піримідину, структурна модифікація піридо[2,3-*d*]піримідинового циклу.

Методи дослідження – органічний синтез, аналітичні методи, ІЧ та ЯМР спектроскопія, хромато-мас-спектроскопія, рентгеноструктурний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. На основі продуктів конденсації доступних піримідин-5-карбальдегідів реакціями внутрішньомолекулярної циклізації синтезовано ряд невідомих раніше 4,7-функціонально заміщених представників піридо[2,3-*d*]піримідину.

Показано, що (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилонітрил виявився перспективним для одержання нових 4-амінозаміщених похідних 7-імінопіридо[2,3-*d*]піримідину.

Розроблено зручні та препаративні методи синтезу похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону та піридо[2,3-*d*]піримідин-7-аміну, що містять залишки первинних та вторинних амінів в положенні 4 гетероциклічної системи.

Встановлено, що взаємодія 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з естерами гліцину приводить до *N*-(5-формілпіримідин-4-іл)гліцинатів та продуктів їх циклізації – похідних піроло[2,3-*d*]піримідину та піридо[2,3-*d*]піримідину.

Запропоновано простий, швидкий та економічний однореакторний спосіб одержання нових 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів реакцією 4-амінозаміщених піримідин-5-карбальдегідів з метил *N*-(4-метоксибензиліден)гліцинатом.

Проведені дослідження *in vitro* показали перспективи пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 серед амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину.

Практичне значення одержаних результатів полягає в розробці препаративних методів одержання похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів та піридо[2,3-*d*]піримідин-7-аміну, які є перспективними для цілеспрямованих синтезів нових біологічно активних речовин. Методами експериментального дослідження серед одержаних амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину виявлені сполуки, що інгібують протеїнкіназу СК2 в мікромольних концентраціях.

Особистий внесок здобувача. Пошук наукової літератури за темою дисертації, проведення основного обсягу експериментальної роботи, аналіз спектральних досліджень та встановлення структури більшості синтезованих сполук зроблено особисто здобувачем. Постановка задачі та обговорення результатів проведені з науковим керівником д.х.н. О.Б. Смолієм. Рентгеноструктурне дослідження здійснено у співпраці з к.х.н. С. В. Шишкіною (НТК «Інститут монокристалів» НАН України, м. Харків). Молекулярний докінг піридо[2,3-*d*]піримідинів проведений к.х.н. В.Г. Бджолою (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м.

Київ). Біохімічне дослідження *in vitro* виконано М.В. Протопоповим (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ).

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на XXIII Українській конференції з органічної хімії (Чернівці, 2013), VI Українській конференції «Домбровські хімічні читання-2015» (Чернівці, 2015), Drug Discovery Conference (Riga, Latvia, 2015), XXIV Українській конференції з органічної хімії (Полтава, 2016), IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (Київ, 2017), VII Українській конференції «Домбровські хімічні читання-2017» (Яремче, 2017), Ist International (XI Ukrainian) scientific conference for students and young scientists «Current chemical problems» (Вінниця, 2018), 8th International conference «Chemistry of nitrogen containing heterocycles» (Харків, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, з них 5 статей у провідних фахових наукових журналах та 8 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, трьох розділів, висновків та списку літературних джерел, що включає 165 найменувань.

Дисертаційна робота викладена на 152 сторінках друкованого тексту і містить 33 схеми, 13 рисунків та 25 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, відображено практичне значення отриманих результатів.

Перший розділ дисертаційної роботи присвячений огляду літератури, в якому узагальнено та систематизовано дані щодо методів синтезу та біологічних властивостей піридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів. Основна увага приділена різноманітним методам отримання цих сполук, в основі яких лежить структура вихідного реагенту. Аналіз літературних даних показує, що до числа найбільш поширених вихідних сполук слід віднести функціонально заміщені піримідини, структурна модифікація яких перспективна для подальшого анелювання піридинового циклу.

У **другому розділі** наведені результати власних досліджень – синтез функціонально заміщених піридо[2,3-*d*]піримідинів та їх властивості.

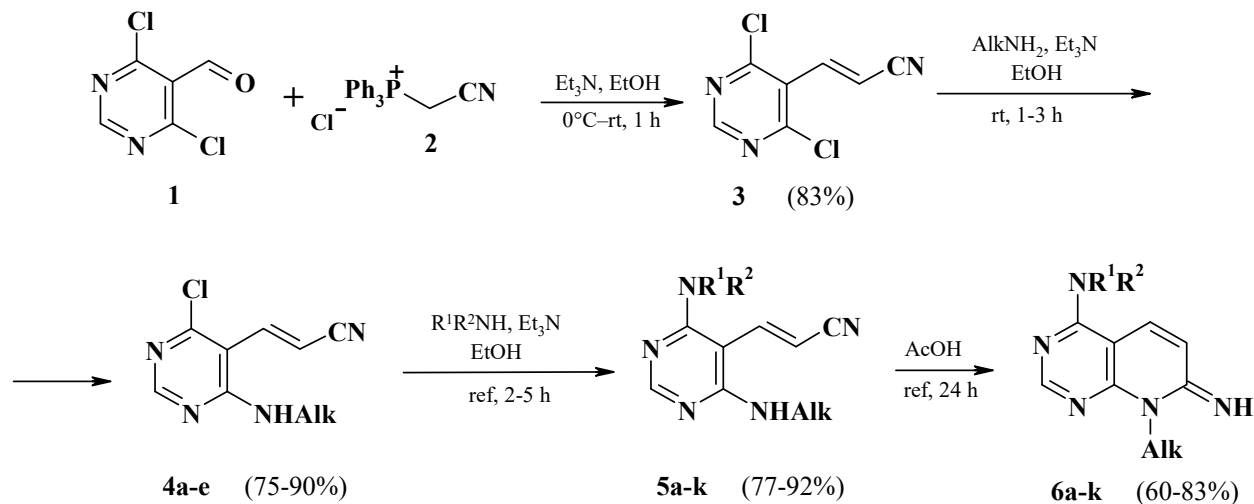
*Синтез нових похідних 7-іміно(оксо)піридо[2,3-*d*]піримідину*

Похідні піридо[2,3-*d*]піримідину є важливими об'єктами досліджень органічної та фармацевтичної хімії. Одним із основних підходів до синтезу піридо[2,3-*d*]піримідинової системи є добування піридинового фрагменту до піримідинового кільця, котра здійснюється за участю функціоналізованих піримідин-5-карбальдегідів та сполук, що містять активну метиленову групу.

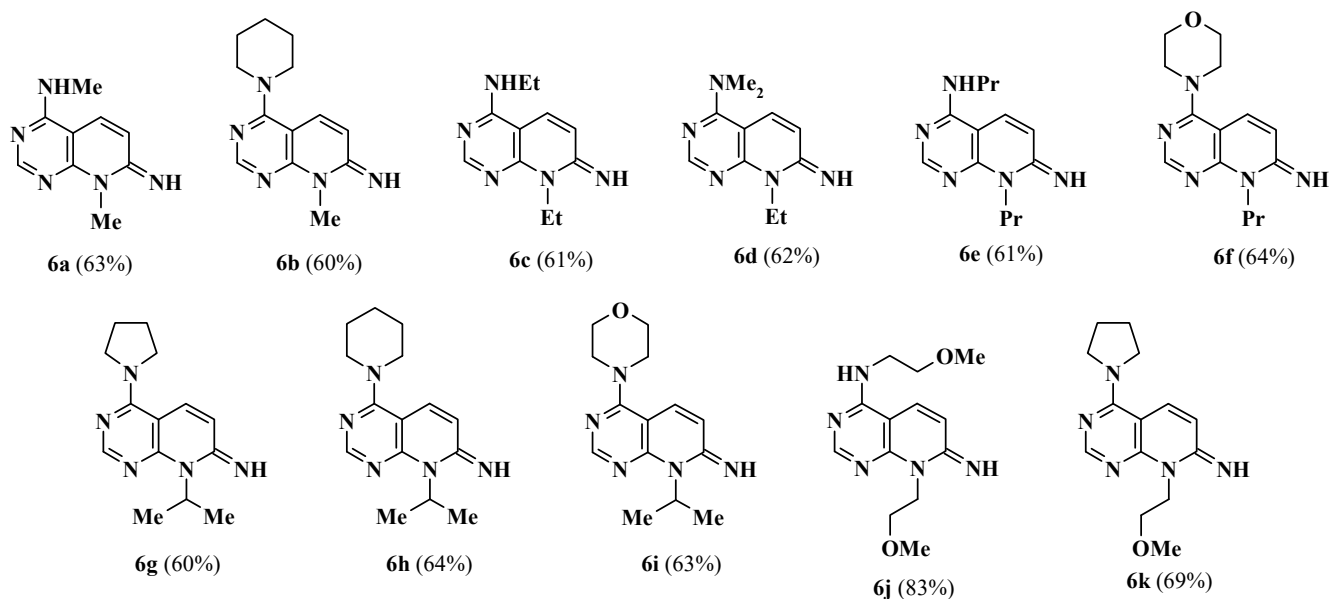
Для одержання 7-імінопіридо[2,3-*d*]піримідинів вихідною сполукою був обраний 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегід **1**, при взаємодії якого з ціанометилтрифенілфосфоній хлоридом в етанолі у присутності триетиламіну утворюється (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилонітрил **3** з високим виходом.

Заміна атома хлору в сполуці **3** на залишки аліфатичних амінів приводить до утворення сполук **4a-e**, а подальша взаємодія з первинними або вторинними амінами дає 4,6-діамінозаміщені похідні піримідинілакрилонітрилу **5a-k** (схема 1).

Схема 1



Alk = Me (a), Et (b), *n*-Pr (c), *i*-Pr (d), (CH₂)₂OMe (e).



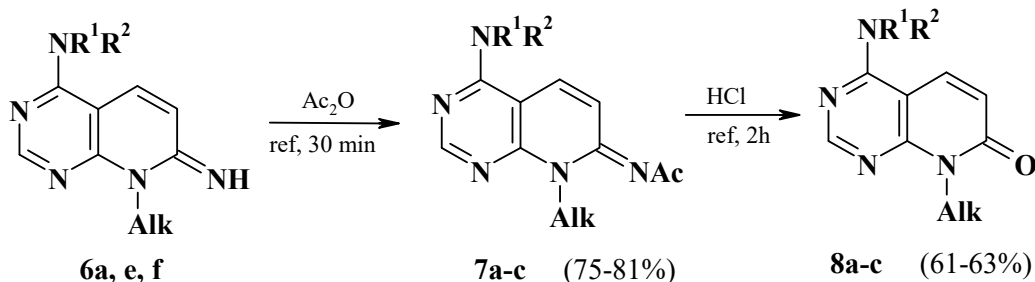
Нами встановлено, що при кип'ятінні сполук **5a-k** в оцтовій кислоті протягом 24 год відбувається циклізація з утворенням нових 4-амінозаміщених похідних 7-імінопіrido[2,3-*d*]піримідину **6a-k**. Подібного роду перетворення було раніше описано на прикладі 6-арилзаміщених піrido[2,3-*d*]піримідинів.

Склад і будова синтезованих сполук доведена результатами елементного аналізу, а також даними ІЧ, хромато-мас-спектрів, спектрів ЯМР ¹H і ¹³C. Порівняння спектрів ЯМР ¹H сполук **5a-k** і **6a-k** свідчить про утворення імінопіридонового циклу. Сигнал протона групи =CHCN сполук **5a-k**

спостерігається в області 5.28–5.90 м. ч., а сигнал протона Н-6 в спектрах 7-імінопіrido[2,3-*d*]піримідинонів **6a-k** знайдений при 6.20–6.66 м. ч.

Наявність екзоциклічної іміногрупи в сполуках **6** відкриває можливості для синтезу піrido[2,3-*d*]піримідин-7-онів. На прикладі 7-імінопіrido[2,3-*d*]піримідинів **6a, e, f** послідовними реакціями ацетилювання та гідролізу одержані 4-амінозаміщені піrido[2,3-*d*]піримідин-7-они **8a-c** (схема 2).

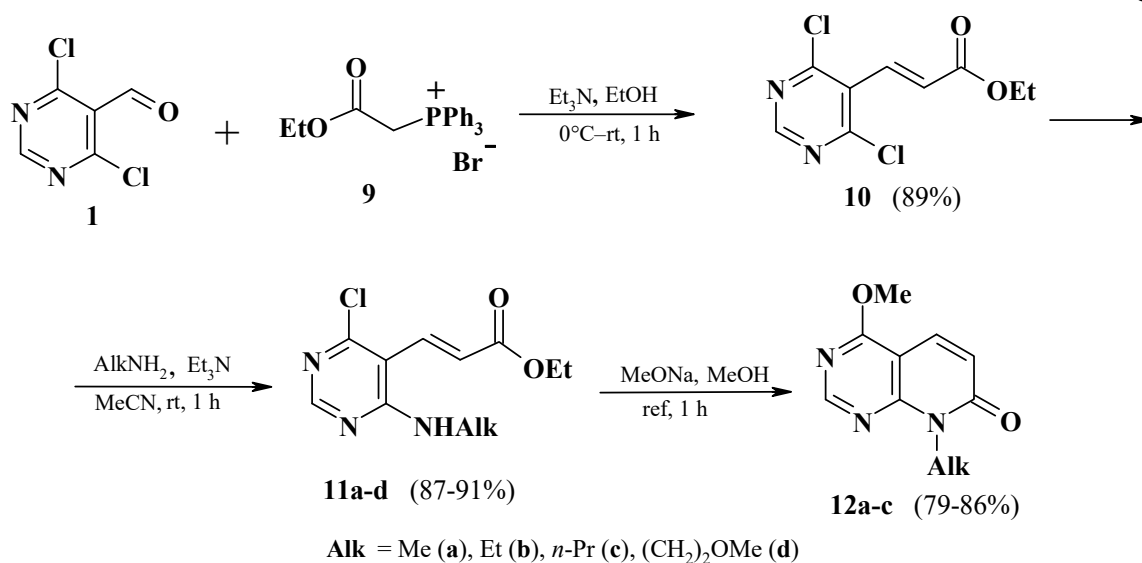
Схема 2



Alk = Me (**a**), *n*-Pr (**6e, f**, **7**, **8b,c**), R¹R²N = MeNH (**a**), *n*-PrNH (**6e**, **7**, **8b**), morpholin-4-yl (**6f**, **7**, **8c**).

Слід зазначити, що даний підхід демонструє невисокі виходи продуктів та багатостадійність процесу. Тому для одержання ряду заміщених похідних піrido[2,3-*d*]піримідин-7-ону **8** вихідною сполукою був обраний 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегід **1**, котрий при взаємодії з (2-етокси-2-оксоетил)трифенілфосфоній бромідом в етанолі в присутності триетиламіну дає етил (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилат **10** з високим виходом (схема 3). Заміна атома хлору в сполуці **10** на залишки аліфатичних амінів приводить до утворення амінозаміщених похідних піримідинілакрилату **11a-d**. Встановлено, що при нагріванні сполук **11a-d** в метанолі з метилатом натрію проходить внутрішньомолекулярна циклізація і заміна атома хлору на метоксигрупу з утворенням 4-метоксипіrido[2,3-*d*]піримідин-7-онів **12a-c** з виходами 79-86%.

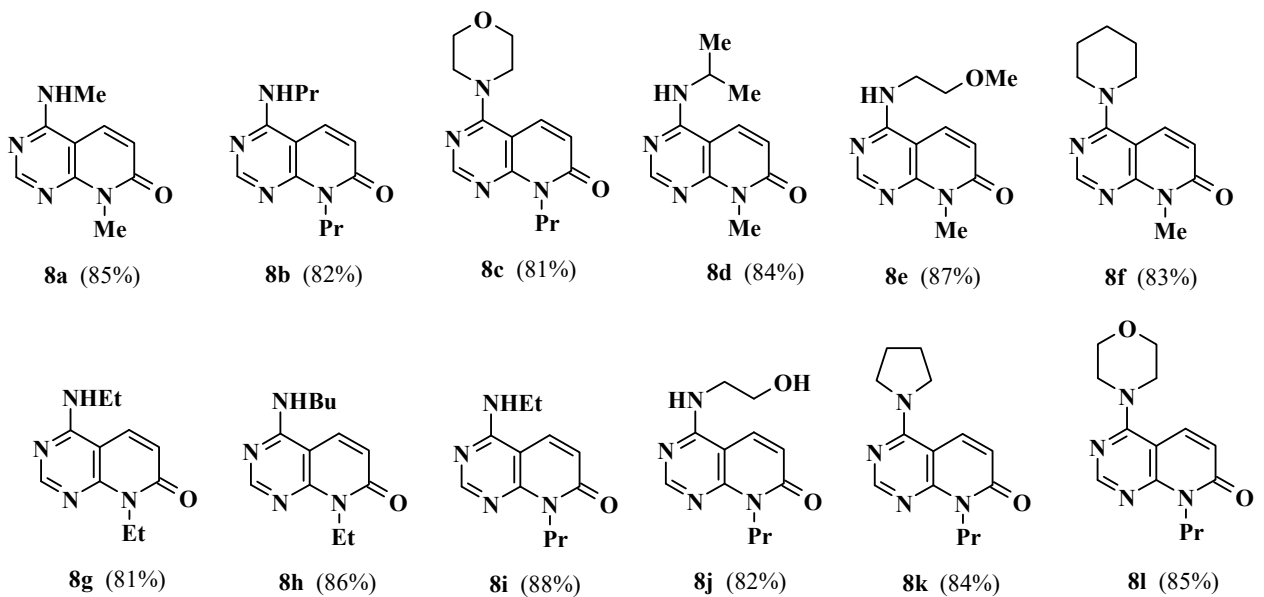
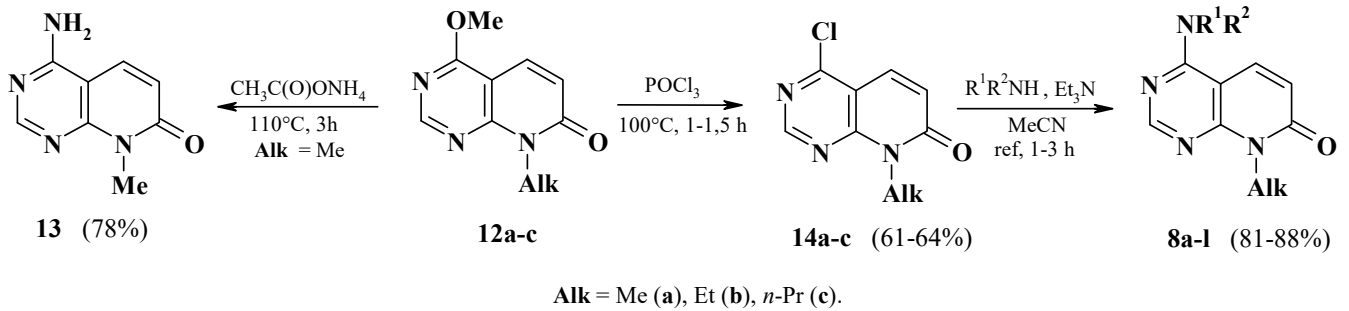
Схема 3



Утворення піридо[2,3-*d*]піримідинового циклу підтверджується даними ЯМР ^1H та ^{13}C спектрів. Так, в спектрі ЯМР ^1H сполук **12a-c** сигнали протонів піридинового циклу проявляються у вигляді дублетів при 6.62–6.65 м.ч. та 7.91–7.95 м. ч., а сигнал метоксигрупи спостерігається при 4.06–4.07 м.ч.

Варто зазначити, що 4-метоксипіридо[2,3-*d*]піримідин-7-они **12a-c** виявились корисними для синтезу нових 4-амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **13** та **8a-l** (схема 4).

Схема 4

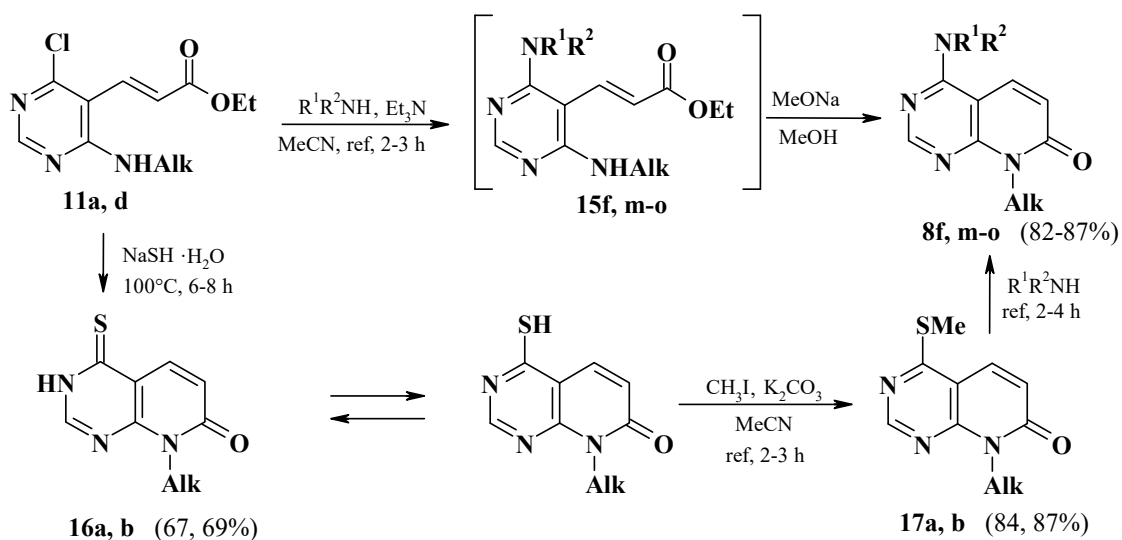


Дослідження показали, що нагрівання 8-метил-4-метоксипіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **12a** з ацетатом амонію приводить до утворення 4-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **13**. Для введення різноманітних азотовмісних замісників в положення 4 гетероциклічної системи сполуки **12a-c** були перетворені в похідні 4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **14a-c** обробкою хлорокислом фосфору. Взаємодія сполук **14a-c** з аліфатичними амінами в присутності триетиламіну приводить до утворення 4-амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **8a-l**.

Слід зазначити, що похідні піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **8** також були отримані при взаємодії сполук **11a, d** з вторинними амінами в присутності триетиламіну та подальшою обробкою утворених етилакрилатів **15** метилатом натрію при нагріванні в метанолі (схема 5). Це дало змогу синтезувати з високими

виходами низку заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **8f, m-o**, що містять залишки вторинних амінів, одноколбовим способом без виділення етил (2*E*)-3-(4,6-діамінопіримідин-5-іл)акрилатів **15**. Крім того, показана можливість синтезу піридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **8** з заміщеного 4-тіоксопіридо[2,3-*d*]піримідинону **16a, b** (схема 5). При нагріванні похідних піримідинілакрилату **11a, d** з гідросульфідом натрію проходить внутрішньомолекулярна циклізація та заміна атома хлору на сірку з утворенням похідних 4-тіоксопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **16a, b**, котрі можуть існувати в двох таутомерних формах (тіонній та тіольній). ІЧ спектри таких сполук характеризуються відсутністю смуги поглинання групи SH при 2550-2600 cm^{-1} , що свідчить про наявність тіонної форми. Алкілювання 4-тіоксопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **16a, b** метилйодидом в ацетонітрилі протікає регіоселективно з утворенням S-метильних похідних **17a, b**. Обробка 4-меркаптопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **17a, b** вторинними амінами приводить до заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **8**.

Схема 5



Таким чином, на основі 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду розроблені різноманітні підходи до синтезу нових похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону, що містять азотовмісні замісники в положенні 4 гетероциклічної системи.

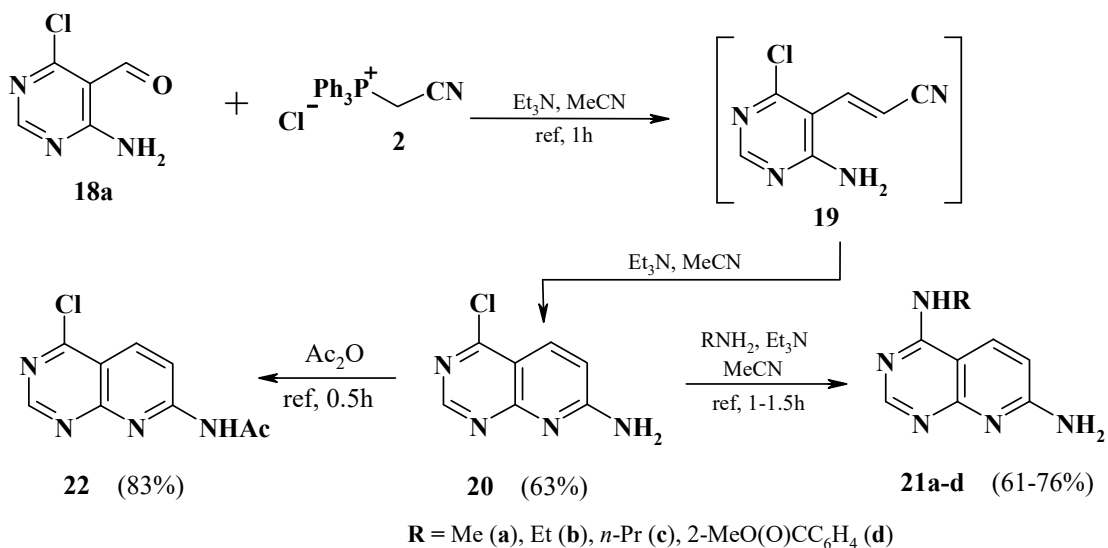
Синтез 4,7-діамінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину

Одним із напрямків пошуку нових біологічно активних сполук з ядром піридо[2,3-*d*]піримідину є синтез сполук, котрі містять вільну аміногрупу в гетероциклічному кільці. Висока біологічна активність амінозаміщених піридопіримідинових похідних як інгібіторів тирозин кіназ, а також розробка препаративних підходів до синтезу нових піридо[2,3-*d*]піримідинів, котрі містять аміногрупи в положенні 4, 7 гетероциклічної системи, стимулювала наші подальші дослідження в цій області.

Вихідною сполукою був обраний 4-аміно-6-хлоропіримідин-5-карбальдегід **18a**. При взаємодії альдегіду **18a** з ціанометилтрифенілфосфоній хлоридом в ацетонітрилі в присутності триетиламіну відбувається утворення інтермедиату **19**, здатного до внутрішньомолекулярної циклізації. В результаті перетворень одержано 4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-амін **20**. Утворення піридо[2,3-*d*]піримідинового циклу підтверджується даними ІЧ, ЯМР ^1H і ^{13}C спектрів. Так, у спектрі ЯМР ^1H сполуки **20** сигнали протонів піридинового циклу проявляються у вигляді дублетів при 6.96 та 8.11 м. д., а сигнал групи NH_2 спостерігається при 7.76 м. д.

Слід зазначити, що продукт циклізації **20** виявився зручним реагентом для подальших цілеспрямованих синтезів 4,7-діамінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину **21a-d** (схема 6).

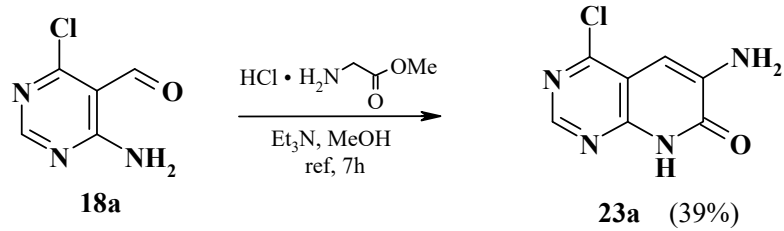
Схема 6



Заміна атома хлору на залишки первинних та вторинних амінів протікає в присутності триетиламіну при кип'ятінні в ацетонітрилі. Наявність аміногрупи в сполуці **20** відкриває можливості для синтезу нових ацетильованих амінопохідних піридо[2,3-*d*]піримідину **22**.

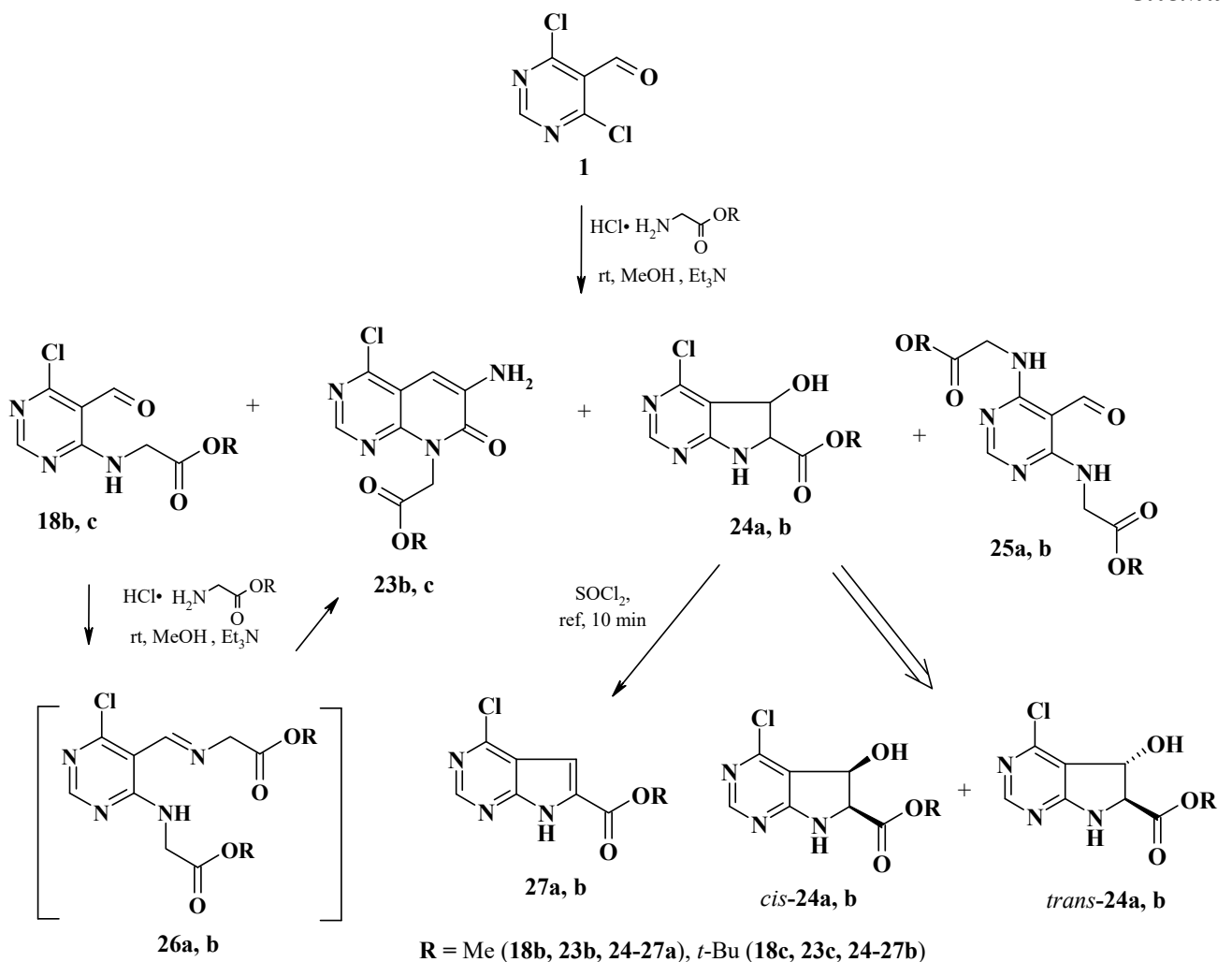
*Пошук підходів до синтезу 6-амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону*

Наступним етапом нашої роботи була розробка методів синтезу похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону з аміногрупою в положенні 6 гетероциклічної системи. Відомо, що для введення вільної аміногрупи в гетероциклічне кільце використовуються циклоконденсації орто-заміщених альдегідів циклічного ряду з похідними гліцину. Прикладом таких реакцій є синтез похідних 3-амінокумарину. На жаль, автори цих перетворень не наводять аргументів щодо вибору вихідних реагентів, а також не розглядають ймовірні інтермедиати описаних гетероциклізацій. Проте використання даного підходу на прикладі 6-аміно-4-хлоропіримідин-5-карбальдегіду **18a** виявилось корисним для отримання невідомого раніше 6-амінозаміщеного піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **23a** з невисоким виходом (схема 7).



Реакція альдегіду **18a** з гідрохлоридом метилового естеру гліцину протікала в присутності триетиламіну при нагріванні в метанолі. Структура отриманої сполуки **23a** підтверджена комплексним фізико-хімічним дослідженням, що включає методи ЯМР- та хромато-мас-спектрометрії. Так, в спектрі ЯМР ^1H піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **23a** сигнал протону піридинового циклу проявляється у вигляді синглету при 6.73 м.ч., сигнал NH_2 групи спостерігається при 6.27 м.ч., а NH групи – при 12.80 м.ч. Особливістю спектру ЯМР ^{13}C є наявність сигналу атома С-5 при 97.9 м.ч.

На жаль, отримати цільовий продукт з високими виходами не вдалось, що пов'язано з низькою регіоселективного процесу та наявністю кількох реакційних центрів. Тому видавалось доцільним вивчити взаємодію 4,6-дихлорозаміщеного піримідин-5-карбальдегіду **1** з естерами гліцину (схема 8).



Дослідження показало, що реакція 4,6-дихлоро-5-форміліпіримідину **1** з гідрохлоридами естерів гліцину в метанолі при кімнатній температурі в присутності триетиламіну приводить до одержання суміші продуктів **18**, **23-25**. При еквімолярному співвідношенні реагентів реакція проходить з утворенням метил *N*-(6-хлоро-5-форміліпіримідин-4-іл)гліцинатів **18b**, **с** та продуктів циклізації – 4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **23b**, **с**, а також метил 4-хлоро-5-гідрокси-6,7-дигідро-5*H*-піроло[2,3-*d*]піримідин-6-карбоксилатів **24a**, **b** у вигляді двох ізомерів, котрі вдалося розділити шляхом хроматографії на колонці. Обробка сполук **24a**, **b** тіонілхлоридом приводить до утворення похідних піроло[2,3-*d*]піримідин-6-карбоксилату **27a**, **b** з виходами 78, 89%.

Зауважимо, що продукт анелювання піридонового кільця до піримідинового циклу – 4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-он **23b**, котрий містить залишок метилацетату, був виділений з виходом не більше 5%. Структура отриманої сполуки доведена з використанням методів ЯМР- та хромато-мас-спектрометрії. Рентгеноструктурний аналіз однозначно встановив наявність гетероциклічної системи піридо[2,3-*d*]піримідину (рис.1).

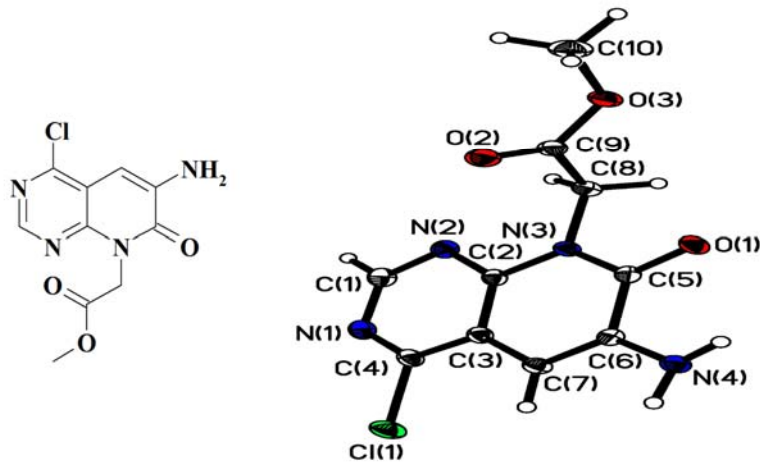


Рис. 1. Будова сполуки **23b** за даними РСД

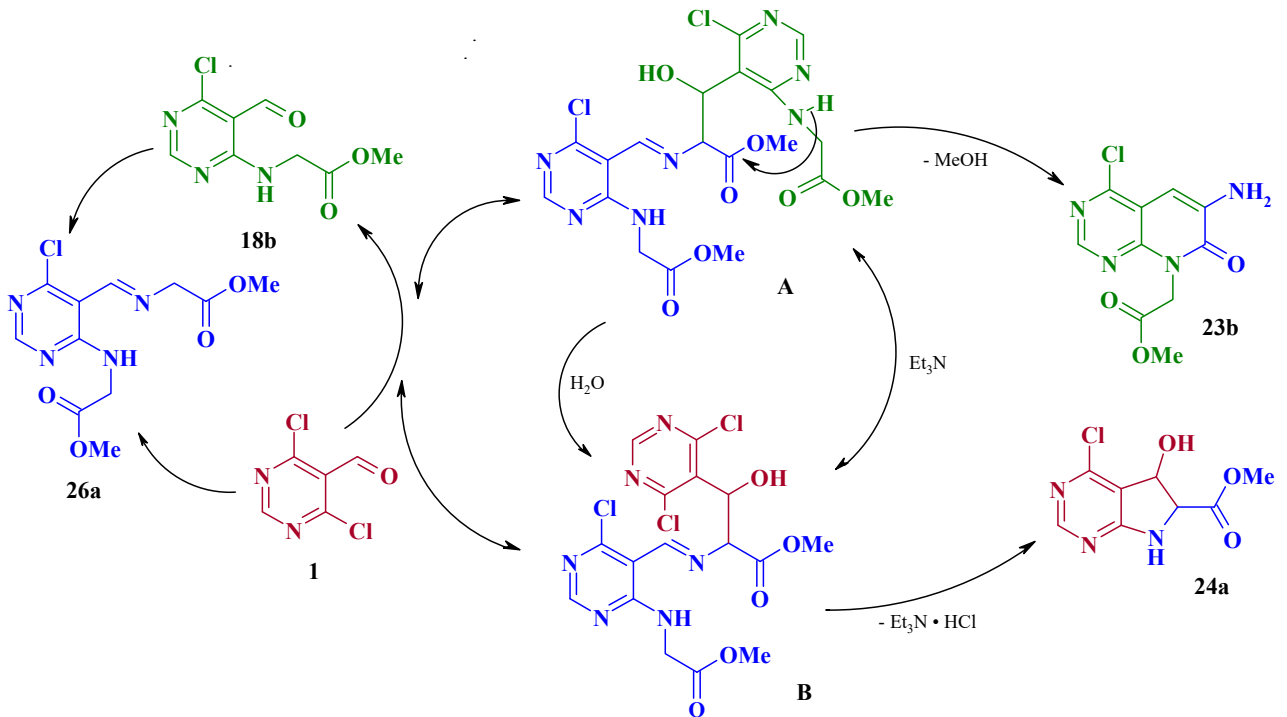
Подальші дослідження реакції 4,6-дихлоро-5-форміліпіримідину **1** з гідрохлоридами естерів гліцину показали, що вихід 6-аміно-4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **23b**, **с** значно збільшується при мольному співвідношенні реагентів 1:2 (36, 38%), а при співвідношенні 1:3 – виходи досягають 45%. При цьому спостерігається зменшення кількості монозаміщених альдегідів **18b**, **с** та поява 4,6-дизаміщених похідних 5-форміліпіримідину **25a**, **b** (4, 13%).

Слід зазначити, що подальша взаємодія 6-амінозаміщених 4-хлоропіримідин-5-карбальдегідів **18b**, **с** з гідрохлоридами естерів гліцину в метанолі в присутності триетиламіну приводить до утворення, ймовірно, інтермедіату **26a**, **b**, схильного до внутрішньомолекулярної циклізації з утворенням 6-аміно-4-хлоро-7-оксопіридо[2,3-*d*]піримідин-8(7*H*)-ілацетатів **23b**, **с** (схема 8). В той же час тривале нагрівання **18b**, **с** в киплячому ацетонітрилі з надлишком триетиламіну протягом 5 діб не привело до піроло[2,3-*d*]піримідину **24a**, **b**.

Такий перебіг перетворень пов'язаний з ймовірною реалізацією процесу циклоконденсацій, приведених на схемі 9 (для метилового естеру гліцину). Ключову

роль при цьому відіграє 6-амінозаміщений метил *N*-[(4-хлоропіримідин-5-іл)метиле]н]гліцинат **26a**, котрий за наявності триетиламіну взаємодіє з піримідин-5-карбальдегідами, присутніми у реакційній масі, та утворює проміжні інтермедіати **A** та **B**. Дегідратація та відщеплення молекули спирту від проміжного продукту **A** супроводжується внутрішньомолекулярною циклізацією і гідролізом азометинового фрагменту, при цьому утворюється 6-аміно-4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-он **23b**. Поява води в реакційній суміші, а також наявність триетиламіну приводить до розщеплення зв'язку C=N в структурі інтермедіату **B** та сприяє подальшій внутрішньомолекулярній циклізації з відщепленням хлороводню та утворенням похідного піроло[2,3-*d*]піримідину **24a**.

Схема 9

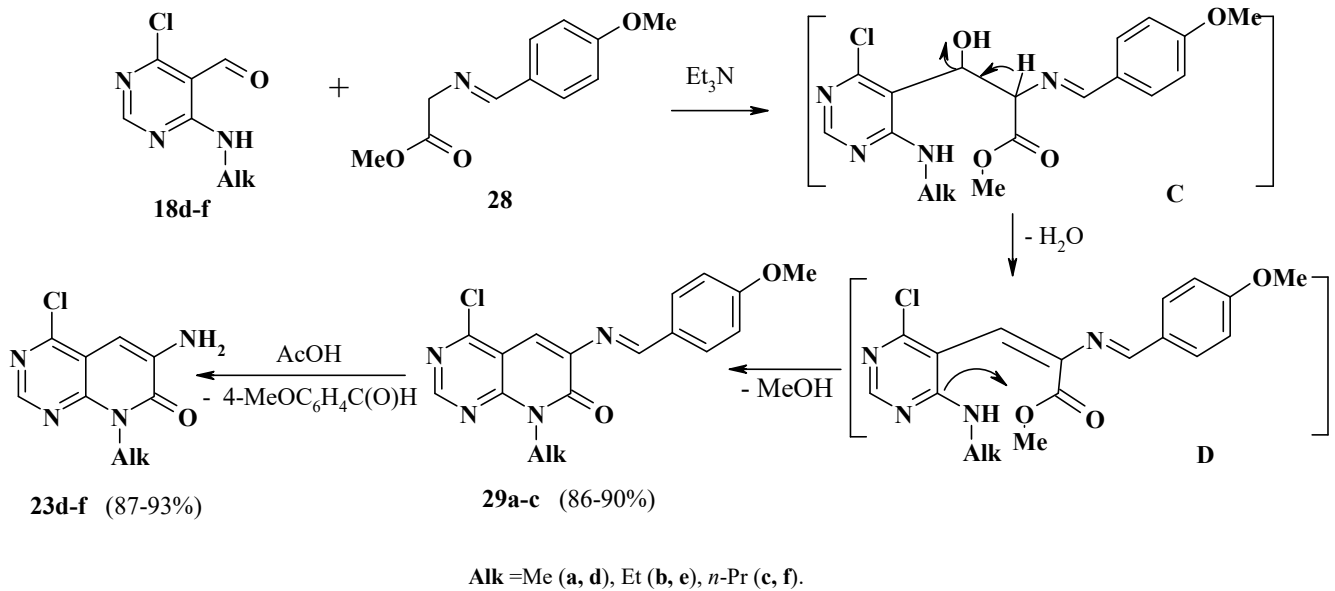


Враховуючи низьку селективність процесу, наведеного на схемі 8, та ключову роль іміну в реакціях з піримідин-5-карбальдегідами (схема 9), для синтезу ряду 6-амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону як вихідний реагент був обраний метил *N*-(4-метоксибензиліден)гліцинат **28** (схема 10).

При взаємодії 6-алкіламінопіримідин-5-карбальдегідів **18d-f** із “захищеним” естером гліцину **28** в присутності триетиламіну в метанолі при кімнатній температурі утворюється інтермедіат **C**, подальша дегідратація якого і відщеплення метилового спирту від інтермедіату **D** приводить до одержання відповідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів **29a-c**. Потрібно відзначити, що природа основи відіграє важливу роль в цій реакції. Так, спроби замінити триетиламін на DBU (діазабіциклоундецен) або DMAP (4-диметиламінопіридин) не дають позитивного результату, перетворення супроводжуються осмоленням реакційної суміші, а виходи продуктів **29a-c** не перевищують 10%. Використання тетрагідрофурану або ацетонітрилу як розчинника не впливає на перебіг реакції. Сполуки **29a-c** виявились

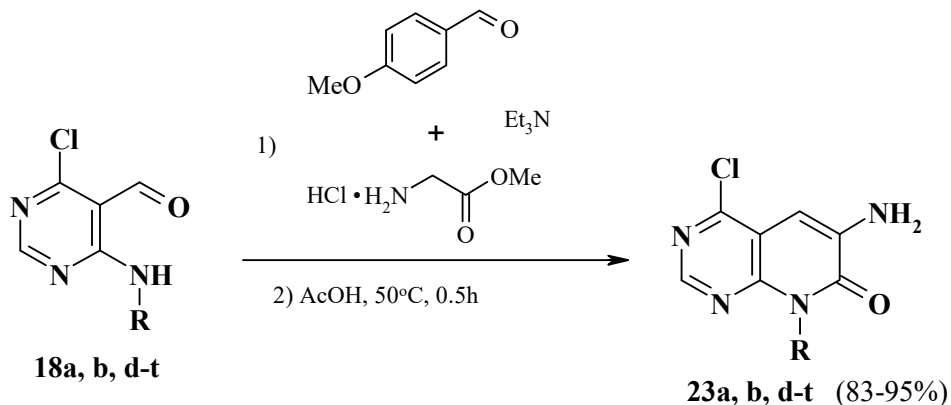
нестійкими і частково розкладаються при спробі перекристалізації. При нагріванні з оцтовою кислотою похідні піридопіримідину **29a-c** були перетворені в цільові продукти – 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-они **23d-f** з виходами 87-93%. Дослідження фільтрату показало наявність анісового альдегіду.

Схема 10



Для спрощення процесу та розширення границь застосування в реакцію введено ряд альдегідів **18** (схема 11). Реакція проводилася способом «*one-pot*». Для цього суміш анісового альдегіду, гідрохлориду метилгліцинату та триетиламін витримували в метанолі при кімнатній температурі 5 год, а потім додавали один з альдегідів **18a, b, d-t** і перемішували 3 год. Після утворення жовтого осаду додавали 70% розчин оцтової кислоти і реакційну суміш витримували при 50°C впродовж 30 хв. Знебарвлення жовтого розчину і поява осаду свідчить про утворення цільових продуктів **23a, b, d-t**.

Схема 11



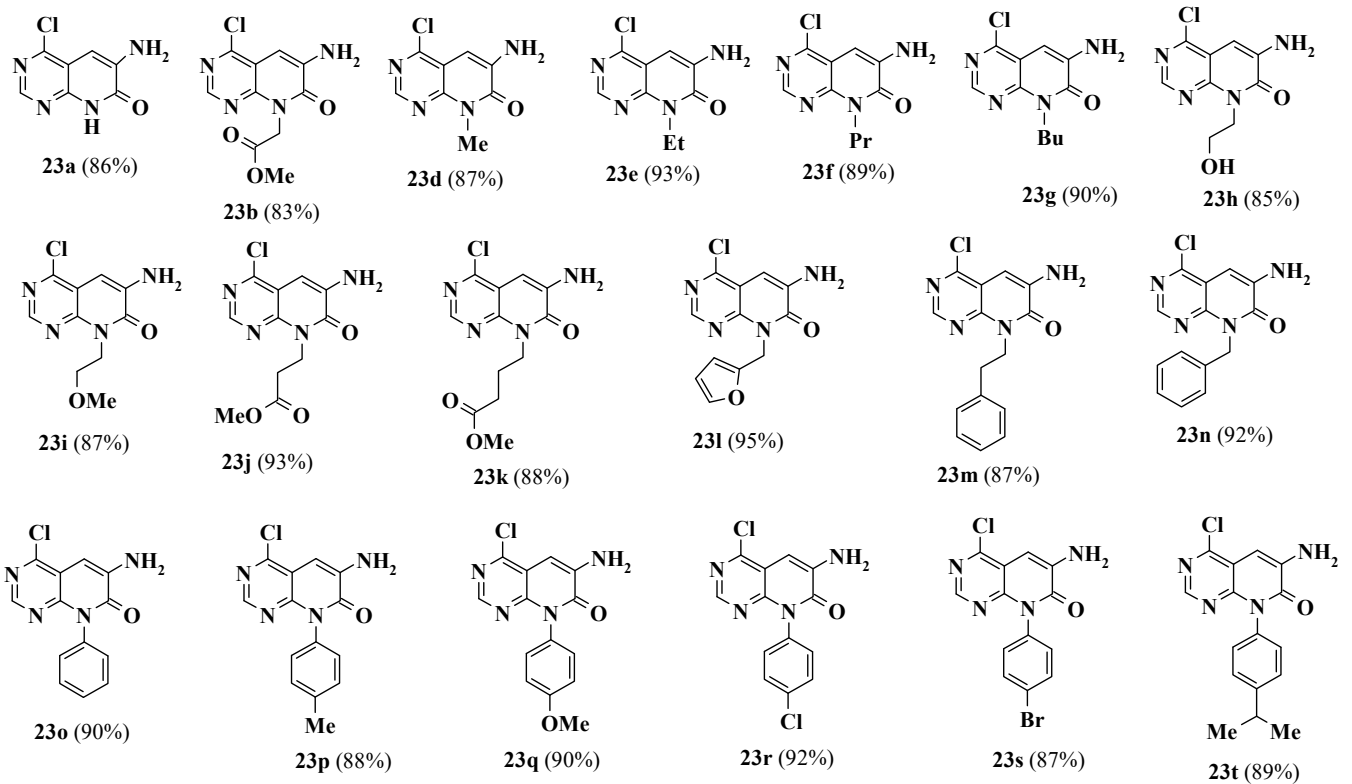
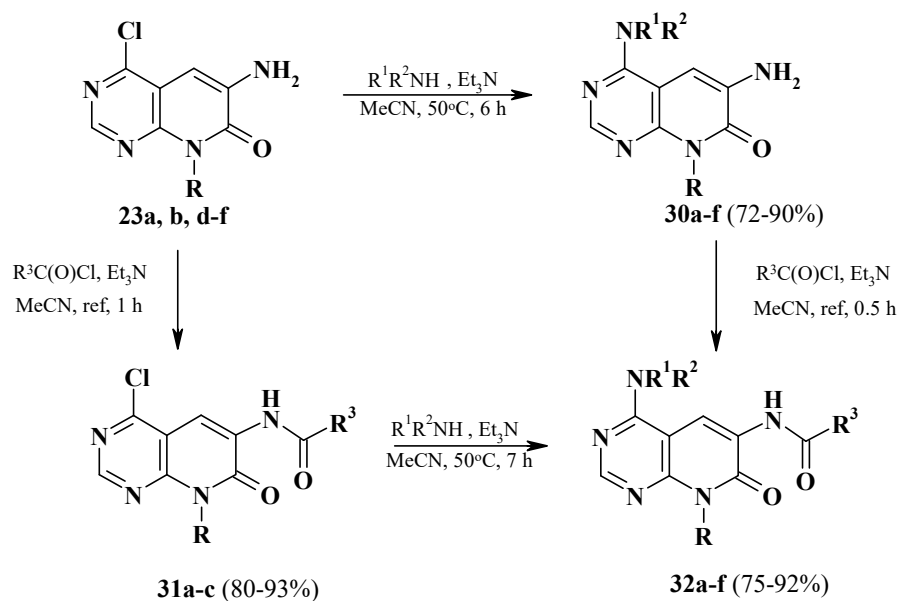


Рис. 2. Структури та виходи піридо[2,3-*d*]піримідинів **23a, b, d-t**, синтезованих способом «one-pot».

Одержані похідні 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону **23a-t** представляють інтерес як перспективні сполуки для подальших ціленаправлених синтезів. За допомогою реакції нуклеофільного заміщення рухливого атома хлору та реакції ацилювання одержані функціональнозаміщені піридо[2,3-*d*]піримідин-7-они **30-32** з високими виходами (схема 12).

Схема 12



$\text{R} = \text{H}$ (**a, 30, 32f**), $\text{CH}_2\text{C(O)OMe}$ (**b**), Me (**23d, 30-32c**), Et (**23e, 30, 32d**), $n\text{-Pr}$ (**23f, 30, 32e**);
 $\text{NR}^1\text{R}^2 = \text{NHPr}$ (**a, c**), morpholin-4-yl (**b, d**), piperidin-1-yl (**e**), NHPh (**f**); $\text{R}^3 = \text{Me}$ (**a, b, d**), Ph (**c, e**), $4\text{-MeOC}_6\text{H}_4$ (**f**).

Таким чином, на основі ряду доступних 4-хлоропіримідин-5-карбальдегідів розроблений простий та ефективний метод синтезу похідних 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону, поліфункціональний характер яких забезпечує можливість їх використання як будівельних блоків в синтезі нових біологічно активних сполук.

4,7-Функціонально заміщені піридо[2,3-*d*]піримідини як інгібітори протеїнкінази СК2

Розгляд структурних особливостей похідних піридо[2,3-*d*]піримідину та порівняння їх будови з відомими препаратами (*Ibrance*, *Pamapimod*) свідчить про доцільність пошуку нових інгібіторів протеїнкіназ серед отриманих речовин (рис.3).

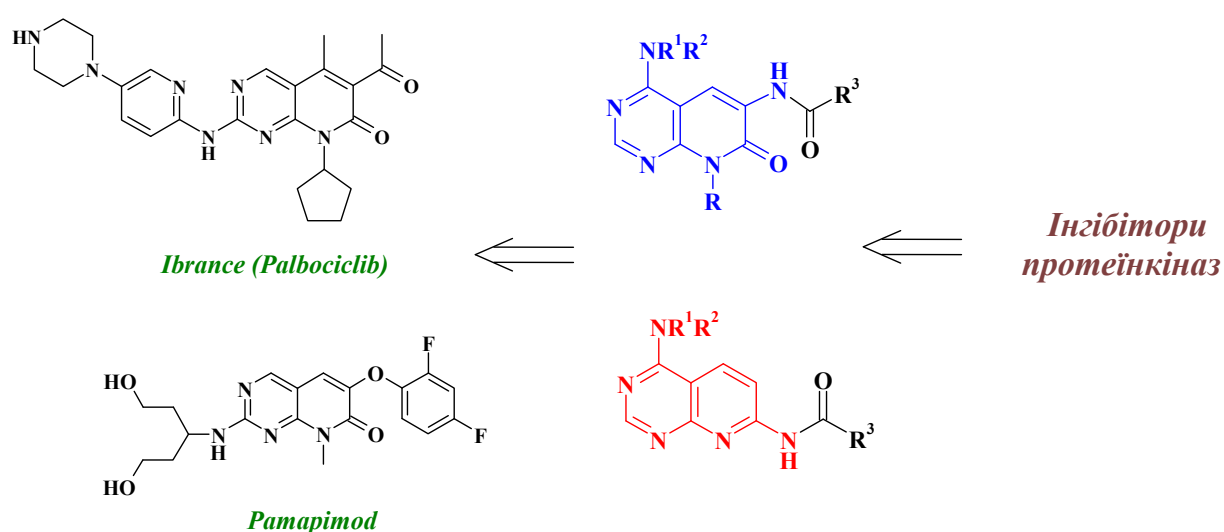


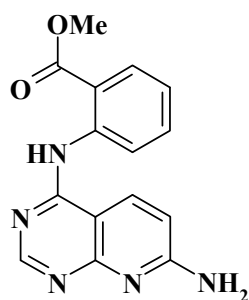
Рис. 3. Структурні особливості похідних піридо[2,3-*d*]піримідину для пошуку інгібіторів протеїнкіназ

Об'єктом докінгу похідних піридо[2,3-*d*]піримідину обрана серин-треонінова протеїнкіназа СК2 (Casein Kinase 2) – молекулярна мішень для розробки нових лікарських засобів (протипухлинних та антивірусних).

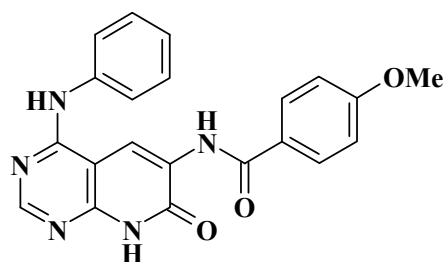
Для проведення аналізу зв'язування колекції з 3408 сполук було використано рецептор-орієнтований віртуальний скринінг. Докінг проводився в АТФ зв'язувальні сайти протеїнкінази СК2. В результаті віртуального скринінгу було відібрано 14 сполук з високими розрахованими енергіями зв'язування з рецептором. Проведене біохімічне тестування інгібувальної активності *in vitro* щодо протеїнкінази СК2 показало, що із відібраних сполук дві проявляють інгібувальну активність в мікромольних концентраціях – метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]бензоат (**21d**) і *N*-(4-аніліно-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-*d*]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід (**32f**) (рис. 4).

Для пояснення даних біохімічних тестів проаналізовані комплекси сполук **21d** та **32f** із АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2 (рис. 5). Піридо[2,3-*d*]піримідиновий гетероцикл сполуки **32f** розташований в аденін-акцепторному сайті АТФ-зв'язувального сайту СК2. Водневий зв'язок із шарнірною ділянкою

утворюється між NH гетероциклу та карбонільною групою амінокислотного залишку Val 116.



21d

 $IC_{50} = 6,0 \mu M$


32f

 $IC_{50} = 19,5 \mu M$

Рис. 4. Структури сполук, які проявляють інгібувальну активність щодо СК2

Замісник, що знаходиться в положенні 6 гетероциклу, направлений вглиб сайту зв'язування та формує стекінг із Phe 113. Замісник у положенні 4 направлений до виходу із сайту зв'язування та має гідрофобні контакти з амінокислотним залишком Leu 45.

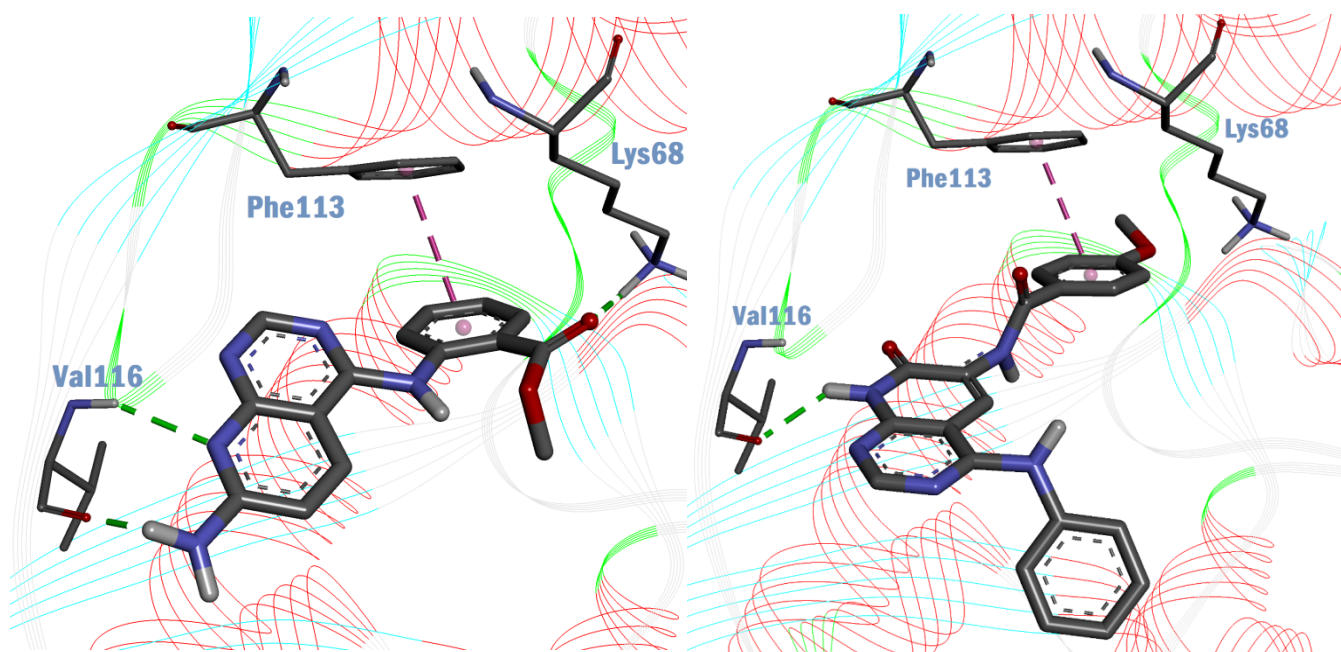


Рис. 5. Спосіб зв'язування сполук **21d** та **32f** із АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2

Гетероцикл сполуки **21d** розташовується у АТФ-акцепторному сайті дзеркально в порівнянні зі сполукою **32f** і при цьому глибше занурений. При взаємодії утворюється два водневі зв'язки із шарнірною ділянкою, які формуються між атомом нітрогену гетероциклу і NH групою амінокислотного залишку Val 116 та між аміногрупою в положенні 7 гетероциклічного кільця та карбонільною групою Val 116. Замісник в положенні 4 направлений вглиб АТФ-акцепторного сайту та

формує стекінг із Phe 113 і водневий зв'язок із Lys 68. Отже, сполука **21d** має більше взаємодій із амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту, що може пояснити її в тричі більшу активність IC_{50} 6,0 μ M порівняно із 19,5 μ M.

Таким чином, проведені дослідження *in vitro* показали перспективи пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних піридо[2,3-*d*]піримідину.

Четвертий розділ є експериментальною частиною, в якій наведено методики синтезу функціонально заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину, фізико-хімічні константи синтезованих сполук, дані ЯМР- та хромато-мас-спектроскопії.

ВИСНОВКИ

В результаті виконання дисертаційного дослідження синтезовано ряд нових 4,7-функціонально заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину реакціями внутрішньомолекулярної циклізації продуктів конденсації доступних піримідин-5-карбальдегідів.

1. Вивчена взаємодія 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з функціоналізованими трифенілфосфораніліденами. Показано, що (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилонітрил виявився перспективним для одержання нових 4-амінозаміщених похідних 7-імінопіридо[2,3-*d*]піримідину.
2. Розроблено зручні та препаративні методи синтезу похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону, що містять залишки первинних та вторинних амінів в положенні 4 гетероциклічної системи.
3. Знайдено ефективний підхід до одержання раніше недоступного 7-аміно-4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідину, корисного для цілеспрямованих синтезів піридо[2,3-*d*]піримідин-4,7-діамінів.
4. Показано, що (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилонітрил виявився перспективним для одержання нових 4-амінозаміщених похідних 7-імінопіридо[2,3-*d*]піримідину.
5. Встановлено, що взаємодія 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з естерами гліцину приводить до невідомих раніше *N*-(5-формілпіримідин-4-іл)гліцинатів та продуктів їх циклізації – похідних піридо[2,3-*d*]піримідину та піридо[2,3-*d*]піримідину.
6. Запропоновано простий та ефективний «*one-pot*» спосіб одержання нових 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів реакцією 4-амінозаміщених піримідин-5-карбальдегідів з метил *N*-(4-метоксибензиліден)гліцинатом.
7. Досліджено інгібувальну активність похідних піридо[2,3-*d*]піримідину та встановлено, що метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]бензоат і *N*-(4-аніліно-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-*d*]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід інгібують протеїнкіназу СК2 з IC_{50} 6,0 та 19,5 μ M відповідно.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зінченко Г.М. Зручний підхід до синтезу нових 4-амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону / Г.М. Зінченко, Л.В. Музичка, Є.В. Вервес, О.Б. Смолій // Журн. орг. фарм. хімії. – 2016. – Т. 14, №4 (56). – С. 40-47 (*Особистий внесок здобувача: збір літературних даних, проведення експериментальних досліджень, доказ будови отриманих сполук*).
2. Zinchenko A.N. Synthesis of new 4-amino-substituted 7-iminopyrido[2,3-*d*]pyrimidines / A.N. Zinchenko, L.V. Muzychka, I.I. Biletskii, O.B. Smolii // Chem. Heterocycl. Comp. – 2017. – Vol. 53, №5. – P. 589-596 (*Особистий внесок здобувача: проведення експериментальної частини роботи, аналіз та інтерпретація отриманих даних, встановлення будови синтезованих сполук*).
3. Zinchenko A.N. Synthesis and biological evaluation of novel amino-substituted derivatives of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine as inhibitors of protein kinase CK2 / A.N. Zinchenko, L.V. Muzychka, O.B. Smolii, V.G. Bdzhola, M.V. Protopopov, S.M. Yarmoluk // Biopolym. Cell. – 2017. – Vol. 33, №5. – P. 367-378 (*Особистий внесок здобувача: літературний пошук, проведення хімічного синтезу сполук, написання статті*).
4. Зінченко Г.М. Вивчення взаємодії 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з естерами гліцину / Г.М. Зінченко, Л.В. Музичка, І.І. Білецький, О.Б. Смолій // Журн. орг. фарм. хімії. – 2018. – Т. 16, №1 (61). – С. 42-48 (*Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, встановлення будови отриманих сполук, обговорення отриманих результатів*).
5. Zinchenko A.M. One-pot synthesis of 6-aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-ones / A. M. Zinchenko, L. V. Muzychka, O. V. Kucher, I. V. Sadkova, P. Mykhailiuk, O. B. Smolii // Eur. J. Org. Chem. – 2018. – Vol. 2018, №46. – P. 6519-6523 (*Особистий внесок здобувача: літературний пошук, розробка синтетичної процедури, виконання синтетичної частини, аналіз спектральних даних, оформлення експериментальної частини*).
6. Смолій О.Б. Циклоконденсації на основі похідних 5-форміл-6-хлоропіримідину / О.Б. Смолій, Л.В. Музичка, О.В. Кучер, Г.М. Зінченко // Тези доповідей XXIII Української конференції з органічної хімії. – Чернівці. – 2013. – С.168.
7. Zinchenko A.M. Synthesis of new derivatives of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine as potential inhibitors protein kinases CK2, FGFR1 / A.M. Zinchenko, L.V. Muzychka, O.B. Smolii, V.G. Bdzhola // Abstracts of the Drug Discovery Conference – Riga, Latvia. – 2015. – P.124.
8. Смолій О.Б. Синтез нових функціонально заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину як потенційних інгібіторів протеїнкіназ CK2 та FGFR1 / О.Б. Смолій, Л.В. Музичка, Г.М. Зінченко, О.В. Кучер // Тези доповідей VI Української конференції «Домбровські хімічні читання» – Чернівці. – 2015. – С.46.

9. Зінченко Г.М. Синтез нових похідних 4-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону / Г.М. Зінченко, Л.В. Музичка, О.Б. Смолій // Тези доповідей XXIV Української конференції з органічної хімії. – Полтава. – 2016. – С.241.
10. Смолій О.Б. Синтез конденсованих гетероциклічних систем на основі 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду / О.Б. Смолій, Л.В. Музичка, Г.М. Зінченко, І.О. Яремчук, О.В. Кучер, Є.В. Вервес, І.І. Білецький // Тези доповідей VII Української конференції «Домбровські хімічні читання» – Яремче. – 2017. – С.41.
11. Zinchenko A.M. Reaction 4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde and glycine esters / A.M. Zinchenko, L.V. Muzychka, O.B. Smolii // Abstracts of the IX International Conference in Chemistry Kyiv-Toulouse ICKT-9 – Kyiv. – 2017. – P.189.
12. Зінченко Г.М. Новий підхід до синтезу 4,6-дизаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону / Г.М. Зінченко, Л.В. Музичка, О.Б. Смолій // Abstracts of the I International (XI Ukrainian) scientific conference for students and young scientists «Current chemical problems». – Vinnytsia. – 2018. – P.148.
13. Zinchenko A. Synthesis of new functionally substituted pirido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives on the basis of 4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde / A. Zinchenko, L.V. Muzychka, O.B. Smolii // Abstracts of the 8th International conference «Chemistry of nitrogen containing heterocycles». – Kharkiv. – 2018. – P.159.

АНОТАЦІЯ

Зінченко Г.М. Синтез та властивості 4,7-функціонально заміщених піридо[2,3-*d*]піримідинів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 02.00.10 «Біоорганічна хімія». – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря Національної Академії наук України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена розробці нових та удосконалення вже існуючих підходів до синтезу 4,7-функціонально заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину, а також з'ясування перспектив одержаних структур для пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2.

На основі продуктів конденсації доступних піримідин-5-карбальдегідів реакціями внутрішньомолекулярної циклізації синтезовано ряд невідомих раніше функціоналізованих представників піридо[2,3-*d*]піримідину.

Показано, що при взаємодії 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з ціанометилтрифенілфосфораном утворюється (2*E*)-3-(4,6-дихлоропіримідин-5-іл)акрилонітрил, котрий виявився перспективним для одержання нових 4-амінозаміщених похідних 7-імінопіридо[2,3-*d*]піримідину. Продемонстрована можливість отримання низки заміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону, що містять залишки вторинних амінів в положенні 4 гетероциклічної системи, одноколбовим двостадійним способом з етил (2*E*)-3-(6-аміно-4-хлоропіримідин-5-іл)акрилату. Розроблено декілька зручних методів синтезу похідних піридо[2,3-

d]піримідин-7-ону з різноманітними азотовмісними замісниками в положенні 4 гетероциклічної системи.

Знайдено ефективний підхід до одержання раніше недоступного 7-аміно-4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідину, корисного для цілеспрямованих синтезів піридо[2,3-*d*]піримідин-4,7-діамінів.

Досліджено реакції 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегіду з метил- та *трет*-бутилгліцинатами, а також встановлено, що реакція 4,6-дихлоро-5-формілпіримідину з гідрохлоридами естерів гліцину в присутності триетиламіну приводить до одержання нових похідних *N*-(5-формілпіримідин-4-іл)гліцинату та продуктів циклізації – 4-хлоро-5-гідрокси-6,7-дигідро-5*H*-піроло[2,3-*d*]піримідин-6-карбоксилату і 6-аміно-4-хлоропіридо[2,3-*d*]піримідин-7-ону.

Вперше запропоновано простий, швидкий та препаративно зручний підхід («*one-pot*») до синтезу невідомих раніше 6-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-7-онів реакцією 4-амінозаміщених піримідин-5-карбальдегідів з метил *N*-(4-метоксибензиліден)гліцинатом.

В ряду нових амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину проведено пошук інгібіторів протеїнкінази СК2 людини. Біохімічне тестування інгібувальної активності *in vitro* щодо протеїнкінази СК2 показало, що із 14 сполук, відібраних за допомогою віртуального скринінгу, дві проявляють інгібувальну активність в мікромолярних концентраціях – метил 2-[(7-амінопіридо[2,3-*d*]піримідин-4-іл)аміно]бензоат ($IC_{50} = 6,0 \mu M$) і *N*-(4-аніліно-7-оксо-7,8-дигідропіридо[2,3-*d*]піримідин-6-іл)-4-метоксибензамід ($IC_{50} = 19,5 \mu M$). Проаналізовані комплекси перспективних сполук із АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази СК2 вказали на подальші структурні модифікації піридо[2,3-*d*]піримідинового циклу для пошуку нових біологічно активних сполук в ряду амінозаміщених похідних піридо[2,3-*d*]піримідину.

Ключові слова: піридо[2,3-*d*]піримідини, 4,6-дихлоропіримідин-5-карбальдегід, внутрішньомолекулярна циклізація, протеїнкіназа СК2, інгібувальна активність.

SUMMARY

Zinchenko H.M. Synthesis and properties of 4,7-functionally substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of a Candidate of Chemical Sciences (Doctor of Philosophy) in specialty 02.00.10 «Bioorganic chemistry». – V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to development of new and improvement existing approaches to the synthesis of 4,7-functionally substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidines

derivatives, and also to find out the prospects of the obtained structures for the search inhibitors of protein kinase CK2.

On the basis of the condensation products of the available pyrimidine-5-carbaldehydes, a number of new functionalized representatives of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine were synthesized by intramolecular cyclization reactions.

It is shown that the interaction of 4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde with cyanomethyltriphenylphosphorane produces (2*E*)-3-(4,6-dichloropyrimidine-5-yl)acrylonitrile, which proved to be promising for the preparation of new 4-substituted 7-aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. The possibility of obtaining by one-pot two-stage method a number of substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-7-one derivatives has been demonstrated, containing residues of secondary amines at position 4 of the heterocyclic system, from ethyl (2*E*)-3-(6-amino-4-chloropyrimidin-5-yl)acrylate. Developed a convenient method of synthesizing of pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one derivatives with various nitrogen-substituted in position 4 of heterocyclic systems. An effective approach to obtaining previously unavailable 7-amino-4-chloropyrido[2,3-*d*]pyrimidine useful for purposeful synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-4,7-diamines has been found.

Reactions of 4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde with methyl- and *tert*-butylglycinates were investigated. It was found that the reaction of 4,6-dichloro-5-formylpyrimidine with glycine ester hydrochlorides in the presence of triethylamine results in new derivatives of *N*-(5-formylpyrimidin-4-yl)glycinate and cyclization products – 4-chloro-5-hydroxy-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylate and 6-amino-4-chloropyrido[2,3-*d*]pyrimidine-7-one.

For the first time, a simple, fast and convenient («*one-pot*») approach to the synthesis of previously unknown 6-aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine-7-ones by the reaction of 4-amino-substituted pyrimidine-5-carbaldehydes from methyl *N*-(4-methoxybenzylidene)glycinate was proposed.

The inhibitors of human protein kinase CK2 was searched in a number of new amino-substituted derivatives of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine. During biochemical testing *in vitro* of inhibitory activity protein kinase CK2 showed that of the 14 selected compounds the two exhibited inhibitory activity of protein kinase CK2. Methyl 2-[(7-aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)amino]benzoate and *N*-(4-anilino-7-oxo-7,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-6-yl)-4-methoxybenzamide were determined to inhibit kinase CK2 in IC₅₀ 6,0 and 19,5 μM respectively. Complexes of compounds with the ATP-binding site of human protein kinase CK2 have been analyzed to explain the data of biochemical testing. It was indicated to the further chemical optimization of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines to increase for biologically active compounds in a number of amino-substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives.

Keywords: pyrido[2,3-*d*]pyrimidine, 4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde, intramolecular cyclization, protein kinase CK2, the inhibition activity.