

Міністерство охорони здоров'я України  
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

ЛОЗИНСЬКИЙ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 547.789.1:615.012.1]073/.076

### ДИСЕРТАЦІЯ

ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІ КОНДЕНСОВАНІ ТА НЕКОНДЕНСОВАНІ  
ПОХІДНІ ТІАЗОЛУ/ТІАЗОЛДИНОНУ: СПРЯМОВАНИЙ СИНТЕЗ, ФІЗИКО-  
ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ


15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

226 – фармація, промислова фармація

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів та текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

  
\_\_\_\_\_ А. В. Лозинський

Науковий консультант Лесик Роман Богданович,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Львів -2023

## АНОТАЦІЯ

*Лозинський А. В.* Поліфункціональні конденсовані та неконденсовані похідні тiazолу/тiazолідинону: спрямований синтез, фізико-хімічні властивості та біологічна активність. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2023.

Дисертаційна робота присвячена спрямованому синтезу нових поліфункціональних конденсованих та неконденсованих похідних тiazолу/тiazолідинону, вивченню їх фізико-хімічних, фармакологічних властивостей та встановленню молекулярних механізмів реалізації їх біологічної активності як основи для створення потенційних лікоподібних молекул.

Проведено огляд літературних даних, що узагальнює сучасні підходи до синтезу поліфункціональних конденсованих похідних на основі тiazолу/тiazолідинону, зокрема пірано[2,3-*d*]тiazолів, анельованих похідних тiazолу із шестичленними азагетероциклами, похідних хінону з фрагментом тiazолу/тiazолідинону; охарактеризовано механізми реалізації біологічної активності функціонально-заміщених похідних тiazолу/тiazолідинону.

На основі розроблених синтетичних методик синтезовано нові класи неописаних в літературі похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону, які одержані взаємодією 4-аміно-5*H*-тiazол-2-ону з електрофілами, зокрема похідними бензиліденацетону, бензиліденацетофенону та ариліденпіровиноградних кислот в умовах реакцій [3+3]-циклоконденсації. Для похідних 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротiazоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот здійснено оптимізацію структури шляхом введенням амідної групи, що призвело до отримання сполук з широким спектром біологічної активності. Серед похідних амідів тiazоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот ідентифіковано дві сполуки з високою протипухлинною активністю із середніми значеннями  $GI_{50}/TGI$  1,57/7,31 мкМ та 2,01/15,71 мкМ,

відповідно. Для похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону проведено поглиблене *in vitro* вивчення цитотоксичної дії з використанням МТТ, лізосомного (NRU) та LDH тестів, а також досліджено загальний вміст білка на клітинах гепатоцелюлярної карциноми HepG2, гліоми щура С6, гліобластоми людини U-373, епідермальної карциноми людини KB-3-1, гострого промієлоцитарного лейкозу людини HL-60, колоректальної карциноми людини HCT116, нормальних фібробластах Valb/c 3T3, псевдонормальних кератиноцитах людини HaCat та ембріональних клітинах нирки людини HEK293, що дозволило встановити високу протиракову цитотоксичність досліджуваних сполук та низький профіль токсичності щодо псевдонормальних клітин. Пошук антимікробних агентів серед похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону дозволив ідентифікувати 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-он, який проявляє високий рівень інгібування росту *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Candida albicans* (MIC = 0,21-0,83 мкМ). При проведенні скринінгу протимікробної активності виділено 2-оксо-7-стирил-2,3-дигідротiazоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонову кислоту, яка проявила високий рівень синергічної дії з амоксициліном щодо збудників ESβL+ *K. pneumoniae* та метицилін-резистентного *S. haemolyticus* (MRSH). Докінгові дослідження проведені для 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону дозволили передбачити вірогідний афінитет даної сполуки до MurD-лігази та ДНК-гірази, як біомішеней, що забезпечують реалізацію протимікробної активності. Серед похідних 5,7-діарил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону ідентифіковано сполуки з високим рівнем антитрипаносомної активності щодо збудника *Trypanosoma brucei brucei*, яка співмірна з дією препарату порівняння ніфуртимокс.

Вперше синтезовано низку *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-6-(4-феніл)-8-фенетил-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тiazол-2,5,7(6*H*)-тріонів та *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тiazол-2,5,7(6*H*)-тріонів в умовах трикомпонентної реакції 4-тіоксо-2-тiazолідинону, 3-фенілпропаналю/3,7-диметилокта-2,6-дієналю (цитралю) та *N*-фенілмалеїнімідів як дієнофілів у присутності етилендіамоній діацетату (ЕДДА) як каталізатора. Встановлено, що

використання цитралю у даному типі перетворень супроводжується перебігом двох конкурентних реакцій: *гетеро*-Дільса-Альдера та нуклеофільного приєднання (реакція Міхаеля) з утворенням відповідних похідних тіопіранотіазолу та аддуктів Міхаеля, які були відокремлені за допомогою колонкової хроматографії. Досліджено взаємодію 4-тіоксо-2-тіазолідинону з *N*-фенілмалеїнімідами в умовах реакції тіа-приєднання за Міхаелем в результаті якої отримано похідні 1-(4-феніл)-3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідин-2,5-діону. Вперше встановлено, що реакція 4-тіоксо-2-тіазолідинону та *орто*-галогенозаміщених альдегідів призводить до одержання нових похідних 1,4-дитіа-3-азо-циклопента[*b*]нафтален-2-ону, 1,4-дитіо-3,5-діазо-циклопента[*b*]антрацен-2-ону та 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріазо-*s*-індацен-6-ону. Виявлено, що метиловий естер (2,4-діоксотіоксотіазолідин-5-іліден)-оцтової кислоти діастереоселективно реагує з *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти і 1,4-нафтохіноном в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера з утворенням нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу. У даному типі перетворень *N*-фенілмалеїніміди утворюють продукти з *транс*-конфігурацією 5-Н, 6-Н і 7-Н протонів, тоді як іміди 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти утворюють ізомери з *цис*-конфігурацією хіральних центрів 4а-Н, 5а-Н, 8а-Н, 9а-Н і 10-Н. При використанні диметилцетилендикарбоксилату як дієнофілу відбулося утворення не прогнозованого триметил (7*S*)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату, а продукту його оксидації – триметил 2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату. Встановлено, що ефективним підходом до синтезу 5-аміно-7-арил-2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазоло-6-карбонітрилів є використання реакції приєднання за Міхаелем 5-ариліденізороданінів з малонодинітрилом. Для синтезованих похідних тіопіранотіазолу вперше проведено кислотний та лужний гідроліз, що призвів до утворення не очікуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазоло-6-карбонових кислот та їх амідів, а вихідного 5-ариліденізороданіну.

Проведено синтез 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера використовуючи похідні нафтохінону (гідроксинафтален-1,4-діон, 5-гідроксинафтален-1,4-діон (юглон) та 5-метоксинафтален-1,4-діон (О-метилюглон))



як дієнофіли та 5-іліден-4-тіоксо-2-тіазолідонони як гетеродієни. Запропоновано метод синтезу 11-фенетил-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріонів в умовах трикомпонентної реакції 4-тіоксо-2-тіазолідинону, 3-фенілпропіональдегіду та відповідних похідних 1,4-нафтохінону як дієнофілів в середовищі ацетонітрилу у присутності етилендіамоній діацетату (ЕДДА) як каталізатора. Дослідження протипухлинної активності в рамках програми DTP NCI дозволило ідентифікувати похідні тіопіранотіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону у структурі, що володіють високою антимітотичною активністю щодо абсолютної більшості досліджуваних ліній ракових клітин. Поглиблені дослідження *in vitro* цитотоксичності даного класу похідних дало змогу ідентифікувати високоактивні сполуки щодо раку товстої кишки лінії НСТ-116, раку молочної залози MCF-7 та раку шийки матки лінії KB3-1 із значеннями IC<sub>50</sub> в межах 0,60-0,95 мкМ та низькою токсичністю щодо епідермальних кератиноцитів людини лінії HaCaT. Результати дослідження двох сполук-хітів методом флуоресцентної мікроскопії після фарбування барвником Hoechst-33342 дозволило встановити значні цитоморфологічні зміни в клітинах раку шийки матки лінії KB3-1 подібно до референс-препарату доксорубіцину. При проведенні докінгових досліджень 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону окреслено ймовірні молекулярно-біологічні шляхи реалізації протипухлинної дії, зокрема інгібування β-трансформуючого фактора росту пухлин (TGF-β). Використання методу проточної цитометрії дозволило встановити високу апоптичну здатність сполук-хітів з класу похідних тіопіранотіазолу на основі 1,4-нафтохінону, яка реалізується шляхом активації каспаз 3/7, 8 та 9 та зміною мітохондріального потенціалу у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231. Встановлено високу здатність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону до взаємодії з ДНК, що підтверджено високим рівнем конкурентного витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК в межах 42,5-66,4 %, а також здатністю до зміни величини чистої зміни абсорбції (NetAbs) в реакції окиснення KMnO<sub>4</sub> піримідинових основ в областях пошкодження ДНК. Доведено здатність двох сполук-хітів з даного класу до зниження рівня відновленого глутатіону шляхом утворення ковалентних GS-

адуктів, що підтверджує їх високі антиоксидантні властивості. Вивчення *in vivo* гострої токсичності 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону показало суттєво нижчий токсичний ефект на мишей лінії C57BL/6 ніж препарат порівняння доксорубіцин.

Скринінг протимікробної активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу дозволив ідентифікувати похідні 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот та 6'-(4-бромофеніл)-4а',7а'-дигідро-5'*H*-спіро[циклогексан-1,8'-піроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол]-2',5',7'(3'*H*,6'*H*)-тріон з найбільшою активністю щодо *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis* ССМ 7221 та *Candida albicans*. Запропоновано гіпотетичну фармакофорну модель для оцінки прояву протистафілококової активності для сполук-хітів на основі 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот використовуючи програмний пакет МОЕ 2007.09. Скринінг протитрипаносомної активності щодо *Trypanosoma brucei gambiense* дозволив ідентифікувати три «сполуки-хіти» з групи амідів 5-феніл-7-арил(гетерил)-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонових кислот з ефектом на рівні мікро- та субмікромолярних значень інігібуючих концентрацій.

Одержано кон'югати 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів із лектинами та людським сироватковим альбуміном, що володіли цитотоксичним ефектом щодо ліній клітин аденокарциноми товстої кишки людини НСТ 116, лейкемії миші L1210, Т-лімфобластної лейкемії людини Jurkat та були нетоксичними на нормальні та псевдонормальні клітинні лінії. Вивчення цитотоксичного ефекту ряду хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолів дозволив ідентифікувати їхню активність щодо лімфобластної лейкемії людини Jurkat та раку молочної залози лінії MCF-7 з низькими показниками токсичності на псевдонормальні клітини кератиноцитів людини лінії HaCaT у порівнянні з референс-препаратом доксорубіцином.

На основі розроблених синтетичних методик отримано поліфункціональні 1(2)-гідразиноантрахінони в умовах реакції азосполучення 1(2)-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону та метиленактивних сполук, включно з

похідними тiazолідинону. Скринінг протипухлинної активності поліфункціональних 1-гідразианоантрахінонів дозволив ідентифікувати сполуки хіти із високими показниками пригнічення росту ракових клітин основних онкозахворювань. Вивчення протимікробної активності антрахінонгідразонових кон'югатів дало змогу виділити сполуки-хіти, що володіли високими показниками інгібування росту *Candida albicans*. Результати вивчення антиоксидантних властивостей даного класу сполук дозволили виокремити 5-[(9,10-діоксо-9,10-дигілроантрацен-1-л)-гідразоно]-2,2-диметил-[1,3]діоксан-4,6-діон з помірним профілем ефекту з величиною інгібування радикалів ДФПГ в межах 62,8%.

У рамках гібрид-фармакофорного підходу синтезовано ряд 5-індоліден роданін-3-пропіонових/етансульфонових кислот та 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенонів. Серед останніх виділено сполуки із протираковою активністю. Для даних класів гетероциклічних похідних встановлено помітну протимікробну активність щодо збудників *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, *Pseudomonas aeruginosa* та грибів роду *Candida*. Для 3-[5-(1*H*-індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонової кислоти встановлено значний активуючий вплив на ланки клітинного імунітету та показники фагоцитарної активності. Наступними об'єктами представленого дослідження були похідні тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у молекулі та їх структурні аналоги. Дослідження протитрипаносомної активності наведеної групи сполук в *in vitro* експериментах на кров'яних формах *Trypanosoma brucei brucei* дозволив ідентифікувати дві сполуки-хіти зі значеннями  $IC_{50}$  4,80 та 7,06 мкМ, відповідно. Скринінг антиексудативної активності згаданого класу сполук дозволив виділити агенти із величиною пригнічення запальної реакції, яка була співмірною або перевищувала диклофенак натрію та кеторолаку трометамін. Вивчення протипухлинної активності ряду похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі привело до 2-[2-(2,6-дихлорофеніламіно)-феніл]-N-{5-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен]-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл}-ацетаміду із суттєвою антимиотичною активністю при середніх значеннях показників  $GI_{50}/TGI$  0,71/1,09 та 82,95/28,46 мкМ. За допомогою

комплексних *in silico* досліджень фізико-хімічних властивостей, параметрів ADME, фармакокінетики і лікоподібності було виявлено значний потенціал для подальших досліджень серед піразол-тіазолідинонових гібридних молекул.

Результати вивчення протисудомної активності дарбуфелону, його структурних аналогів та деяких похідних на основі 4-тіазолідинону дозволила встановити високий антиконвульсантний ефект даних сполук на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом. Встановлено, що сполука-хіт 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон має здатність впливати на циклооксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти, а також проявляє виражену нейропротекторну активність. На основі результатів молекулярного докінгу було спрогнозовано, що досліджувана сполука має високий ступінь зв'язку з кількома біомішенями, пов'язаними з процесами запалення, зокрема з ЦОГ-1/ЦОГ-2, 5-LOX та FLAP. Для даної сполуки також було проведено дослідження психотропних властивостей та встановлено відсутність впливу на локомоторну, орієнтовно-дослідницьку, емоційну активність та її вегетативний супровід, тривожність, депресивну поведінку, формування пам'ятного сліду. Вивчення фригопротекторного ефекту дарбуфелону та його структурних аналогів на моделі гострого загального охолодження вказує на високу активність досліджуваних сполук, яка перевищує ефективність стандартних лікарських засобів, таких як неселективні та селективні інгібітори ЦОГ.

Структуру та чистоту синтезованих сполук підтверджено методами елементного аналізу,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопії, рентгеноструктурного аналізу та мас-спектрометрії, тонко-шарової хроматографії.

*Ключові слова:* похідні 4-тіазолідинону, похідні 1,4-нафтохінону, похідні антрахінону, гібрид-фармакофорний підхід, біологічна активність, цитотоксичність, спектроскопія ЯМР, рентгеноструктурний аналіз.

## ANNOTATION

*Lozynskyi A.V.* Polyfunctional condensed and non-condensed thiazole/thiazolidinone derivatives: directed synthesis, physicochemical properties and biological activity. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a doctor of pharmaceutical science degree in speciality 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2023.

The dissertation work is devoted to the directed synthesis of new polyfunctional condensed and non-condensed thiazole/thiazolidinone derivatives, the study of their physicochemical, pharmacological properties, and the establishment of molecular mechanisms of their biological activity as a basis for the creation of potential drug-like molecules.

A review of literature data was conducted, summarizing modern approaches to the synthesis of polyfunctional condensed derivatives based on thiazole/thiazolidinone, in particular pyrano[2,3-*d*]thiazoles, annelated thiazole derivatives with six-membered azaheterocycles, quinone derivatives with a thiazole/thiazolidinone fragment; the mechanisms of biological activity of functionally substituted thiazole/thiazolidinone derivatives were characterized.

Based on the developed synthetic methods, new classes of thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-one derivatives not described in the literature were synthesized, which were obtained by the interaction of 4-amino-5*H*-thiazol-2-one with electrophilic reagents, in particular, benzylidene acetophenones, benzylideneacetones, and arylidene pyruvic acids under the conditions of [3+3]-cyclocondensation reactions. For derivatives of thiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-carboxylic acids, the structure was optimized by introducing an amide fragment, which led to obtaining compounds with a broad spectrum of biological activity. Among the amide derivatives of 2-oxo-7-aryl-2,3-dihydrothiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-carboxylic acids, two hit compounds with antitumor properties were identified with average GI<sub>50</sub>/TGI values of 1.57/7.31 μM and 2.01/15.71 μM, respectively. For thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-one derivatives, an in-depth *in vitro* study of cytotoxicity using MTT, lysosomal (NRU) and LDH tests was carried out, as well as the total protein content on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, glioma rat C6, human glioblastoma U-373, human epidermal carcinoma

KV-3-1, human acute promyelocytic leukemia HL-60, human colorectal carcinoma HCT116, normal Balb/c 3T3 fibroblasts, pseudonormal human HaCat keratonocytes, and HEK293 human embryonic kidney cells that made it possible to establish a high anticancer cytotoxicity of the studied compounds and a low toxicity profile for pseudonormal cells. The search for antimicrobial agents among thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2(3*H*)-one derivatives made it possible to identify 7-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-methyl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-one that exhibits high activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* with MIC values ranging from 0.21 to 0.83  $\mu$ M. As a result of the screening, 2-oxo-7-styryl-2,3-dihydrothiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-carboxylic acid was isolated, which showed a high synergistic effect with amoxicillin to clinical strains ES $\beta$ L+ *K. pneumonie* and methicillin- resistant *S. haemolyticus* (MRSH). Carrying out molecular docking for 7-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-methyl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-one made it possible to predict the probable affinity of this compound to biotargets that ensure the realization of antimicrobial activity, namely MurD ligases and DNA gyrases. Among the 5,7-diaryl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-one derivatives, compounds with a high level of antitrypanosomal activity against the pathogen *Trypanosoma brucei brucei*, which is comparable to the action of the comparison drug nifurtimox, were identified.

Several *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-6-(4-phenyl)-8-phenethyl-3,4*a*,7*a*,8-tetrahydropyrrolo[3',4':5,6]thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-2,5,7(6*H*)-triones and *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl)-3,4*a*,7*a*,8-tetrahydropyrrolo[3',4':5,6]thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-2,5,7(6*H*)-triones under the conditions of the three-component reaction of 4-thioxo-2-thiazolidinone, 3-phenylpropanal/3,7-dimethylocta-2,6-dienal (citral) and *N*-phenylmaleinimides as dienophiles in the presence of ethylenediammonium diacetate (EDDA) as a catalyst was synthesized. It was established that the use of citral in this type of transformation is accompanied by the course of two competitive reactions: *hetero*-Diels-Alder and nucleophilic addition (Michael reaction) with the formation of the corresponding thiopyranothiazole derivatives and Michael adducts, which were separated using column chromatography. The interaction of 4-thioxo-2-thiazolidinone with *N*-phenylmaleinimides under the conditions of the thia-Michael addition was studied providing 1-(4-phenyl)-3-((2-

oxo-2,3-dihydrothiazol-4-yl)thio)pyrrolidine-2,5-dione derivatives. It was established for the first time that the reaction of 4-thioxo-2-thiazolidinone and *ortho*-halogen substituted aldehydes leads to the obtaining of new derivatives of 1,4-dithia-3-azocyclopenta[*b*]naphthalen-2-one, 1,4-dithio-3,5-diazo-cyclopenta[*b*]anthracen-2-one and 3-methyl-1-phenyl-3*H*-5,8-dithio-1,2,7-triazo-*s*-indacen-6-one. It was found that (2,4-dioxothioxothiazolidin-5-ylidene)-acetic acid methyl ester reacts diastereoselectively with *N*-phenylmaleinimide, 5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid imides, and 1,4-naphthoquinone under the conditions of the *hetero*-Diels-Alder reaction with the formation of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives. In this type of transformation, *N*-phenylmaleimides form products with *trans*-configuration of 5-H, 6-H, and 7-H protons, while imides of 5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid form isomers with *cis*-configuration of 4a-H, 5a-H, 8a-H, 9a-H and 10-H chiral centers. When using dimethyl ethylene dicarboxylate as a dienophile, the unpredicted trimethyl (7*S*)-2-oxo-3,7-dihydro-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-5,6,7-tricarboxylate was formed, and its oxidation product namely, trimethyl 2-oxo-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-5,6,7-tricarboxylate. It was established that an effective approach to the synthesis of 5-amino-7-aryl-2-oxo-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazolo-6-carbonitrile is the use of the Michael addition reaction of 5-arylideneisorhodanines with malonodinitrile. For the first time, acid and alkaline hydrolysis of the synthesized thiopyranothiazole derivatives was carried out, which led to the formation of not the expected thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carboxylic acids and their amides, but the starting 5-arylideneisorhodanine.

The synthesis of 11-substituted-3,5,10,11-tetrahydro-2*H*-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-*d*][1,3]thiazole-2,5,10-triones via the *hetero*-Diels-Alder reaction using naphthoquinone derivatives (hydroxynaphthalene-1,4-dione, 5-hydroxynaphthalene-1,4-dione (juglone) and 5-methoxynaphthalene-1,4-dione (O-methyljuglone)) as dienophiles and 5-ylidene-4-thioxo-2-thiazolidonones as heterodienes was accomplished. A method for the synthesis of 11-phenethyl-3,11-dihydro-2*H*-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-*d*]thiazole-2,5,10-triones under the conditions of a three-component reaction of 4-thioxo-2-thiazolidinone and 3-phenylpropionaldehyde and corresponding 1,4-naphthoquinone derivatives as dienophiles in acetonitrile medium in the presence of ethylenediammonium diacetate (EDDA) as a catalyst is proposed. The study of

antitumor activity within the framework of the DTP NCI program allowed the identification of thiopyranothiazole derivatives with a 1,4-naphthoquinone fragment in the structure, which have high antimitotic activity against the absolute majority of the studied cancer cell lines. *In-vitro* cytotoxicity studies of this class of derivatives made it possible to identify highly active compounds against HCT-116 colon cancer, MCF-7 breast cancer, and KB3-1 cervical cancer with  $IC_{50}$  values in the range of 0.60-0.95  $\mu$ M and low toxicity against epidermal human keratinocytes line HaCaT. The study results of two hit compounds by fluorescence microscopy after staining with Hoechst-33342 dye made it possible to establish significant cytomorphological changes in cervical cancer cells of the KB3-1 line, similar to the reference drug doxorubicin. During docking studies of 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2*H*-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-*d*]thiazole-2,5,10-trione was outlined probable molecular mechanisms of antitumor effect, in particular inhibition of  $\beta$ -transforming tumor growth factor (TGF- $\beta$ ). The use of the flow cytometry method made it possible to establish a high apoptotic capacity of hit compounds from the class of thiopyranothiazole derivatives based on 1,4-naphthoquinone, which is realized by activating caspases 3/7, 8, and 9 and changing the mitochondrial potential in MDA-MB-231 breast cancer cell line. A high ability of thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives based on 1,4-naphthoquinone to interact with DNA was established, which was confirmed by a high level of competitive displacement of methyl green from its complex with DNA in the range of 42.5-66.4%, as well as the ability to change values of the net change in absorption (NetAbs) in the  $KMnO_4$  oxidation reaction of pyrimidine bases in the regions of DNA damage. The ability of two hit compounds from this class to reduce the glutathione level through the formation of covalent GS-adducts was proven, confirming their high antioxidant properties. Study of *in vivo* acute toxicity of 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2*H*-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-*d*]thiazole-2,5,10-trione showed a significantly lower toxic effect on C57BL/6 mice than the reference drug doxorubicin.

Screening of antimicrobial activity of thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives allowed the identification of 6-benzoyl-2-oxo-7-aryl-3,5,6,7-tetrahydro-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-5-carboxylic acids and 6'-(4-bromophenyl)-4*a*',7*a*'-dihydro-5'*H*-spiro[cyclohexane-1,8'-pyrrolo[3',4':5,6]thiopyrano[2,3-*d*]thiazole]-2',5',7'(3'*H*,6'*H*)-trione



with the highest activity against *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 and *Candida albicans*. A hypothetical pharmacophore model is proposed for evaluating the manifestation of antistaphylococcal activity for hit compounds based on 6-benzoyl-2-oxo-7-aryl-3,5,6,7-tetrahydro-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-5-carboxylic acids using the MOE 2007.09 software package. Screening of antitrypanosome activity against *Trypanosoma brucei gambiense* allowed the identification of three "hit compounds" from the group of 5-phenyl-7-aryl(hetaryl)-3,7-dihydro-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carboxylic acid amides acids with an effect at the level of micro- and submicromolar values of inhibitory concentrations.

Conjugates of 7-substituted 2-oxo-3,5,6,7-tetrahydro-2*H*-thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carbaldehydes with lectins and human serum albumin were obtained, which had a cytotoxic effect against human colon adenocarcinoma HCT 116 cell lines, mouse leukemia line L1210, Jurkat human T-lymphoblastic leukemia, and were nontoxic to normal and pseudonormal cell lines. The study of the cytotoxic effect of a series of chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles allowed us to identify their activity against Jurkat human lymphoblastic leukemia and breast cancer of the MCF-7 line with low toxicity indicators on pseudonormal keratinocyte cells human HaCaT line in comparison with the reference drug doxorubicin.

Based on the developed synthetic methods, polyfunctional 1(2)-hydrazinoanthraquinones were obtained under the azo coupling reaction of 1(2)-(morpholinodiazeyl)anthracene-9,10-dione and methylene-active compounds, including thiazolidinone derivatives. Screening of the anticancer activity of polyfunctional 1-hydrazinoanthraquinones made it possible to identify hit compounds with high rates of inhibition of the growth of cancer cells of the main oncological diseases. The study of the antimicrobial activity of anthraquinone hydrazone conjugates made it possible to identify hit compounds that had high indicators of *Candida albicans* growth inhibition. The results of studying the antioxidant properties of this class of compounds made it possible to isolate 5-[(9,10-dioxo-9,10-digylroanthracen-1-1)-hydrazono]-2,2-dimethyl-[1,3]dioxane-4,6-dione with a moderate effect profile with an inhibition value of DFPG radicals within 62.8%.

Several 5-indolidene rhodanine-3-propionic/ethanesulfonic acids and 1-[2-amino-4-methylthiazol-5-yl]-3-arylpropenones were synthesized within the framework of the hybrid pharmacophore approach. Among the latter, compounds with anticancer activity have been identified. Significant antimicrobial activity against pathogens *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida* fungi was established for these classes of heterocyclic derivatives. For 3-[5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxo-thiazolidin-3-yl]-propionic acid, a significant activating effect on the links of cellular immunity and indicators of phagocytic activity was established. The next objects of the presented research were thiazolidinone derivatives with a diclofenac fragment in the molecule and their structural analogs. Studying the antitrypanosomal activity of the given group of compounds in *in vitro* experiments on blood forms of *Trypanosoma brucei brucei* made it possible to identify two hit compounds with IC<sub>50</sub> values of 4.80 and 7.06 μM, respectively. Screening the antiexudative activity of the mentioned class of compounds made it possible to identify agents with the amount of inhibition of the inflammatory reaction, comparable or higher than diclofenac sodium and ketorolac tromethamine. The study of the antitumor activity of several thiazolidinone derivatives with a diclofenac fragment in the structure led to 2-[2-(2,6-dichlorophenylamino)-phenyl]-*N*-{5-[5-(4-methoxyphenyl)-3-naphthalen-2-yl-4,5-dihydropyrazol-1-ylmethylene]-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl}-acetamide with significant antimitotic activity at average GI<sub>50</sub>/TGI values of 0.71/1.09 and 82.95/28.46 μM. The complex *in silico* studies of physicochemical properties, ADME parameters, pharmacokinetics, and drug similarity revealed significant potential for further research among pyrazole-thiazolidinone hybrid molecules.

The results of the study of the anticonvulsant activity of darbufelon, its structural analogs, and some derivatives based on 4-thiazolidinone made it possible to establish a high anticonvulsant effect of these compounds on the pentylenetetrazole (PTZ) seizure model. It was established that the hit compound 5-[(*Z*)-(4-nitrobenzylidene)]-2-(thiazol-2-ylimino)-4-thiazolidinone can influence the cyclooxygenase pathway of the arachidonic acid cascade, and also exhibits pronounced neuroprotective activity. Based on molecular docking results, it was predicted that the studied compound has a high degree of association with several

biotargets associated with inflammatory processes, particularly with COX-1/COX-2, 5-LOX and FLAP. For this compound, a study of psychotropic properties was also carried out, and it was established that there was no effect on locomotor, orienting-exploratory, emotional activity and its vegetative accompaniment, anxiety, depressive behavior, and the formation of a memory trace. The study of the frigoprotective effect of darbufelone and its structural analogues on the model of acute general cooling indicates a high activity of the studied compounds, which exceeds the effectiveness of standard drugs, such as non-selective and selective COX inhibitors.

The structure and purity of the synthesized compounds were confirmed by the elemental analysis,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, X-ray diffraction analysis, mass spectrometry, and thin-layer chromatography.

*Key words:* 4-thiazolidinone derivatives, 1,4-naphthoquinone derivatives, anthraquinone derivatives, hybrid-pharmacophore approach, biological activity, cytotoxicity, NMR spectroscopy, X-ray diffraction analysis.

*Список публікацій здобувача*

1. Antonyuk, V. O., Klyuchivska, O. Y., Antonyuk, R. V., **Lozynskyi, A. V.**, Pohranychna, K. R., Lesyk, R. B., & Stoika, R. S. (2016). Use of lectin as a vector molecule for delivery of medicinal products to cells and tissues. *Biopolymers and Cell*, 32(6), 461-467. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів досліджень, оформлення статті).
2. Sklyarova, Y., Fomenko, I., Lozynska, I., **Lozynskyi, A.**, Lesyk, R., & Sklyarov, A. (2017). Hydrogen sulfide releasing 2-mercaptoacrylic acid-based derivative possesses cytoprotective activity in a small intestine of rats with medication-induced enteropathy. *Scientia Pharmaceutica*, 85(4), 35. (Особистий внесок – синтез сполук, узагальнення результатів, оформлення статті).
3. Melekh, B., Ilkiv, I., **Lozynskyi, A.**, & Sklyarov, A. (2017). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in rat liver exposed to celecoxib and lansoprazole under epinephrine-induced stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(10), 094-099. (Особистий внесок – дизайн роботи, інтерпретація результатів досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

4. **Lozynskyi, A.**, Zasidko, V., Atamanyuk, D., Kaminsky, D., Derkach, H., Karpenko, O., Ogurtsov, V., Kutsyk, R., & Lesyk, R. (2017). Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of novel thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles based on aroylacrylic acids. *Molecular Diversity*, 21, 427-436. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).
5. **Lozynskyi, A.**, Sabadakh, O., Luchkevich, E., Taras, T., Vynnytska, R., Karpenko, O., Novikov, V., & Lesyk, R. (2018). The application of anthraquinone-based triazenes as equivalents of diazonium salts in reaction with methylene active compounds. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 193(7), 409-414. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).
6. **Lozynskyi, A.**, Zimenkovsky, B., Radko, L., Stypula-Trebas, S., Roman, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2018). Synthesis and cytotoxicity of new thiazolo[4,5-*b*]pyridine-2(3*H*)-one derivatives based on  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones and  $\alpha$ -ketoacids. *Chemical Papers*, 72, 669-681. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР та результатів фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).
7. **Lozynskyi, A.**, Zimenkovsky, B., Ivasechko, I., Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., Stoika, R., & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2,3-dihydrothiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).
8. Шепета, Ю. Л., **Лозинський, А. В.**, Нектегаєв, І. О., & Лесик, Р. Б. (2019). Дослідження антиексудативної активності S-алкілованих похідних 1,3,4-оксадіазол-2-тіолу. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, (12, № 3), 266-269. (Особистий внесок – інтерпретація результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

9. Antonyuk, V. O., Skorohyd, N. R., **Lozynskyi, A. V.**, Antonyuk, R. V., Lesyk, R. B., & Stoika, R. S. (2019). Use of lectins as vector molecules for delivery of drugs to cells and tissues. Report 2. *Biopolymers and Cell*, 35(1), 54-63. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів досліджень, оформлення статті).
10. Юшин, І. М., **Лозинський, А. В.**, Федусевич, О. М., Вовчук, О. Я., & Лесик, Р. Б. (2020). Синтез нових 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів як потенційних біологічно активних сполук. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*, 13(2), 214-218. (Особистий внесок – дизайн роботи, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів).
11. **Lozynskyi, A.**, Zimenkovsky, B., Yushyn, I., Kaminskyu, D., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2020). Synthesis of new structurally diverse thiazolidinone-derived compounds based on reaction of isorhodanine with ortho-substituted aldehydes,  $\alpha$ -keto- and  $\beta$ -aroylacrylic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1217, 128448. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів, оформлення статті).
12. Shepeta, Y., **Lozynskyi, A.**, Sulyma, M., Nektgayev, I., Grellier, P., & Lesyk, R. (2020). Synthesis and biological activity evaluation of new thiazolidinone-diclofenac hybrid molecules. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 195(10), 836-841. (Особистий внесок – інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).
13. Капелька, І. Г., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., **Лозинський, А. В.**, Хом'як, С. В., & Новіков, В. П. (2020). Скринінг низки інгібіторів каскаду арахідонової кислоти на фригопротекторні властивості. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 14(2), 122-128. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів).
14. Shepeta, Y. L., **Lozynskyi, A. V.**, Tomkiv, Z. V., Grellier, P., & Lesyk, R. B. (2020). Synthesis and evaluation of biological activity of rhodanine-pyrazoline hybrid molecules with 2-(2,6-dichlorophenylamino)-phenylacetamide fragment. *Biopolymers and Cell*, 36(2), 133-145. (Особистий внесок – інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

15. Konechnyi, Y. T., **Lozynskyi, A. V.**, Horishny, V. Y., Konechna, R. T., Vynnytska, R. B., Korniychuk, O. P., & Lesyk, R. B. (2020). Synthesis of indoline-thiazolidinone hybrids with antibacterial and antifungal activities. *Biopolymers and Cell*, 36(5), 381-391. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).
16. Винницька, Р. Б., Девіняк, О. Т., **Лозинський, А. В.**, Голота, С. М., Деркач, Г. О., Деяк, Я. І., Куцик, Р. В., & Lesyk, R. B. (2020). Фармакофорна модель для скринінгу протистафілококової активності серед тiazолідинон-споріднених структур. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*, 18(4), 44-49. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фармакологічних досліджень).
17. **Lozynskyi, A.**, Konechnyi, Y., Senkiv, J., Yushyn, I., Khylyuk, D., Karpenko, O., Shepeta, Y., & Lesyk, R. (2021). Synthesis and Biological Activity Evaluation of Novel 5-Methyl-7-phenyl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-ones. *Scientia Pharmaceutica*, 89(4), 52. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).
18. **Lozynskyi, A. V.**, Derkach, H. O., Zasadko, V. V., Konechnyi, Y. T., Finiuk, N. S., Len, Y. T., Kutsyk, R.V., Regeda, M. S., & Lesyk, R. B. (2021). Antimicrobial and cytotoxic activities of thiazolo[4,5-*b*]pyridine derivatives. *Biopolymers & Cell*, 37(2), 153. (Особистий внесок – дизайн роботи, інтерпретація результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).
19. Konechnyi, Y., Hrushka, O., Pryzyhley, H., Konechna, R., **Lozynskyi, A.**, Korniychuk, O., & Lesyk, R. (2021). Cell immunity of laboratory animals under the influence of 5-indolylmethylene rhodanine-3-carboxylic/sulphonic acid derivative. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 1(29), 76–81. (Особистий внесок – інтерпретація даних фармакологічних досліджень, обговорення результатів).
20. **Lozynskyi, A. V.**, Yushyn, I. M., Konechnyi, Y. T., Roman, O. M., Matiykiv, O. V., Smaliukh, O. V., Mosula, L. M., Polovkovych, S. V., & Lesyk, R. B. (2021). Synthesis and evaluation of biological activity of 1-[2-amino-4-methylthiazol-5-yl]-3-

arylpropenones. *Biopolymers and Cell*, (5), 389-399. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

21. Mishchenko, M., Shtrygol', S., **Lozynskyi, A.**, Khomyak, S., Novikov, V., Karpenko, O., Holota, S., & Lesyk, R. (2021). Evaluation of anticonvulsant activity of dual COX-2/5-LOX inhibitor darbufelon and its novel analogues. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2), 22. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу, оформлення статті).

22. Міщенко, М. В., Штриголь, С. Ю., **Лозинський, А. В.**, & Лесик, Р. Б. (2021). Психотропні властивості потенційного антиконвульсанту 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону. *News of Pharmacy*, (2 (102)), 96-103. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів).

23. **Lozynskyi, A.**, Holota, S., Yushyn, I., Sabadakh, O., Karpenko, O., Novikov, V., & Lesyk, R. (2021). Synthesis and Biological Activity Evaluation of Polyfunctionalized Anthraquinonehydrazones. *Letters in Drug Design & Discovery*, 18(2), 199-209. (Особистий внесок – інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

24. **Lozynskyi, A.**, Karkhut, A., Polovkovych, S., Karpenko, O., Holota, S., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2022). 3-Phenylpropanal and citral in the multicomponent synthesis of novel thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles. *Results in Chemistry*, 4, 100464. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів, оформлення статті).

25. **Lozynskyi, A.**, Yushyn, I., Shepeta, Y., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2022). Synthesis and structure elucidation of thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carbonitriles as adducts of Michael reaction. *Journal of Molecular Structure*, 1256, 132574. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу, обговорення результатів, оформлення статті).

26. **Lozynskyi, A.**, Senkiv, J., Ivasechko, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Levytska, O., Karpenko, O., Boshkayeva, A., Sayakova, G., Gzella, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). 1,4-Naphthoquinone Motif in

the Synthesis of New Thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

27. Mishchenko, M., Shtrygol', S., **Lozynskyi, A.**, Hoidyk, M., Khylyuk, D., Gorbach, T., & Lesyk, R. (2022). Evaluation of 5-[(Z)-(4-nitrobenzylidene)]-2-(thiazol-2-ylimino)-4-thiazolidinone (Les-6222) as Potential Anticonvulsant Agent. *Scientia Pharmaceutica*, 90(3), 56. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів, оформлення статті).

28. Finiuk, N., Zelisko, N., Klyuchivska, O., Yushyn, I., **Lozynskyi, A.**, Cherniienko, A., Manko, N., Senkiv, J., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Thiopyrano[2,3-*d*]thiazole structures as promising scaffold with anticancer potential. *Chemico-Biological Interactions*, 368, 110246. (Особистий внесок – синтез сполук, оформлення статті).

29. Ivasechko, I., **Lozynskyi, A.**, Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, R., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khylyuk, D., Gzella, A., Bielawski, A., Bielawska, A., Dzubak, P., Gurska, S., Hajduch, M., Stoika, R., & Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 115304. (Особистий внесок – дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

30. **Лозинський, А. В.** (2023). *In silico* дослідження лікоподібності, параметрів токсичності та механізму протипухлинної активності 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону (Les-6400). *Фармацевтичний часопис*, 2, 5-10.

31. **Lozynskyi, A. V.**, Konechnyi, Y. T., Roman, O. M., Horishny, V. Y., Sabadakh, O. P., Pasichnyk, S. M., Konechna, R. T., Shupeniuk, V. I., Taras, T. M., & Lesyk, R. B. (2023). New polyfunctionalized 2-hydrazinoanthraquinone derivatives as potential antimicrobial agents. *Biopolymers & Cell*, 39(1) 42-53. (Особистий внесок – дизайн



роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

32. **Лозинський, А. В.**, Лесик, Р. Б., Куцик Р. В., Засідко, В. В., Деркач, Г.О. (2016). *4-Хлорофеніламід 7-(4-хлорофеніл)-2-оксо-2,3-дегідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти, що проявляє протимікробну дію.* (Патент № 108770). Укрпатент. (Особистий внесок – синтез сполуки, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення патенту).

33. Конечний, Ю.Т., Корнійчук, О.П., Конечна, Р.Т., **Лозинський, А.В.**, Лесик, Р.Б. (2020). *3-[5-(1*H*-Індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонова кислота, що проявляє протигрибкову дію.* (Патент № 140203). Укрпатент. (Особистий внесок – синтез сполуки, обговорення результатів).

34. Конечний, Ю.Т., Корнійчук, О.П., Тимчук, Р.Т., Конечна, Р.Т., **Лозинський, А.В.**, Лесик, Р.Б. (2020). *2-[5-(1*H*-Індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-етансульфонова кислота, що проявляє протигрибкову дію, що проявляє протимікробну дію.* (Патент № 142763). Укрпатент. (Особистий внесок – синтез сполуки, обговорення результатів).

35. Капелька, І.Г., Міщенко, М.В., Штриголь, С.Ю., Голота, С.М., Лесик, Р.Б., **Лозинський, А.В.** (2023). *Застосування дарбуфелону метансульфонату як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.* (Патент № 145102). Укрпатент. (Особистий внесок – синтез сполуки).

36. **Lozynskyi, A.**, Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2015, 9-13 November). Synthesis of New Thiazolo[4,5-*b*]pyridines Based on Arylidene Pyruvic Acids and Chalcones via Reaction of [3+3]-Cyclocondensation. *VII International Conference Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles*, Kharkov, P-5. (Особистий внесок – розробка методик одержання та синтез сполук, оформлення тез).

37. **Лозинський, А. В.**, Матійків, О.В., & Лесик, Р.Б. (2016, 08 квітня). Синтез амідів тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот як потенційних біологічно активних сполук. *XXXIII Всеукраїнська науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів «Ліки-людині»*, Харків, 119. (Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення тез).

38. **Lozynskyi, A.**, Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2016, 7-10 April). Selected concepts and investigations among thiazolo[4,5-*b*]pyridines as perspective anticancer and anti-inflammatory agents. *Bridges in Life Sciences 11<sup>th</sup> Annual Scientific Conference*, Prague, 76. (Особистий внесок – синтез сполук, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення тез).
39. **Lozynskyi, A. V.**, Sementsiv, G. M., & Lesyk, R. (2016, 19-22 September). Synthesis and anticancer activity of novel thiazolo[4,5-*b*]pyridine-carboxylic acid amides. *IX International meeting «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies»*, Lviv, 311. (Особистий внесок – розробка методик одержання та синтез сполук, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення тез).
40. **Lozynskyi, A.**, Zasidko, V., Derkach, H., & Lesyk, R. (2017, 26-29 September). Antimicrobial activity of some thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles and their structure-related analogues. *7<sup>th</sup> International Weigl Conference*, Lviv, 54. (Особистий внесок – дизайн роботи, синтез сполук, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення тез).
41. **Лозинський, А. В.**, Засідко, В. В., Семенців, Г. М., Зіменковський, Б. С., & Лесик, Р. Б. (2016, 13-16 вересня). Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі ароїлакрилових кислот та вивчення їх протимікробної активності. *VIII Національний з'їзд фармацевтів України: Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*, Харків, 37. (Особистий внесок – синтез сполук, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення тез).
42. **Лозинський, А. В.**, & Лесик, Р.Б. (2017, 28-31 травня) Синтез нових похідних на основі тіазоло[4,5-*b*]піридину як потенційних біологічно активних сполук. *XVI наукова конференція «Львівські хімічні читання-2017»*, Львів, УЗ1. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація спектрів, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення тез).
43. **Лозинський, А. В.**, Матійків, О.В., Семенців, Г. М., Грельє, Ф., & Лесик, Р.Б. (2017, 30-31 березня). Вивчення протитрипаносомної активності серед похідних тіазоло[4,5-*b*]піридину. *I Міжнародна науково-практична конференція «Ліки-*

людині», Харків, 201. (*Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів фармакологічних досліджень, оформлення тез*).

44. Antonyuk, V., Klyuchivska, O., Antonyuk, R., **Lozynskyj, A.**, & Lesyk, R. (2017, 26-29 September). Lectins in the purposeful delivery of drugs to body tissues and individual cells. *7<sup>th</sup> International Weigl Conference*, Lviv, 177. (*Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів досліджень*).

45. Kaminskyu, D., **Lozynskyi, A.**, & Lesyk, R. (2018, 12-16 November). Thiazolidinone-based one-pot synthesis of (thio)chromeno[2,3-*d*]-thiazol-2-ones and 5-ene-4-aminothiazol-2(5*H*)-ones. *8<sup>th</sup> International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles» in memorian of Prof. Valeriy Orlov*, Kharkiv, 94. (*Особистий внесок – розробка методик одержання та синтез сполук*).

46. **Lozynskyi, A.**, Senkiv, J., Antonyuk, V., Stoika, R., & Lesyk, R. (2018, 12-15 April). The ways for improving the bioavailability among biologically active 4-thiazolidinones and their structure-related analogs. *Bridges in Life Sciences 13<sup>th</sup> Annual Scientific Conference*, Zagreb, 76. (*Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів досліджень, оформлення тез*).

47. **Лозинський, А. В.**, Половкович, С. В., Кархут, А. І., & Лесик Р.Б. (2021, 25-26 травня). Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону та юглону як дієнофілів. *Науково-практична конференція з міжнародною участю «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines»*, Тернопіль, 11. (*Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу, оформлення тез*).

48. Хаблак Я.В., Штриголь С.Ю., **Лозинський А.В.**, Лесик Р.Б. (2022, 21-22 жовтня). Дослідження антиконвульсивної дії антрахінонгідразонових кон'югатів на основі тіобарбітурової кислоти. *Міжнародна науково-практична конференція «протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування»*, Харків, 51-52. (*Особистий внесок – синтез сполук, обговорення результатів*).

49. **Лозинський, А.**, Івасечко, І., Кархут, А., Половкович, С., Стойка, Р., & Лесик, Р.Б. (2023, 29-31 травня). Синтез похідних тіазоло[2,3-*d*]тіопірану на основі 5-гідрокси-1,4-нафтохінону (юглону) як протипухлинних агентів. *XIX наукова*

конференція «Львівські хімічні читання-2023», Львів, У2. (Особистий внесок – дизайн роботи, синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення тез).

50. Roman Lesyk, Serhii Holota, **Andrii Lozynskyi**, Anna Bielawska, Krzysztof Bielawski. (2023, September 3-7). Anticancer drug design and discovery: 4-thiazolidinone/thiazole derivatives applications. *EFMC-ASMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry*, Zagreb, P 237. (Особистий внесок – обговорення результатів).

51. Krzysztof Bielawski, Agnieszka Gornowicz, Robert Czarnomysy, **Andrii Lozynskyi**, Wojciech Szymanowski, Roman Lesyk. (2023, September 14-16). Synthesis and cytotoxic activity of a new 4-thiazolidinone derivative against cancer cells. *XI Konwersatorium Chemii Medycznej*, Lublin, P. 51. (Особистий внесок – обговорення результатів).

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	31
ВСТУП	33
РОЗДІЛ 1 СИНТЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ОДЕРЖАННЯ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОХІДНИХ ТІАЗОЛУ/ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНІЗМІВ РЕАЛІЗАЦІЇ ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	42
1.1. Синтез поліфункціональних конденсованих похідних на основі тіазолу/тіазолідинону у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук	46
1.1.1. Синтетичні підходи до одержання похідних на основі пірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу	47
1.1.2. Синтетичні підходи до одержання анельованих похідних тіазолу із шестичленними азагетероциклами	53
1.2. Синтетичні підходи до одержання функціоналізованих похідних хінону з фрагментом тіазолу/тіазолідинону як потенційних біологічно активних сполук	63
1.3. Механізми реалізації біологічної активності поліфункціональних похідних тіазолу/тіазолідинону	74
РОЗДІЛ 2 ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРІАЛІВ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	90
2.1. Фізико-хімічні методи дослідження	90
2.2. Дослідження біологічної активності	91
2.3. Дослідження сполук методами комп'ютерної хімії	119
РОЗДІЛ 3 СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ТІАЗОЛО[4,5- <i>b</i> ]ПІРИДИН-2(3 <i>H</i> )-ОНУ	123
3.1. Обґрунтування синтезу похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2(3 <i>H</i> )-ону у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук	123
3.2. Синтез похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2(3 <i>H</i> )-ону на основі бензиліденацетофенонів, бензиліденацетонів та ариліденпіровиноградних кислот	126
3.2.1. Синтез та перетворення 5,7-діарил-3 <i>H</i> -тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2-онів	126

3.2.2. Синтез 5-заміщених 7-феніл-3 <i>H</i> -тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2-онів	128
3.2.3. Синтез 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-5-карбонових кислот та їх амідів	129
3.3. Спектральні характеристики одержаних сполук	131
3.4. Біологічна активність похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2(3 <i>H</i> )-ону	140
3.4.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI	140
3.4.2. Поглиблене вивчення цитотоксичності похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2(3 <i>H</i> )-ону до нормальних клітин та клітин ряду пухлинних ліній	148
3.4.3. Дослідження протимікробної та протигрибкової активності похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2(3 <i>H</i> )-ону	154
3.4.4. Дослідження впливу 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3 <i>H</i> -тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2-ону (3.14) на MurD-лігазу та ДНК-гіразу <i>in silico</i>	163
3.4.5. Дослідження протитрипаносомної активності похідних тіазоло[4,5- <i>b</i> ]піридин-2-ону	165
3.5. Експериментальна частина	167
ВИСНОВКИ	168
РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ ПІДХОДІВ ДО ОДЕРЖАННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНО-ЗАМІЩЕНИХ ІЗОРОДАНІНІВ ТА НОВИХ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО[2,3- <i>d</i> ]ТІАЗОЛУ	171
4.1. Синтез нових похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу на основі 3-фенілпропаналю та цитралю у заміщених ізороданінів з фрагментами <i>N</i> -фенілмалеїнімідів	173
4.2. Синтез нових похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу на основі метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату	187
4.3. Синтез нових поліциклічних тіопіраноїдів в умовах реакції Кньювенагеля з <i>орто</i> -галоген заміщеними альдегідами	192
4.4. Синтез похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазол-6-карбонітрилу в умовах реакції Міхаелівського приєднання та їх подальша функціоналізація	197
4.5. Експериментальна частина	201

ВИСНОВКИ	204
РОЗДІЛ 5 СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО[2,3- <i>d</i> ]ТІАЗОЛУ НА ОСНОВІ 1,4-НАФТОХІНОНУ	207
5.1. Обґрунтування синтезу похідних тіопіранотіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону у структурі у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук	207
5.2. Синтез, підтвердження структури та DFT-дослідження реакції утворення 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2 <i>H</i> -бензо[6,7]тіохромено[2,3- <i>d</i> ][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів	210
5.2.1. Синтез, 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2 <i>H</i> -бензо[6,7]тіохромено[2,3- <i>d</i> ][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів	210
5.2.2. Спектральні характеристики та рентгеноструктурний аналіз синтезованих сполук	212
5.2.3. Дослідження регіоспрямування реакції <i>гетеро</i> -Дільса-Альдера за допомогою DFT-аналізу на прикладі сполуки 5.4	229
5.3. Біологічна активність похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону	232
5.3.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI	232
5.3.2. Поглиблене вивчення цитотоксичності похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону щодо нормальних та ряду пухлинних клітинних ліній методом МТТ аналізу	245
5.3.3. Дослідження клітинної морфології клітин лінії KB3-1 індукованої сполуками-хітами 5.15 та 5.20	251
5.3.4. Дослідження впливу сполуки 5.15 на клітинний цикл у клітинах лейкемії лінії CCRF-CEM	254
5.3.5. Вестерн-блот аналіз білків при стресі ендоплазматичного ретикулуму у клітинних лізатах лінії KB-3-1 при дії сполуки 5.15	255
5.3.6. COMPARE, PRISM аналіз та докінгові дослідження сполуки-хіта 5.15	257

5.3.7. Дослідження індукції апоптозу шляхом зниження потенціалу мітохондріальної мембрани на фоні дії похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолів на основі юглону 5.4 та 5.15	262
5.3.8. Оцінка впливу синтезованих сполук на ДНК	269
5.3.9. Оцінка реактивності сполук 5.15 та 5.20 з відновленим глутатіоном (GSH)	276
5.3.10. Дослідження гострої токсичності сполуки 5.15 <i>in vivo</i>	278
5.4. Експериментальна частина	285
ВИСНОВКИ	286
РОЗДІЛ 6 ВИВЧЕННЯ ПОЛІФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФУНКЦІОНАЛЬНО-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО[2,3- <i>d</i> ]ТІАЗОЛУ	289
6.1. Дослідження протимікробної та протигрибкової активності похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу	290
6.2. Дослідження протитрипаносомної активності поліфункціональних похідних тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу	299
6.3. Розробка методів кон'югування з лектинами 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2 <i>H</i> -тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазол-6-карбальдегідів та вивчення їх антипроліферативної активності	301
6.4. Дослідження впливу похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i> ]тіазолу на виживання пухлинних, псевдонормальних і нормальних ізольованих моноклеарних клітин <i>in vitro</i>	311
ВИСНОВКИ	314
РОЗДІЛ 7 СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ АНТРАХІОНГІДРАЗОНІВ НА ОСНОВІ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА ЙОГО СТРУКТУРНИХ АНАЛОГІВ	316
7.1. Синтез антрахіонгідразонових кон'югатів на основі похідних 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук	317
7.1.1. Синтез гібридних молекул на основі 1-антрахіонгідразону та метиленактивних сполук	317



7.1.2. Синтез гібридних молекул на основі 2-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук	323
7.2. Спектральні характеристики синтезованих сполук	325
7.3. Біологічна активність антрахінонгідразонових кон'югатів на основі 4-тіазолідинону та його структурних аналогів	332
7.3.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI	332
7.3.2. Дослідження протимікробної та протигрибкової активності антрахінонгідразонових кон'югатів	339
7.3.3. Дослідження антиоксидантної активності антрахінонгідразонових кон'югатів	343
7.4. Експериментальна частина	344
ВИСНОВКИ	345
РОЗДІЛ 8 СИНТЕЗ І ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ НЕКОНДЕНСОВАНИХ ПОХІДНИХ НА ОСНОВІ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ	346
8.1. Синтез та дослідження протимікробної та імунотропної активності тіазолідин-індольних гібридних молекул	348
8.2. Синтез та перетворення похідних 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанону як потенційних біологічно активних сполук	361
8.3. Дослідження біологічної активності похідних тіазолідинону та їх аналогів з фрагментом диклофенаку у структурі	369
8.4. Дослідження <i>in silico</i> лікоподібності та параметрів токсичності 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів	380
8.5. Пошук агентів з потенційною антиконвульсантною, психотропною та іншими видами активності серед функціональнозаміщених похідних на основі тіазолідинону/тіазолу	383
8.5.1. Оцінка протисудомної активності дарбуфелону, його структурних аналогів та деяких похідних на основі 4-тіазолідинону	384

8.5.2. Вивчення психотропних властивостей сполуки-хіта	8.56	як
потенційного протисудомного агента		406
8.5.3. Вивчення фригопротекторної активності дарбуфелону		та його
структурних аналогів		415
8.6. Експериментальна частина		419
ВИСНОВКИ		421
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ		425
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		429

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ADMET – адсорбція, дистрибуція, метаболізм, елімінація та токсичність

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

PPAR – рецептори, активовані пероксисомними проліфераторами

GABA – гамма-аміномасляна кислота

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДМФА – диметилформамід

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

НАДФ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

TNF – фактор некрозу пухлини

DMSO – диметилсульфоксид

РНК – рибонуклеїнова кислота

IC<sub>50</sub> – концентрація досліджуваної речовини, що інгібує ріст 50% клітин

GP% – відсоток росту пухлинних клітин

GI<sub>50</sub> – концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє інгібування росту 50% клітин

TGI – концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє тотальне інгібування росту пухлинних клітин

LC<sub>50</sub> – концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє загибель 50% пухлинних клітин

LD<sub>50</sub> – концентрація, що викликає загибель 50 відсотків тварин

UV – ультрафіолетове випромінювання

МТТ – метил тетразоліум тест

NRU – тест з нейтральним червоним

TPC – дослідження вмісту загального білку клітини

PBS – фосфатно-сольовий буфер

BSA – бичачий сироватковий альбумін

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

НМВС – гетероядерна багатозв'язкова кореляційна спектроскопія

HSQC – гетероядерна одноквантова кореляційна спектроскопія

COSY – кореляційна спектроскопія

NOESY – ядерна спектроскопія з ефектом Оверхаузера

DFT – теорія функціонала густини

СВ – стандартне відхилення

ЛОГ – ліпооксигеназа

ЦНС – центральна нервова система

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Процес створення нових лікарських засобів є актуальним напрямком наукових досліджень. Наявність сучасного високоспеціалізованого обладнання, розробка нових алгоритмів скринінгу та інших аспектів у процесах створення лікарських засобів є ефективним підходом у прискореній ідентифікації сполук-лідерів, які в подальшому проходять усі визначені етапи, необхідні для одержання ліків. Джерелами сполук-лідерів, в основному, є сполуки синтетичного, природнього походження, ендогенні ліганди та метаболіти. Похідні тіазолу/тіазолідинону є структурною основою багатьох сполук-лідерів як важливі компоненти численних лікарських засобів, біологічно активних природних сполук та кофакторів. Важливим аргументом на користь вибору тіазолів/тіазолідинонів як об'єктів наукових досліджень у конструюванні лікоподібних молекул є можливість їх широкої хімічної модифікації з одержанням різних класів конденсованих та неконденсованих похідних. Окрім того, використання похідних тіазолу/тіазолідинону у контексті «гібрид-фармакофорного» підходу дозволило одержати доволі велику кількість існуючих лікарських засобів та сполук, які перебувають на стадіях доклінічних досліджень. Це обумовлено тим, що поєднання тіазолу/тіазолідинону з іншими фармакофорними фрагментами (індольним, піразольним, оксадіазольним та фрагментами існуючих лікарських засобів) у одній молекулі, дозволяє одержати похідні, які володіють посиленою біологічною активністю, наявністю поліфармакологічних властивостей чи низьким профілем токсичності. Існує чимало прикладів високоактивних сполук, одержаних на основі даної концепції, які поряд з тіазолом чи тіазолідиноном вміщують фрагменти сполук природнього походження, зокрема хінонів (1,4-бензохінону, 1,4-нафтохінону, антрахінону), поліпептидних, глікозидних та дитерпенових, фрагментів, макроциклічного лактонного кільця тощо. Тому поглиблені дослідження поліфункціональних похідних тіазолу/тіазолідинону, їх синтез, вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей з подальшим встановленням кореляції «структура - фармакологічна дія» представляє значний

інтерес як з точки зору теоретичних досліджень, так і в плані спрямованого синтезу потенційних лікарських засобів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (державна реєстрація 0121U107504). Фрагменти роботи виконувались в рамках часткового фінансування грантом Національного фонду досліджень України (державна реєстрація 0120U104782) та фундаментальної науково-дослідної роботи, що фінансується за рахунок коштів державного бюджету на 2021-2023 рр (державна реєстрація 0121U100690).

### **Мета і завдання дослідження**

Метою дисертаційної роботи був синтез нових поліфункціональних конденсованих та неконденсованих похідних тiazолу/тiazолідину, пошук серед них ефективних та малотоксичних агентів з протипухлинною, протимікробною, антиоксидантною, протитрипаносомною, антиексудативною, протисудомною та іншими активностями.

### **Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:**

- Провести огляд літературних даних та узагальнити сучасні підходи до синтезу та оцінки біологічної активності ряду функціонально-заміщених конденсованих та неконденсованих похідних на основі тiazолу/4-тiazолідину;
- Розробити методи синтезу тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів та їх функціональних похідних; дослідити в реакціях [3+3]-циклоконденсації 4-аміно-5*H*-тiazол-2-он як бінуклеофіл і серії бензиліденацетофенонів, бензиліденацетонів та ариліденпіровиноградних кислот як електрофільні реагенти;
- Розробити ефективні методи синтезу похідних тіопірано[2,3-*d*]тiazолу на основі трикомпонентної взаємодії 4-тіоксо-2-тiazолідину, аліфатичних альдегідів та *N*-фенілмалеїнімідів як дієнофілів; дослідити особливості перебігу [4+2]-циклоприєднання метил (2-оксо-4-тіоксотiazолідин-5-іліден)ацетату з *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохіноном та диметилловим естером ацетилендикарбонової кислоти; синтезувати

нові поліциклічні тіопірано[2,3-*d*]тіазоли з фрагментом 1,4-нафтохінону у структурі; вивчити особливості регіо- та стереоселективності перебігу досліджуваних [4+2]-циклоприєднань;

- Опрацювати методи синтезу нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі реакції Міхаеля та провести модифікацію одержаних сполук;
- Синтезувати ряд нових поліциклічних тіопіраноїдів в умовах реакції Кньюенагеля з *орто*-галогенозаміщеними альдегідами;
- Розробити методи синтезу антрахінонгідразонових кон'югатів на основі похідних 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук;
- Отримати ряд нових тіазолідин-індольних гібридних молекул, 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанонів, похідних тіазолідинону та їх аналогів з фрагментом диклофенаку у структурі, 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів.
- Дослідити протипухлинну, протимікробну, антиексудативну, протитрипаносомну, антиоксидантну, протисудомну та імунотропну активності синтезованих сполук для встановлення особливостей кореляції структура-дія;
- Синтезувати низку нових функціональнозаміщених похідних на основі тіазолідинону/тіазолу для вивчення їх протисудомної, психотропної та фригопротекторної активності;
- Провести докінгові дослідження та оцінку лікоподібності та параметрів токсичності *in silico* групи потенційних біологічно активних сполук, на основі чого висунути гіпотезу щодо механізмів реалізації їхньої біологічної дії;
- Підтвердити будову та чистоту індивідуальних сполук на основі методів  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії, мас-спектрометрії, рентгеноструктурного аналізу (РСА), елементного аналізу.

*Об'єкти дослідження* – реакції [3+3]-циклоконденсації у синтезі тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів, реакції *гетеро*-Дільса-Альдера у синтезі тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, реакції [2+3]-циклоконденсації, приєднання Міхаеля, кислотного та лужного гідролізу, азосполучення та реакція Кньюенагеля.

*Предмет дослідження* – поліфункціональні конденсовані та неконденсовані біологічно активні похідні тіазолу/тіазолідинону.

### **Методи дослідження**

Для проведення *in silico* досліджень використовували наступні програми та програмні пакети: ChemDraw 18.0, AutoDock Vina 1.2.0, HyperChem 7.5, Auto Grid Tool, SwissADME, PROTOX II, MOE 2007.09. Для одержання сполук використовувались загальні методи класичного органічного синтезу; для підтвердження хімічної структури, індивідуальності та ступеня чистоти синтезованих сполук застосовані сучасні фізико-хімічні методи (елементний аналіз,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопія, мас-, хромато-мас-спектрометрія, ТШХ та рентгеноструктурний аналіз). Фармакологічні дослідження *in vitro* та *in vivo* включали визначення протипухлинної, протимікробної, антиексудативної, протитрипаносомної, антиоксидантної, імунотропної активності та гострої токсичності сполук.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше проведено комплексне дослідження з синтезу, вивчення поліфармакологічних властивостей та встановлення механізмів їх реалізації для поліфункціональних конденсованих та неконденсованих похідних тіазолу/тіазолідинону.

Розроблено ефективні методи синтезу і одержано 197 нових похідних 4-тіазолідинону та їх структурних аналогів, встановлено будову, вивчені фізико-хімічні параметри та біологічна активність. Опрацьовано нові підходи до одержання тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів та їх структурної оптимізації, що дозволило синтезувати неописані в науковій літературі 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-они, 5-метил(арил)-7-феніл-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-они, 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонові кислоти та їх амідни, що проявляють протимікробну, протигрибкову, антитрипаносомну та протипухлинну активності з певною селективністю щодо окремих ліній ракових клітин. Реакцією *гетеро*-Дільса-Альдера синтезовано нові 6-замішені *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-фенетил-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріони та *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-3,4*a*,7*a*,8-



тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріони. Показано, що взаємодія метилового естеру (2,4-діоксотіоксотіазолідин-5-іліден)-оцтової кислоти з *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохіноном є діастереоселективним процесом, що дозволяє одержати похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолового ряду з різною конфігурацією хіральних центрів тіопіранового кільця. Показано, що взаємодія 4-тіоксо-2-тіазолідинону з *N*-фенілмалеїнімідами відбувається шляхом тіа-приєднання за Міхаелем, що дозволило одержати 1-(4-феніл)-3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідин-2,5-діони. Реакцією 4-тіоксо-2-тіазолідинону та орто-галогенозаміщених альдегідів вперше одержано 1,4-дитіа-3-азаціклопента[*b*]нафтален-2-они, 1,4-дитіо-3,5-діазаціклопента[*b*]антрацен-2-они і 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріаза-*s*-індацен-6-они. Вивчено особливості регіоселективності реакції *гетеро*-Дільса-Альдера похідних 1,4-нафтохінону як дієнофілів у синтезі тіопірано[2,3-*d*]тіазолів. Опрацьовано новий підхід до синтезу тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі реакції приєднання Міхаеля та вивчено їх кислотний і лужний гідроліз. Проведено вивчення протимікробної активності та цитотоксичності для функціональнозаміщених тіопірано[2,3-*d*]тіазолів. Розроблено методи кон'югування з лектинами та людським сироватковим альбуміном 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів та вивчено їх антипроліферативну дію. Опрацьовано нові підходи до одержання поліфункціональних антрахінонгідразонів на основі 4-тіазолідинону та його структурних аналогів, які проявляють суттєву протипухлинну, протимікробну та антиоксидантну активності.

На основі гібрид-фармакофорного підходу запропоновано нові напрямки молекулярного дизайну поліфункціональних неконденсованих похідних тіазолу/тіазолідинону, що дозволило одержати ряд нових тіазолідин-індольних гібридних молекул, 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанонів, похідних тіазолідинону та їх аналогів з фрагментом диклофенаку у структурі, 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів. Ідентифіковано похідні дарбуфелону та його структурні аналоги, які проявляють високий протисудомний ефект на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом.

На основі комплексу досліджень кореляції "структура – біологічна активність", який включав віртуальний, традиційний та високоефективний фармакологічний скринінг, *in silico* дослідження фізико-хімічних показників, параметрів ADME, фармакокінетичних властивостей, молекулярне та математичне моделювання, виділено 57 лікоподібних молекул з високою протипухлинною, протимікробною, протитрипаносомною, антиексудативною, антиоксидантною та протисудомною активностями. Для поглиблених доклінічних досліджень запропоновано 5 протипухлинних агентів, які характерні селективним впливом на пухлинні клітинні лінії на фоні низької цитотоксичності щодо псевдонормальних клітин.

Наукова новизна проведених досліджень підтверджена патентами України на корисну модель (№ 108770, 2016; № 140203, 2020; № 142763, 2020), патентом України на винахід (№ 145102, 2023).

### **Практичне значення отриманих результатів**

Розроблено ефективні методи синтезу та хімічної модифікації тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів, тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, 3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідін-2,5-діонів, 1,4-дитіа-3-азаціклопента[*b*]нафтален-2-онів, 1,4-дитіо-3,5-діаза-ціклопента[*b*]антрацен-2-онів, 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріаза-*s*-індацен-6-онів, 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанонів, 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів, 5-індолілметилен-3-заміщених похідних роданіну, тiazолідинон-диклофенак гібридних молекул та їх аналогів, а також антрахінонгідразонових кон'югатів метиленактивних сполук, встановлені їх фізико-хімічні та спектральні характеристики. На основі скринінгу біологічної дії ідентифіковано та охарактеризовано нові високоактивні молекули з протипухлинною, протитрипаносомною, протимікробною, антиексудативною, антиоксидантною, імунотропною та протисудомною активностями, які рекомендовані для поглиблених досліджень. Окреслено прогностичні критерії для спрямованого синтезу біологічно активних сполук.

### **Особистий внесок здобувача**

У процесі виконання дисертаційної роботи автором разом із науковим консультантом зроблено дизайн дослідження, обрано основні напрямки проведення

синтетичних та біологічних досліджень. Дисертантом самостійно здійснено огляд сучасної наукової літератури, реалізовано виконання експериментальної частини, узагальнення результатів та формування положень і висновків, які виносяться на захист. Співавторами наукових публікацій є науковий консультант та науковці, які брали участь у синтетичних, спектральних та фармакологічних дослідженнях. У ході виконання дисертаційної роботи спільно з Національним інститутом раку (програма Національного інституту здоров'я США Developmental Therapeutic Program (DTP), Бетезда, Меріленд, США), лабораторією UMR7245 CNRS «Molecules de Communication et Adaptation des Microorganismes» Національного музею історії природи (керівник проф. Філіп Грельє, Париж, Франція), кафедрою біотехнології (зав. каф. проф. Анна Белявська) та кафедрою синтезу та технології ліків (зав. каф. проф. Кшиштоф Белявський) Медичного університету м. Білосток (Польща), Інститутом молекулярної та трансляційної медицини Університету Палацького (д-р Павло Поліщук, керівник Мар'ян Гайдук, Оломоуц, Чехія), кафедрою органічної хімії Познанського медичного університету (проф. Анджей Гзелля, зав. каф. проф. Луціюш Запрутко), кафедрою фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету (зав. кафедри проф. С.Ю. Штриголь, м. Харків), відділом регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини Національної академії наук України (зав. відділу проф. Р.С. Стойка), ТОВ "НВП "ЄНАМІН" (к. фарм. н. О.В. Карпенко, м. Київ), кафедрою хімії середовища та хімічної освіти Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника (зав. каф. доц. Т.М. Тарас), кафедрою технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету "Львівська Політехніка" (зав. каф. проф. В.І. Лубенець) та кафедрою мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького (д. філ. Ю.Т. Конечний, зав. каф. проф. О.П. Корнійчук) проведено та узагальнено дані фізико-хімічних методів аналізу та дослідження біологічної активності. Співавторами наукових праць дисертанта є автори захищених дисертацій: Антонюк Р.В., 2017; Сабадах О.П., 2019; Шепета Ю.Л., 2020; Конечний Ю.Т., 2021; Міщенко М.В, 2022; Юшин І.М., 2023; Івасечко І.І., 2023. Персональний внесок дисертанта в кожен з опублікованих праць із співавторами вказано у дисертації та авторефераті у

списку фахових публікацій. Усі наукові узагальнення, результати, висновки та рекомендації, наведені у дисертації, опрацьовані та виконані автором особисто.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях: VII та VIII International Conferences «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles» (Харків, 2015), XXXIII Всеукраїнська науково-практична конференція «Ліки-людині» (Харків, 2016, 2018), Bridges in Life Sciences 11<sup>th</sup> та 13<sup>th</sup> Annual Scientific Conferences (Prague, 2016; Zagreb, 2018), IX International meeting «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies» (Львів, 2016), 7th International Weigl Conference (Львів, 2016), VIII Національний з'їзд фармацевтів України (Харків, 2016), XVI та XIX наукові конференції «Львівські хімічні читання», (Львів, 2017, 2023), I Міжнародна науково-практична конференція «Ліки-людині» (Харків, 2017), Науково-практична конференція «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines» (Тернопіль, 2021), Міжнародна науково-практична конференція «Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування» (Харків, 2022), EFMC-ASMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (Zagreb, 2023), XI Konwersatorium Chemii Medycznej (Lublin, 2023).

Матеріали і висновки кандидатської дисертації «Синтез та біологічна активність поліфункціональних похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазольної гетероциклічної системи» (23.10.2015 р.) не використовувались.

### **Публікації**

Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 51 науковій роботі (1 одноосібна), серед яких 31 стаття у наукових фахових виданнях України та інших країн (25 індексуються БД Scopus), отримано 4 патенти України, з них 1 – на винахід, 16 тез доповідей.

### **Обсяг і структура дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 614 сторінках тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, восьми розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 658 найменувань та 7 додатків

(окремою частиною). Обсяг основного тексту становить 303 сторінки. Робота проілюстрована 70 схемами, 119 рисунками та 95 таблицями.

РОЗДІЛ 1  
СИНТЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ОДЕРЖАННЯ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ  
ПОХІДНИХ ТІАЗОЛУ/ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА  
МЕХАНІЗМІВ РЕАЛІЗАЦІЇ ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ  
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Конструювання лікарських засобів являє собою надзвичайно тривалий, трудоемкий та багатостадійний процес, який продовжується не один рік та вимагає надзвичайно великих фінансових затрат. Одним із ключових етапів у створенні лікарських засобів, який має чітке відношення до сучасної фармацевтичної та медичної хімії, є пошук та оптимізація сполук-лідерів. Так, ідентифікація визначених сполук є вихідною точкою для одержання молекул, які володіють необхідною активністю, селективністю та прийнятними параметрами ADMET (адсорбція, дистрибуція, метаболізм, елімінація та токсичність). Відповідно, ідентифікація найбільш ефективних сполук-лідерів є ключовим у досягненні успіху процесу конструювання ліків. Джерелом сполук-лідерів можуть бути ендогенні ліганди, зокрема субстрати ензимів, транспортних білків чи агоністи рецепторів; інші ліганди включно із існуючими лікарськими засобами, сполуки ізольовані при метаболізмі ліків, або речовини, які перебувають на етапах клінічних досліджень; похідні ідентифіковані шляхом скринінгових досліджень хімічних бібліотек, включно із сполуками природнього походження [1-5].

Пошук сполук-лідерів ґрунтується на використанні двох ключових елементів, а саме високопродуктивного скринінгу (High-throughput screening, HTS) та синтетичних підходів, які включають в себе мішень-орієнтований синтез (Target-oriented synthesis, TOS), синтез сфокусованих бібліотек, дивергент-орієнтований синтез (Diversity-oriented synthesis, DOS), тощо [6-11]. В свою чергу DOS-синтез включає в себе наступні стратегії, а саме багатокomпонентні реакції, реакції циклоприєднання, циклізації та тандемні реакції, концепція поєднання функціональних груп, а також стратегія превілейованих структур [8].

Варто відзначити, що похідні тiazолу та його функціональні похідні є тим класом сполук, які можуть стати основою для одержання сполук-лідерів, оскільки для них притаманний не тільки широкий спектр біологічної активності, а також значний потенціал для подальшої хімічної модифікації. Так, ядро тiazолу лежить в основі численних сполук природнього походження, зокрема глікозидного протипухлинного антибіотика блеоміцину; макролідів латрункуліну А, лейнаміцину та лангбіабеліну; циклічних пептидів аргірину А, грасипептолідів, промотіоцину та мікроцикламідів; лінійних пептидів тубулозинів; дитерпенів еретазолів, які на даний момент уже є зареєстрованими протипухлинними лікарськими засобами або молекулами, що перебувають на стадіях доклінічних досліджень [12]. Серед природніх сполук на основі тiazолу та його функціональних похідних із протимікробною активністю ідентифіковано  $\beta$ -лактамі антибіотики пеніцилінового та монобактамового ряду, тіопептидні антибіотики (нокатіацин, нозігептид та тіомурацин А), а також цистотiazоли А-F з помітною протигрибковою активністю. З іншого боку, похідні тiazолу лежать в основі численних синтетичних лікарських засобів, зокрема праміпексолу як агоністу допамінових рецепторів, який використовується у лікуванні хвороби Паркінсона та синдрому неспокійних ніг (Restless Legs Syndrome, RLS); інгібітора ВІЛ-1 протеази ритонавіру та інгібітора СYP3A4 кобіцистату, які використовуються у лікуванні вірусу імунодефіциту людини; антагоністів H<sub>2</sub>-гістамінових рецепторів нізатидину та фамотидину як противиразкових препаратів; антигельмінтних лікарських засобів тіабендазолу, левамізолу та тетрамізолу; рилузолу як засобу для терапії бічного аміотрофічного склерозу; протидіабетичних лікарських засобів піоглітазону, троглітазону, розіглітазону, лобеглітазону як агоністів PPAR $\gamma$  рецепторів; інгібітора непуринової ксантиноксидази фебуксостату як протиподагричного засобу; нестероїдного протизапального засобу мелоксикаму; інгібітора тирозин-кінази десатінібу як протипухлинного засобу; коензиму вітаміну В<sub>1</sub> кокарбоксілази; сульфаніламідних лікарських засобів сульфатiazолу та фталілсульфотiazолу;

радіофармацевтичного препарату для діагностики хвороби Альцгеймера флутеметамолу ( $^{18}\text{F}$ ) (Рис. 1.1.) [13-15].

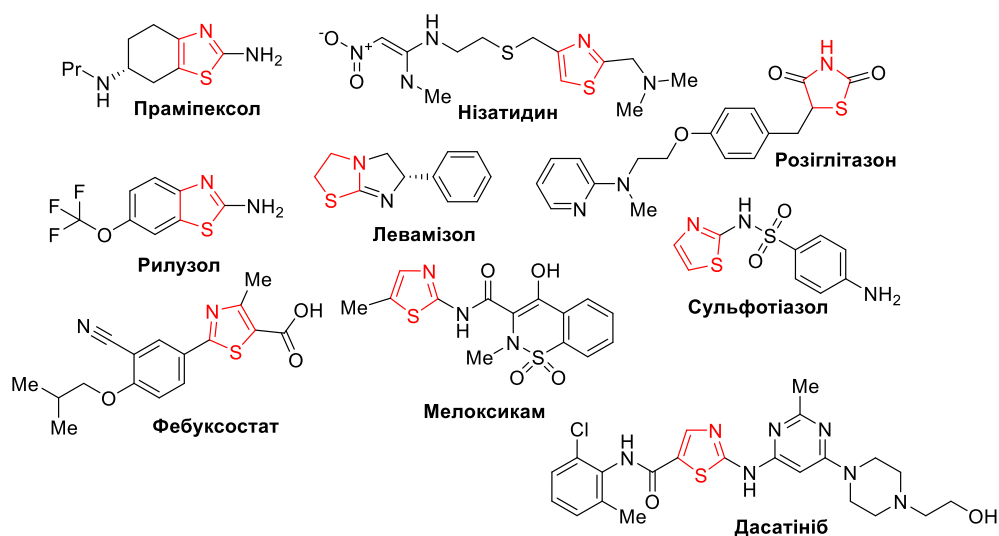


Рис 1.1. Структури деяких синтетичних лікарських засобів на основі функціональних похідних тіазолу.

Серед функціональних похідних тіазолу є також велика кількість синтетичних сполук, які перебувають на стадіях доклінічних досліджень, зокрема клонетіазол як алостеричний модулятор  $\text{GABA}_A$  рецепторів для лікування абстинентного синдрому при алкоголізмі; нірідазол як антишистосомозний агент; інгібітор альдозоредуктази зополрестат, який використовується у лікуванні діабетичних ускладнень; тенелігліптин, балаглітазон, мітоглітазон, 2,4-тіазолідиндіон та галіцин як засобів для лікування цукрового діабету 2 типу; летостеїн як муколітичний агент у лікуванні бронхопневмопатій; гіполіпідемічний засіб нетоглітазон; підотімод як імуномодуючий агент; агоніст  $\text{A}_2$  аденозинових рецепторів тозаденант як засіб для лікуванні кокаїнової залежності; ефатутазон, квізартиніб, піднарулекс та епалрестат як протипухлинні агенти; таларозол як засіб у лікуванні псоріазу та інших шкірних хвороб; піпрозолін у терапії патології жовчовивідних шляхів та диспепсії; гіпоурикемічний агент дотінурад; ебопірант як засіб, що використовується при передчасних пологах; інгібітор JNK кінази бентаміпод для лікування ендометріозу (Рис. 1.2.) [15].



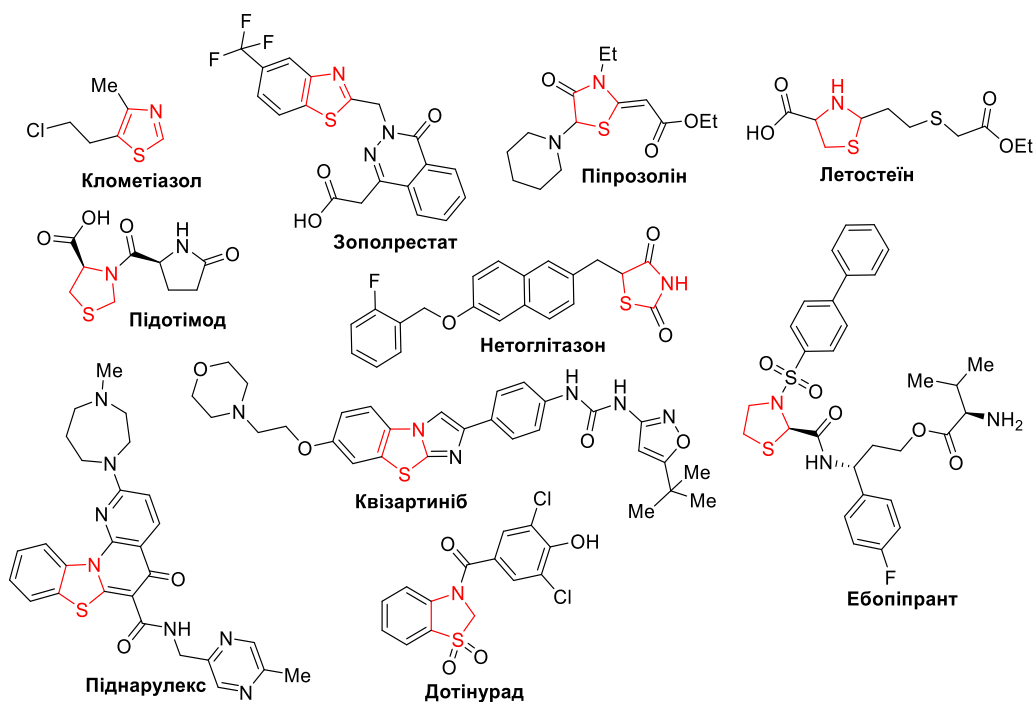


Рис 1.2. Структури ряду функціональних похідних тіазолу, які перебувають на III-IV стадіях клінічних досліджень.

Кожен із вищезазначених лікарських засобів чи потенційних «лікоподібних сполук» сконструйований з використанням абсолютно різних підходів, проте спільним у кожному з них є процес, який включає хімічну модифікацію похідних тіазолу з подальшим одержанням молекул, що володіють певною біологічною активністю та являються основою для побудови сполук-лідерів.

Враховуючи наведені аргументи пошук нових біологічно активних сполук серед поліфункціональних похідних на основі тіазолу/тіазолідинону є виправданим і перспективним напрямком сучасної медичної та фармацевтичної хімії. В наведеному огляді ми здійснили спробу систематизувати сучасні підходи до синтезу та оцінки фармакологічного потенціалу ряду функціонально-заміщених конденсованих та неконденсованих похідних на основі тіазолу/4-тіазолідинону, включно із гібридними молекулами з фрагментами природніх сполук у структурі.

1.1. Синтез поліфункціональних конденсованих похідних на основі тіазолу/тіазолідинону у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук.

Вивчення різних класів конденсованих гетероциклічних систем, включно із функціонально-заміщеними похідними на основі тіазолу/тіазолідинону є актуальною тематикою сучасної медичної хімії. Десятки лікарських засобів різних фармакотерапевтичних груп містять у своїй структурі конденсоване гетероциклічне ядро. Так, побудова даного типу систем дозволяє поєднати у одній молекулі декілька фармакофорних фрагментів, які часто дають змогу потенціювати активність, а також знизити рівень токсичності. Окрім того, отримання зазначених систем дає змогу провести фіксацію біофорних фрагментів у жорсткій конденсованій системі, що у деяких випадках є важливим аспектом у досягненні афінітету до ряду біомішеней, зокрема топоізомераз I-II та ДНК-гірази, як ключових ензимів в процесах реплікації ДНК і транскрипції [16-20]. Особливо це можна чітко спостерігати для лікарських засобів чи агентів, які мають жорстку циклічну структуру, зокрема для протипухлинних антибіотиків таких як ціаноциклін А, лемономіцин та доксорубіцин, а також лікарських засобів з групи фторохінолонів. Отримання конденсованих гетероциклічних систем, забезпечує також уникнення здатності бути «акцепторами Міхаеля», яка часто є притаманна їх синтетичним попередникам, зокрема вона чітко проявляється у спряжених кетонів (енонів) на основі тіазолу/тіазолідинону чи похідних 1,4-нафтохінону, та забезпечує неконтрольоване зв'язування із нуклеофільними залишками білків, що на достатньо дискусійну думку ряду авторів є небажаним ефектом у сучасній концепції створення лікарських засобів [21-27]. Враховуючи наведене синтез конденсованих похідних на основі тіазолу/тіазолідинону, що володіють високим рівнем біологічної активності може бути передумовою для створення відповідних сполук-лідерів серед даного класу сполук як основи нових лікарських засобів.

Відповідно, метою даного фрагменту нашої роботи була спроба систематизувати методи синтезу деяких конденсованих похідних на основі тіазолу/тіазолідинону, зокрема похідних пірано[2,3-*d*]тіазолу, тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, тіазолопіридину, тіазоло[3,2-*a*]піримідину, тощо. Варто відзначити, що зазначені конденсовані системи одержані з використанням абсолютно різних синтетичних підходів, які включали в себе реакції [4+2]/[3+3]-циклоконденсації, Ганча та Міхаелівського приєднання та ряд інших хімічних перетворень (Рис. 1.3).

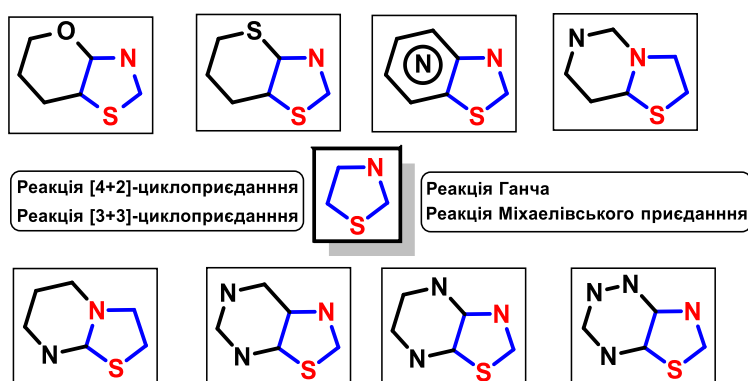


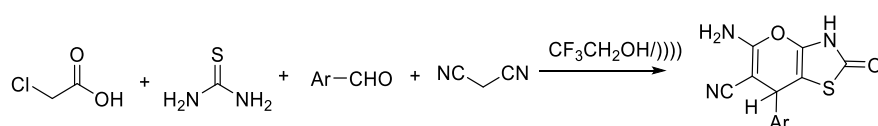
Рис. 1.3. Синтетичні підходи до одержання ряду конденсованих похідних на основі тіазолу/тіазолідинону, які представлені у даній роботі.

### 1.1.1. Синтетичні підходи до одержання похідних на основі пірано[2,3-*d*]тіазолу.

Похідні пірано[2,3-*d*]тіазолу є представниками класу конденсованих похідних на основі 4-тіазолідинону, які являють собою цікавий об'єкт наукових досліджень, оскільки є структурними аналогами тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, які проявляють надзвичайно широкий спектр біологічної активності та є предметом зацікавлень багатьох наукових колективів, включно із науковою групою кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького під керівництвом професора Лесика Р.Б [28, 29]. Одним із ефективних способів одержання похідних пірано[2,3-*d*]тіазолу ґрунтується на однореакторній (one-pot) чотирикомпонентній взаємодії монохлороцтової кислоти, тіосечовини,

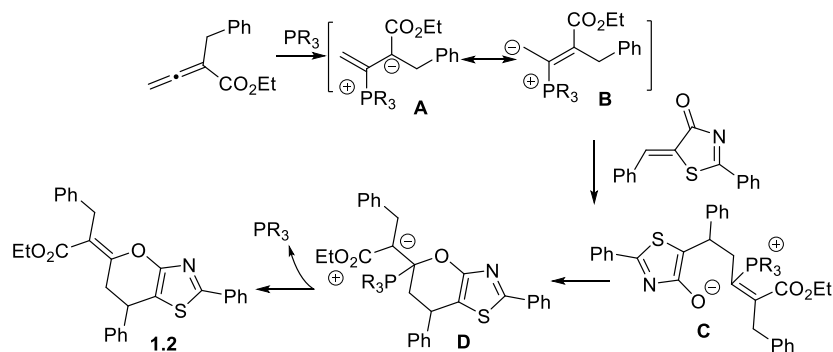
ароматичних альдегідів та малондинітрилу у середовищі трифтороетанолу при дії ультразвуку протягом 10-30 хв. з одержанням з високими виходами (85-95%) похідних 5-аміно-2-оксо-7-арил-3,7-дигідро-2*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **1.1**. Варто відзначити, що при проведенні альтернативного методу синтезу при використанні класичного нагрівання протягом 2-3 годин спостерігається утворення цільових продуктів із значно нижчими виходами (3-65 %) (Схема 1.1.) [30].

Схема 1.1.



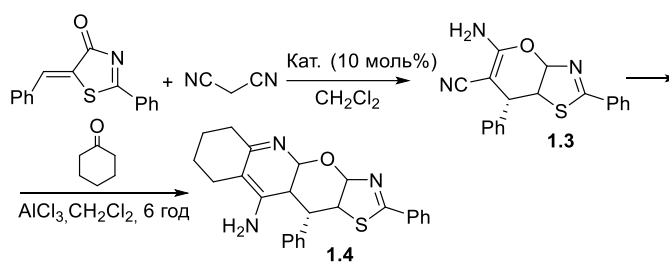
Інший підхід до одержання похідних пірано[2,3-*d*]тіазолу було повідомлено у роботах *Wang C.* та співавторів в умовах фосфін-каталізованої [4+2]-циклоконденсації аленоатів та алкенів з фрагментом тіазолонону з утворенням відповідних 6,7-дигідро-5*H*-пірано[2,3-*d*]тіазолів **1.2** з високим виходом та хорошою енантіоселективністю. Авторами було запропоновано наступний механізм утворення цільових сполук, який ґрунтується на тому, що у присутності третинних фосфінів, β-фосфонієвий дієнолатий інтермедіат одержаний шляхом приєднання фосфіну до відповідного аленоату, атакує α,β-ненасичений енон з утворенням інтермедіату **C**. Подальша внутрішньомолекулярна циклізація інтермедіату **C**, яка супроводжується елімінацією третинного фосфіну призводить до утворення відповідних похідних 6,7-дигідро-5*H*-пірано[2,3-*d*]тіазолу. Загалом α-арилметил аленоати є чотирьохвуглецевими синтонами, які реагують із електронно-дефіцитними алкенами у реакції [4+2]-циклоконденсації з утворенням похідних циклогексану. В поточної реакції тіазольний цикл шляхом ізомеризації стабілізує проміжний інтермедіат **C**, таким чином призводячи до доволі непоширеного варіанту [4+2]-циклоконденсації, у якому α-заміщені аленоати служать як C<sub>2</sub>-циклізуючі агенти (схема 1.2) [31].

Схема 1.2.



Цікавий підхід до синтезу похідних пірано[2,3-*d*]тіазолів був здійснений в умовах асиметричної органокаталізованої [4+2]-циклоконденсації 5-ілідентіазол-4-онів та монодинітрилу в присутності біфункціональних похідних тіосечовини або сквараміду як каталізаторів з утворенням відповідних (*R*)-5-аміно-2,7-дифеніл-7*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилів **1.3**. Дані сполуки були також функціоналізовані взаємодією з циклогексаноном у присутності алюміній хлориду при кімнатній температурі з утворенням поліциклічних похідних (*R*)-2,11-дифеніл-7,8,9,11-тетрагідро-6*H*-тіазоло-[5',4':5,-6]пірано[2,3-*b*]хінолін-10-аміну **1.4** (схема 1.3) [32].

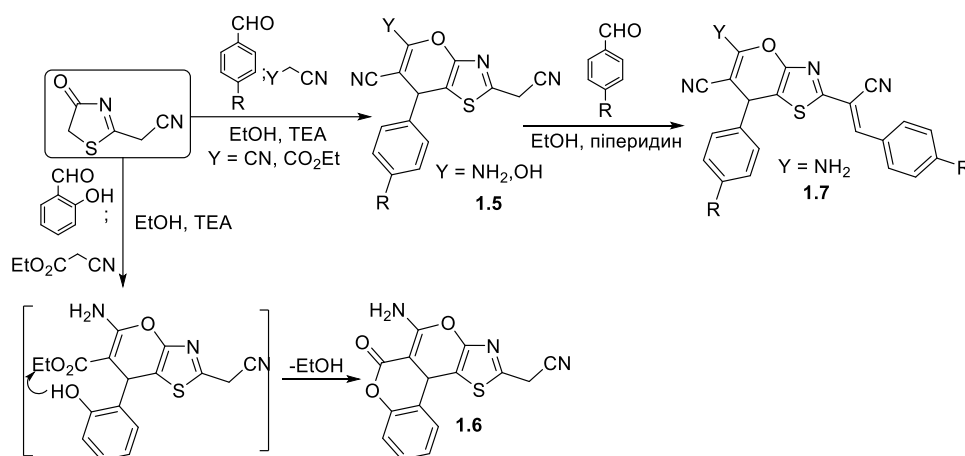
Схема 1.3.



Інший приклад формування пірано[2,3-*d*]тіазольного фрагменту, що базується на взаємодії 2-(4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)ацетонітрилу, ароматичних альдегідів із малондинітрилом або етилціаноацетатом, представлено у роботах *Mohareb R. M.* і співавторів [33]. Так, при мультикомпонентній реакції 2-(4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)ацетонітрилу із малондинітрилом або етилціаноацетатом та *para*-заміщеними ароматичними альдегідами у присутності триетиламіну у середовищі етанолу отримано 2-(ціанометил)-7-феніл-7*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрили **1.5**, а у випадку

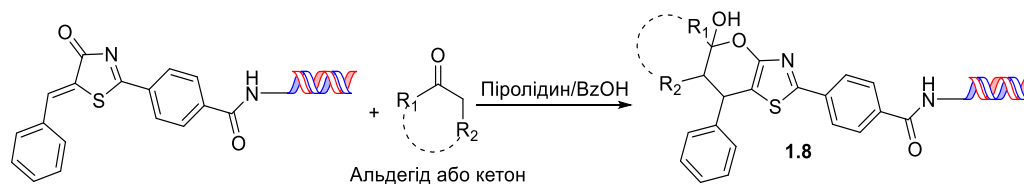
використання саліцилового альдегіду та етилціаноацетату спостерігається проходження також подальшої тандемної реакції, яка включає ацилювання фенольної групи з утворенням відповідного 2-(5-гідрокси-6-оксо-6,11*b*-дигідрогхромено[4',3':4,5]пірано[2,3-*d*]тіазол-2-іл)ацетонітрилу **1.6**. Варто відзначити, що сполуки **1.5** були також функціоналізовані взаємодією із ароматичними альдегідами у середовищі етанолу та присутності піперидину як основного каталізатора, що дозволило одержати 5-аміно-7-(4-хлорофеніл)-2-(1-ціано-2-фенілвініл)-7*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрили **1.7** (схема 1.4). Подібні синтетичні дослідження ряду авторів [34-36] дозволили одержати ряд пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилів з фрагментами кумарину, тетрагідробензо[*b*]тіофену у положенні С-2 піранотіазольного ядра.

Схема 1.4.



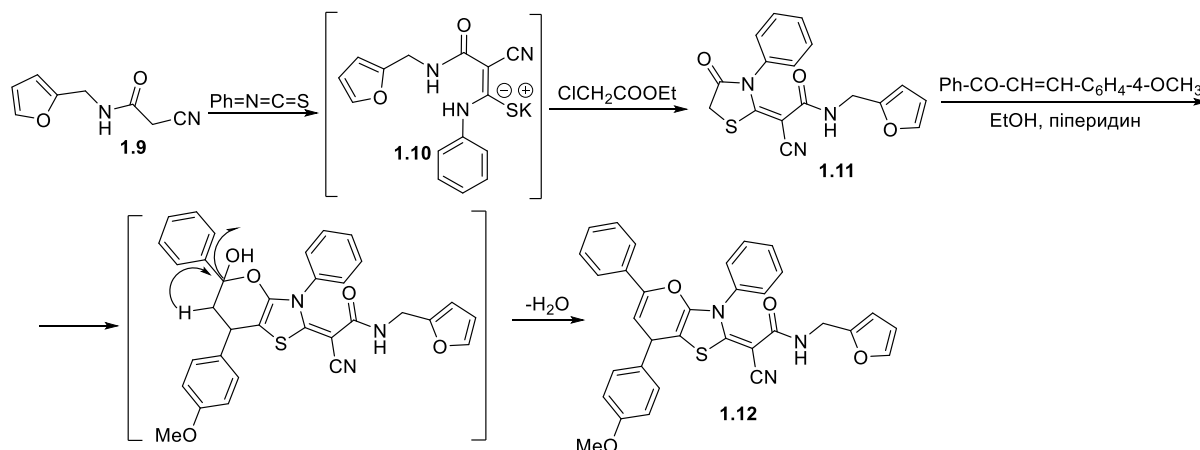
У роботах *Wu W.* та співавторів було повідомлено про синтез похідних пірано[2,3-*d*]тіазолу **1.8** кон'югованих із фрагментом ДНК в умовах реакції [4+2]-циклоприєднання, виходячи із олігонуклеотиду, що вміщував 5-алкенілтіазолононовий замісник та ряду альдегідів та кетонів. Реакцію проводили у присутності 40 екв. піролідину і бензойної кислоти як промоторів реакції, суміші тетрагідрофурану і води як реакційного середовища при кімнатній температурі (схема 1.5) [37].

Схема 1.5.



Активна метиленова група 2-ціано-*N*-(фуран-2-ілметил)ацетаміду **1.9** при взаємодії з фенілізотіоціанатом в середовищі диметилформаміду в присутності калію гідроксиду призводить до утворення інтермедіату, а саме калію (*E*)-2-ціано-3-((фуран-2-ілметил)аміно)-3-оксо-1-(феніламіно)проп-1-ен-1-тіолату **1.10**, як прекурсору у синтезі похідних пірано[2,3-*d*]тіазолу. Так, зазначена сіль при взаємодії з 2-хлоро-*N*-фенілацетамідом призводить до утворення похідного на основі 4-тіазолідинону **1.11**, яке у свою чергу при реакції з відповідним халконом призводить до утворення 2-ціано-*N*-(фуран-2-ілметил)-2-(7-(4-метоксифеніл)-3,5-дифеніл-3,7-дигідро-2*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-2-іліден)ацетаміду **1.12** (схема 1.6) [38].

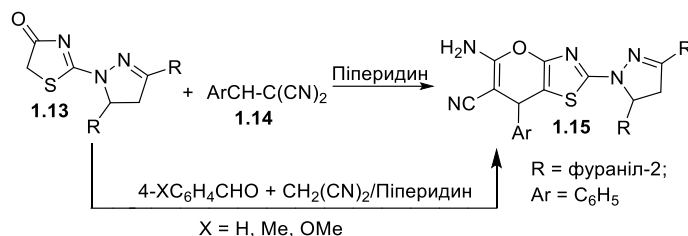
Схема 1.6



Ефективний метод синтезу пірано[2,3-*d*]тіазолів з використанням активованих нітрилів був описаний у роботах *Zaki Y. H.* та співавторів [39]. Так, при взаємодії похідних 2-(4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)тіазол-4(5*H*)-ону **1.13** та відповідних ариліденмалондинітрилів **1.14** у середовищі абсолютного етанолу та піперидину (основний каталізатор) з високим виходом одержано 5-аміно-2,7-діарил-7*H*-пірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрили **1.15**. Варто відзначити, що цільові сполуки також було одержано зустрічним синтезом

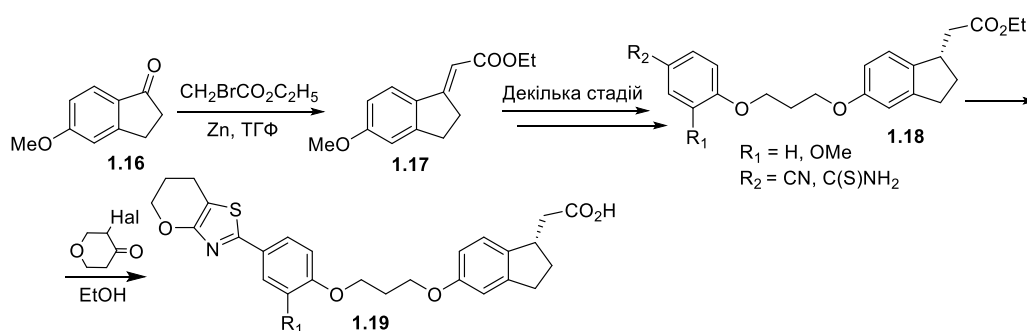
виходячи із 2-піразоліл-тіазол-4(5*H*)-ону, ароматичних альдегідів та малонодинітрилу за аналогічних умов (схема 1.7).

Схема 1.7



Цікавий підхід до синтезу піранотіазолів, як агоністів PPAR  $\alpha/\gamma/\delta$ -рецепторів було повідомлено у роботах *Rudolph J.* та співавторів [40]. У якості вихідної сполуки було обрано 5-метоксиінданон **1.16**, який в умовах реакції Реформатського був трансформований у відповідний екзоциклічний алкен **1.17**. Даний алкен при проведенні ряду перетворень призводив до утворення 5-заміщених-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-іл-оцтових кислот **1.18**, які були циклізовані у відповідні функціоналізовані похідні тіазолу в умовах реакції Ганча. Утворення відповідних піранотіазолів **1.19** було здійснене виходячи із  $\alpha$ -галогенкетонів і тіоамідів (одержані з відповідних нітрильних похідних). Реакцію проводили при нагріванні в середовищі етанолу (схема 1.8).

Схема 1.8

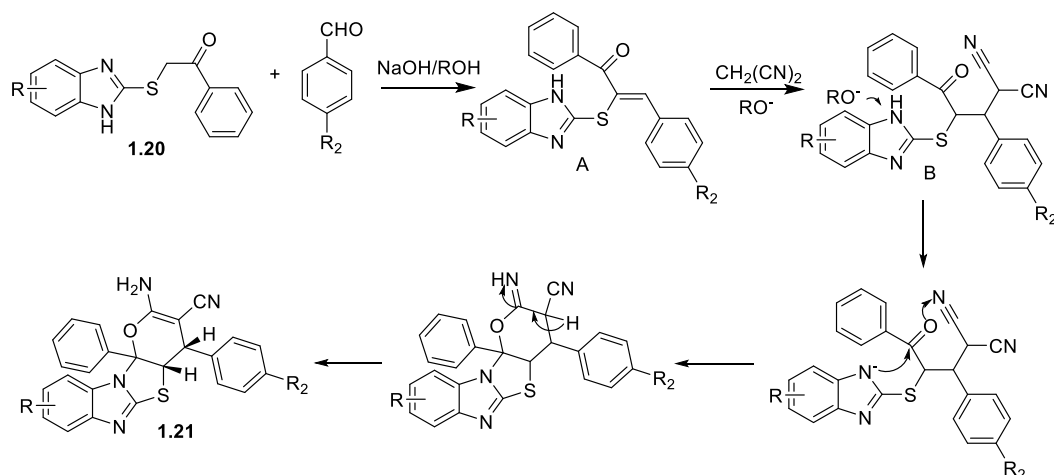


Синтез поліциклічних похідних піранотіазолу в умовах трикомпонентної реакції 2-((1*H*-бензо[*d*]імідазол-2-іл)тіо)-1-фенілетан-1-ону **1.20**, ароматичних альдегідів та малонодинітрилу у присутності натрій гідроксиду у середовищі спирту з утворенням відповідних 2-аміно-11*a*-феніл-4-феніл-4*a*,11*a*-дигідро-4*H*-бензо[4,5]імідазо[2,1-*b*]пірано[2,3-*d*]тіазол-3-карбонітрилів **1.21** описано у



роботі *Mariappan A.* та співавторів [41]. Механізм утворення цільових піранотіазолів ґрунтується на взаємодії метиленактивної групи 2-((1*H*-бензо[*d*]імідазол-2-іл)тіо)-1-фенілетан-1-ону **1.20** з ароматичними альдегідами з утворенням відповідних енонів **A**, які в подальшому взаємодіють із малонодинітрилом у мовах реакції Міхаеля утворюючи продукти 1,4-циклоприєднання **B**. Аніон, утворений шляхом депротонування Нітрогену бензімідазолу згодом атакує кетогрупу відповідного енону, яка в подальшому взаємодіє з ціаногрупою в результаті чого утворюється нові N-C і O-C зв'язки, що забезпечує формування цільових поліконденсованих піранотіазолів (схема 1.9).

Схема 1.9

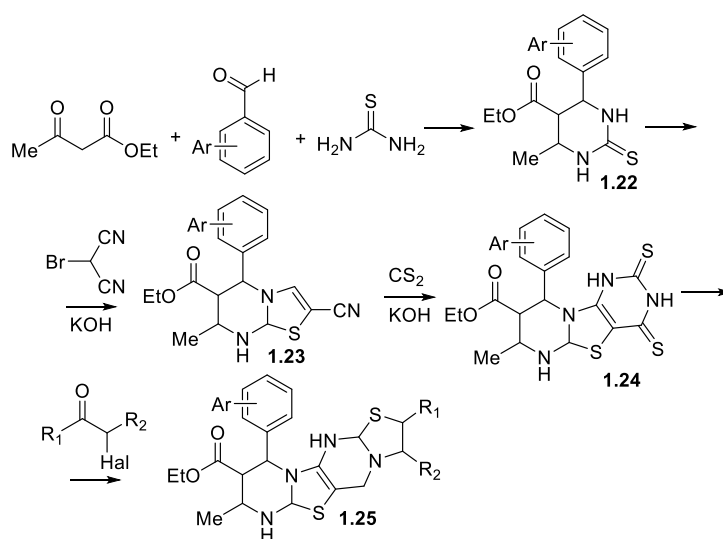


1.1.2. Синтетичні підходи до одержання анелюваних похідних тіазолу із шестичленними азагетероциклами.

Синтез різних класів похідних, що вміщують тіазолоазинове ядро у структурі (похідні тіазолопіримідину, тіазолопіперазину, тіазолопіридини та ін.) як сполук, які володіють широким спектром біологічної активності та є основою численних лікарських засобів, ґрунтується на використанні двох основних підходів, а саме анелювання азольного циклу до похідних тіазолу та відповідно, анелювання тіазольного ядра до азинового [42]. Так, у першому випадку похідні

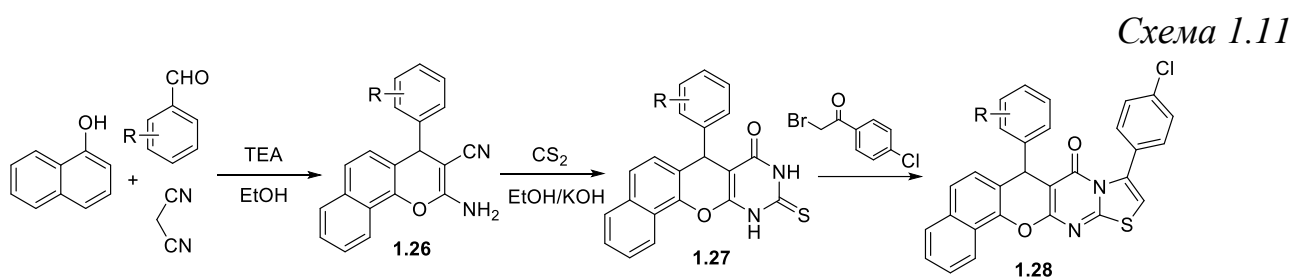
на основі піримідину синтезовані в умовах реакції Біджінеллі [43-47], яка ґрунтується на взаємодії в середовищі етанолу ароматичних альдегідів, ацетоацетатного естеру та тіосечовини, які є ключовими вихідними сполуками у синтезі різних класів похідних тiazоло[3,2-*a*]піримідину. Зокрема, у роботах *Youssef M.* та співавторів було повідомлено, що взаємодія етил 4-арил-6-метил-2-тіоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-карбоксилатів **1.22** та бромомалононітрилу у середовищі етанолу та у присутності натрію гідроксиду призводить до утворення етил 3-аміно-5-арил-2-ціано-7-метил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксилатів **1.23**. Зазначені сполуки як типові енамініонітрили можуть бути легко трансформовані у відповідні похідні на основі тiazолодипіримідину. Так, взаємодія похідних **1.23** та карбон дисульфїду при нагріванні зумовлює утворення 9-арил-2,4-дитіоксо-7-метилтіазоло[3,2-*a*:4,5-*d*]дипіримідин-8-карбоксилатів **1.24**. Варто відзначити, що дані тiazолодипіримідини легко взаємодіють при нагріванні у середовищі етанолу з  $\alpha$ -галогенкарбонільними сполуками, а саме хлороацетоном, фенацилбромідом та 3-хлоропертан-2,4-діоном та дають з високими виходами відповідні тiazоло[3'',2'':1',2']піримідо[4',5':4,5]тіазоло-[3,2-*a*]піримідин-9-карбоксилати **1.25** [48].

Схема 1.10



*Banoth S.* та співавтори синтезували серію сполук на основі бензохромено[2,3-*d*]тіазолопіримідину [49]. При взаємодії  $\alpha$ -нафтолу,

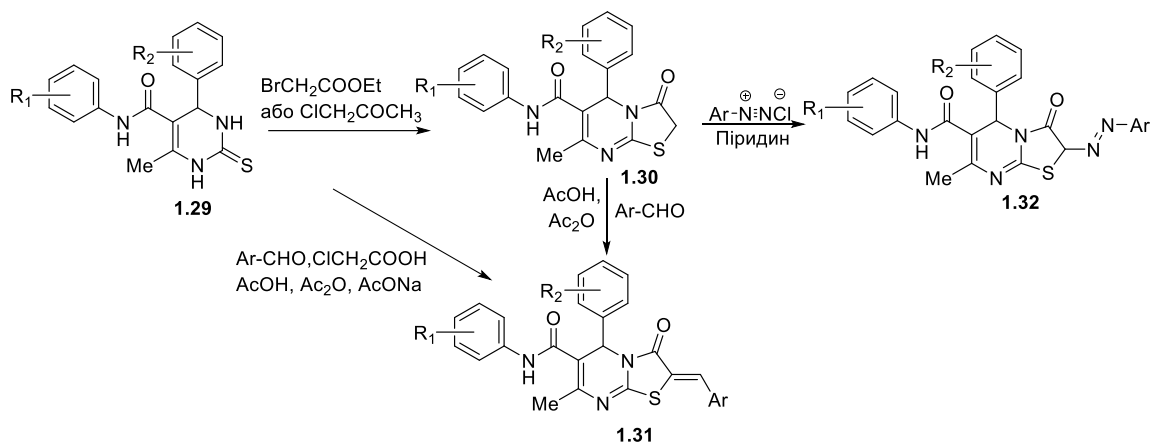
малононітрилу та ароматичних альдегідів у присутності триетиламіну як каталізатора були синтезовані вихідні 2-аміно-4-арил-4*H*-бензо[*h*]хромено-3-карбонітрили **1.26**. Зазначені сполуки були трансформовані у відповідні 7-арил-10-тіоксо-7,9,10,11-тетрагідро-8*H*-бензо[7,8]хромено[2,3-*d*]піримідин-8-они **1.27** шляхом взаємодії карбоном дисульфідом у присутності калію гідроксиду в середовищі етанолу. На заключному етапі конденсацією сполук **1.27** з 4-хлорфенацилбромідом у середовищі оцтової кислоти одержано цільові 10-(4-хлорфеніл)-7-арил-7*H*,8*H*-бензо[7,8]хромено[2,3-*d*]тіазоло[3,2-*a*]піримідини **1.28** (схема 1.11).



Ряд функціонально-заміщених похідних тіазоло[3,2-*a*]піримідину одержано із *N*-(4-феніл)-4-(арил)-6-метил-2-тіоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-карбоксамідів **1.29**, що повідомлено *Alzahrani H. E.* та співавторами [50]. Так, при нагріванні похідних **1.29** із етилбромоацетатом або хлорацетоном у присутності натрію гідроксиду було одержано *N*-(4-феніл)-5-(4-феніл)-3,7-диметил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксаміди **1.30**. Дані сполуки містять у структурі метиленактивну групу, що обумовлює подальшу структурну модифікацію в умовах в реакції Кньюенагеля з ароматичними альдегідами, а також реакції азосполучення з солями діазонію з утворенням відповідних 5-іліден- **1.31** та 2-арилгідрозо похідних **1.32**. Варто відзначити, що 5-іліден-похідні **1.31** були також синтезовані в умовах трикомпонентної реакції *N*-(4-феніл)-4-арил-6-метил-2-тіоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-карбоксамідів, хлороцтової кислоти, відповідних ароматичних альдегідів у середовищі оцтової кислоти у присутності ацетату натрію як основного каталізатора (схема 1.12). Подібні синтетичні дослідження були проведені також науковою групою *Nadeem*

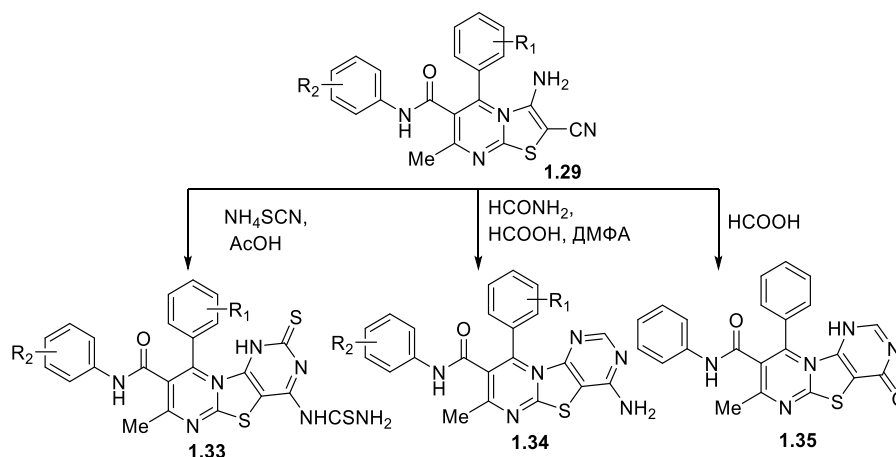
*M.S.* та співавторів, які одержали тiazоло[3,2-*a*]піримідини з фрагментами циклічних дикетонів, а саме димедону та його структурних аналогів [51].

Схема 1.12



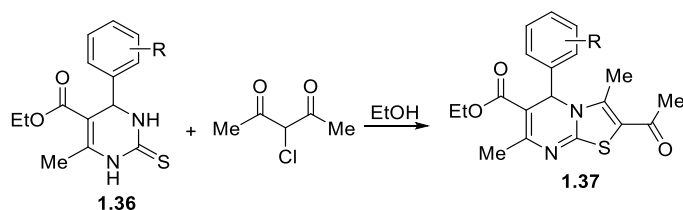
У продовженні своїх досліджень *Alzahrani H. E.* та співавтори також здійснили структурну модифікацію 3-аміно-2-ціано-*N*,5-біс(4-феніл)-2-алкіл-7-метил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксамідів **1.29** як типових енамініонітрів у реакції з роданідом амонію, формамідом та мурашиною кислотою, що дозволило одержати ряд поліконденсованих тіазолодипіримідинів **1.33-1.35** [50] (схема 1.13).

Схема 1.13



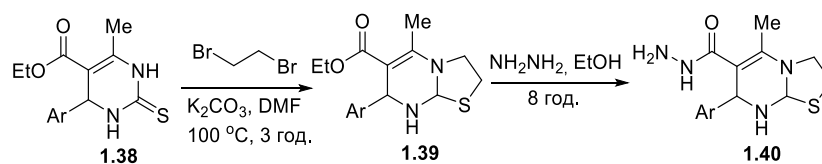
Подібні дослідження стосовно синтезу похідних тіазоло[3,2-*a*]піримідину було опубліковано *Shashi R.* та співавторами [52]. Зокрема, взаємодія заміщених похідних 3,4-дигідропіримідин-2-тіону **1.36** та 3-хлорпертан-2,4-діону призводить до утворення ряду 2-ацетил-5-(2-феніл)-3,7-диметил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксилату **1.37** (схема 1.14).

Схема 1.14



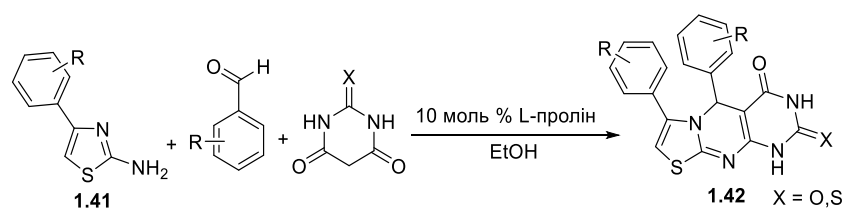
Один із варіантів синтезу похідних тiazолопіримідину ґрунтується на взаємодії заміщених піримідинових естерів **1.38** з 1,2-дибромоетаном в присутності калію карбонату у середовищі ДМФА з утворенням етил 7-(арил)-5-метил-2,3-дигідро-7*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксилатів **1.39**, які в подальшому при взаємодії з гідрозин-гідратом утворюють відповідні карбогідрази **1.40** (схема 1.15) [53].

Схема 1.15



Інший варіант синтезу похідних тiazоло[3,2-*a*]піримідину ґрунтується на реакціях заміщених амінотіазолів з карбонільними 1,3-біелектрофільними сполуками або їх синтетичними попередниками [54,55]. Так, з метою синтезу оригінальних інгібіторів MMP-2 та MMP-9 кіназ серед похідних піримідо[4,5-*d*][1,3]тіазоло[3,2-*a*]піримідину **1.42** *Sukanya S. H.* та співавтори використали каталізовану *L*-проліном трикомпонентну реакцію 2-аміно-4-(4-феніл)тіазолів **1.41**, ароматичних альдегідів, та барбітурової/тіобарбітурової кислоти у водному етанолі (схема 1.16) [56].

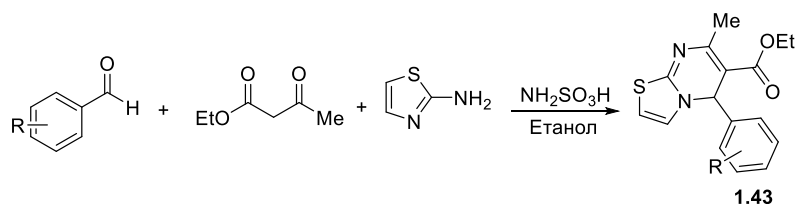
Схема 1.16



Ще один приклад синтезу похідних тiazолопіримідину, а саме етил 7-метил-5-феніл-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-6-карбоксилатів **1.43** повідомлено у

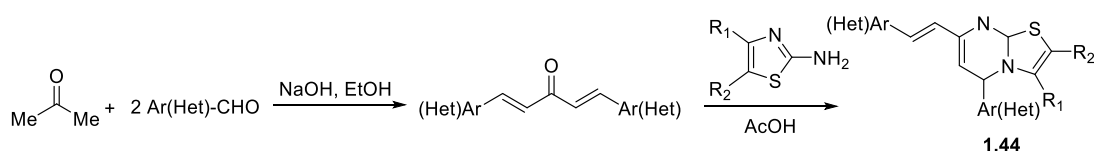
роботі *Batool I.* та співавторів [57]. Зазначені сполуки синтезовані з високими виходами (65-81%) в умовах *one-pot* багатокомпонентної реакції ароматичних альдегідів, етилацетоацетату і 2-амінотіазолу в присутності аміносурьфанонової кислоти в середовищі етанолу (схема 1.17).

Схема 1.17



Синтез нових похідних тіазоло[3,2-*a*]піримідину **1.44** також здійснено шляхом взаємодії похідних 2-амінотіазолу та диариліденацетонів у середовищі оцтової кислоти, що було описано у роботі *Al-Rashood S. T.* та співавторів [58]. Варто відзначити, що вихідні диариліденацетони були одержані з високими виходами в умовах реакції альдольної конденсації ацетону та ароматичних чи гетероциклічних альдегідів у присутності 10% спиртового розчину гідроксиду натрію (схема 1.18).

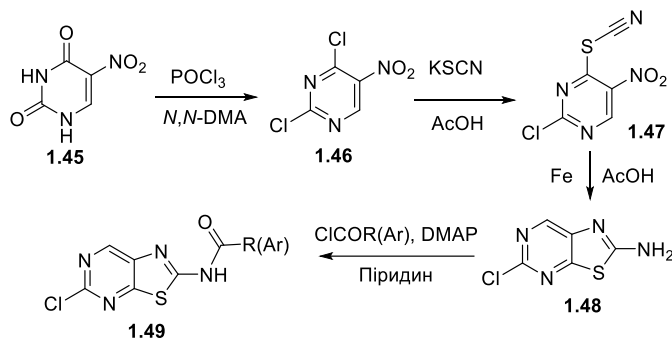
Схема 1.18



Одним із цікавих класів конденсованих систем з фрагментом тіазолу у структурі являються похідні тіазоло[5,4-*d*]піримідину, які проявляють широкий спектр біологічної активності та для яких опрацьовано доволі багато методів синтезу. Так, *Istanbullu H.* та співавторами було повідомлено про чотирьохстадійний підхід до синтезу похідних *N*-(5-хлортіазоло[5,4-*d*]піримідин-2-іл)арил/алкіламідів **1.49** [59]. На першій стадії, 5-нітроурацил **1.45** при взаємодії з фосфорилхлоридом та *N,N*-диметиланіліном був трансформований у відповідний 2,4-дихлоро-5-нітропіримідин **1.46**. У подальшому даний продукт реагував з калій тіоціанатом у середовищі льодяної оцтової кислоти з утворенням 2-хлоро-4-тіоціанато-5-нітропіримідину **1.47**. На наступному етапі сполука **1.47** в умовах реакції відновлення нітрогрупи порошком заліза зазнавала *in situ*

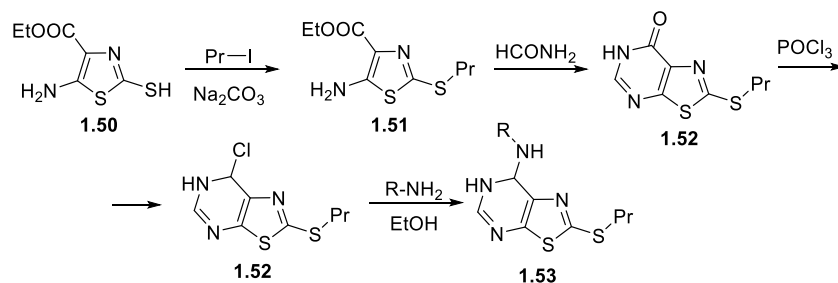
циклізації з утворенням відповідного 5-хлоро-тіазоло[5,4-*d*]піримідину **1.48**. На останній стадії цільові аміді **1.49** були одержані при взаємодії сполуки **1.48** із різними ацилхлоридами у середовищі піридину в присутності 4-диметиламінопіридину (DMAP) як каталізатора (схема 1.19).

Схема 1.19



Інший метод отримання тіазоло[5,4-*d*]піримідинів базується на використанні етил 5-аміно-2-меркаптотіазол-4-карбоксилату **1.50** як вихідної сполуки, яку надалі водили у реакцію алкілування пропілйодидом у середовищі карбонату натрію з утворенням похідного **1.51**. У подальшому сполука **1.51** взаємодіяла з формамідом з утворенням тіазоло[5,4-*d*]піримідинону **1.52**, який шляхом взаємодії з оксихлоридом фосфору утворив відповідний 7-хлортіазоло[5,4-*d*]піримідин **1.53**. Сполука **1.53** здатна реагувати з відповідними амінами в умовах реакції нуклеофільного заміщення з утворенням цільових 4-амінопохідних тіазоло[5,4-*d*]піримідину **1.54** (схема 1.20) [60].

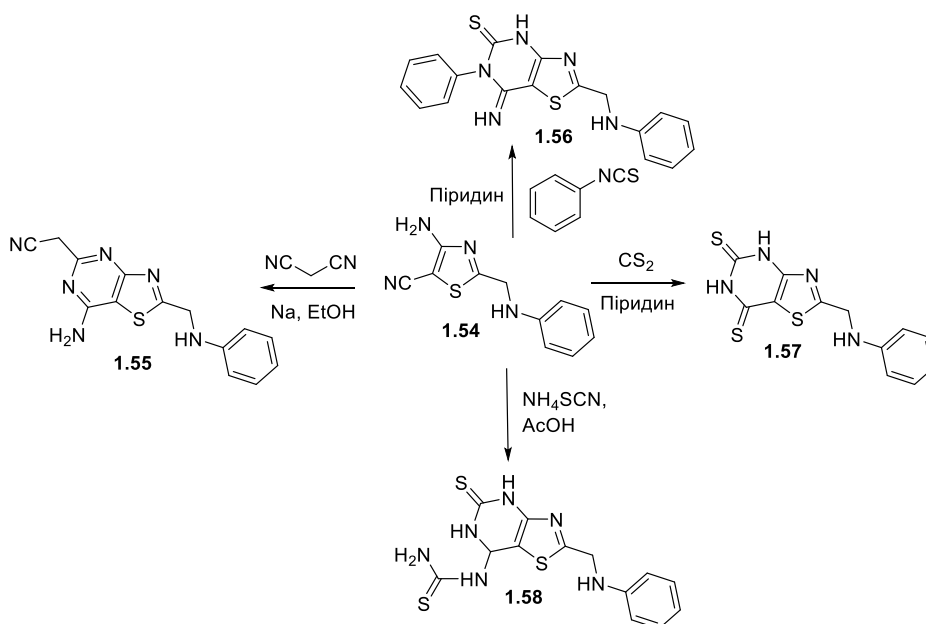
Схема 1.20



Ще одним підходом, який дозволяє отримувати тіазоло[5,4-*d*]піримідини, є використання як прекурсору 4-аміно-2-(феніламіно)тіазол-5-карбонітрилу **1.54**, що здатний взаємодіяти з малонодинітрилом, фенілізотіоціанатом, сірковуглецем та роданідом амонію з утворенням 2-(7-аміно-2-

(феніламіно)тіазоло[4,5-*d*]піримідин-5-іл)ацетонітрилу **1.55**, 7-іміно-6-феніл-2-(феніламіно)-6,7-дигідротіазоло[4,5-*d*]піримідин-5(4*H*)-тіону **1.56**, 2-(феніламіно)тіазоло[4,5-*d*]піримідин-5,7(4*H*,6*H*)-дитіону **1.57** та 1-(2-(феніламіно)-5-тіоксо-4,5-дигідротіазоло[4,5-*d*]піримідин-7-іл)тіосечовини **1.58** (схема 1.21) [61].

Схема 1.21

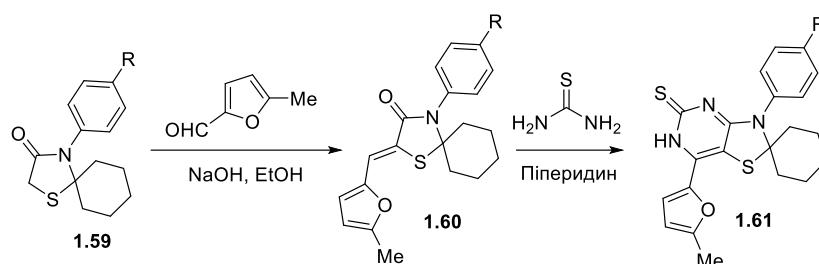


У роботі *Flefel E. M.* та співавторів [62] було встановлено, що зручними реагентами для одержання тіазоло[5,4-*d*]піримідинів є також 8-заміщені-4-арил-1-тіа-4-азаспіро[4.5]декан-3-они **1.59**. Зазначені сполуки отримані шляхом трикомпонентної "one-pot" взаємодії амінів, альдегідів та тіогліколевої кислоти в середовищі бензену з використанням насадки Діна-Старка згідно відомих методик [63,64]. Синтезовані 2,3-дизаміщені 4-тіазолідинони здатні легко вступати у реакцію Кньовенагеля (середовище етанол, каталізатор – натрій гідроксид) як 5-метиленактивні гетероцикли з рядом ароматичних чи гетероциклічних альдегідів, що дозволило одержати серію 5-іліденопохідних **1.60**. Останні досить легко перетворюються у відповідні тіазоло[5,4-*d*]піримідини **1.61** внаслідок циклізації з тіосечовиною у середовищі етанолу та в присутності піперидину як каталізатора (схема 1.22). Окрім того, одержані похідні тіазоло[5,4-*d*]піримідину були також в подальшому трансформовані шляхом взаємодії з глікозилбромідом у середовищі ацетону у відповідні S-глікозиди, які



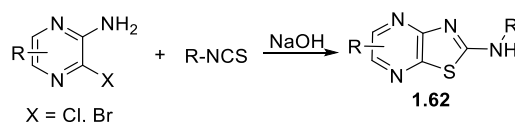
були оцінені на предмет протипухлинної активності. Важливо відмітити, що вихідні сполуки у синтезі тiazоло[5,4-*d*]піримідинів – 5-іліденопохідні 2,3-дизаміщених-4-тіазолідонів є також доволі цікавим самостійним об'єктом досліджень інших наукових груп, які встановили доволі широкий спектр біологічної активності для даного класу сполук [65-67].

Схема 1.22



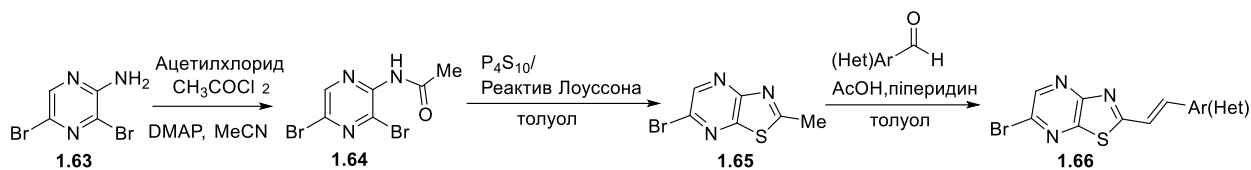
Іншим класом тiazолоазинів важливих з точки зору фармакологічного потенціалу являються похідні тiazоло[4,5-*b*]піразину. Так, *Abdildinova A.* та ін. при кип'ятінні 2-аміно-3-хлор(бром)піразину та фенілізотіоціанату у середовищі ацетону та присутності натрію гідроксиду як каталізатора отримали ряд *N*-заміщених-2-амінотіазоло[4,5-*b*]піразинів **1.62** (схема 1.23) [68].

Схема 1.23



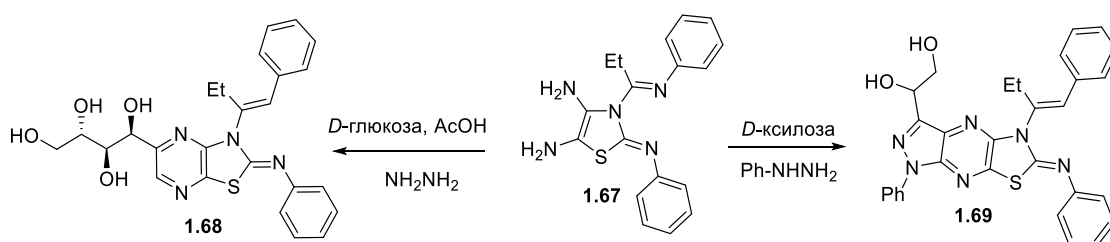
*Sawazaki T.* і співавтори одержали похідні 6-бромо-2-(арил(гетерил)проп-1-ен-1-іл)тіазоло[4,5-*b*]піразину **1.66**, використовуючи як вихідну речовину 3,5-дибромпіразин-2-амін **1.63**, який при взаємодії з ацетилхлоридом призводив до утворення *N*-(3,5-дибромпіразин-2-іл)ацетаміду **1.64**. На наступній стадії сполука **1.64**, взаємодіючи з реактивом Лоуссона, циклізувала у 6-бром-2-метилтіазоло[4,5-*b*]піразин **1.65**, який при конденсації Кньюенагеля з ароматичними та гетероциклічними альдегідами утворював цільові продукти **1.66** (схема 1.24) [69].

Схема 1.24



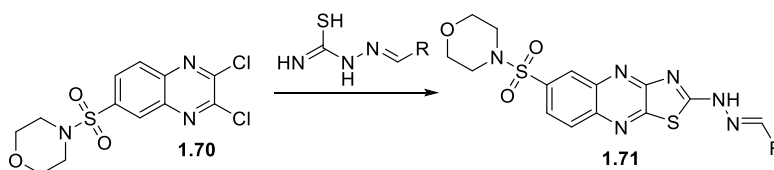
*Ghoneima A. A.* та співавтори повідомили про реакцію заміщеного похідного тiazолу **1.67** з гідразингідратом та *D*-глюкозою у середовищі оцтова кислота - вода, яка супроводжувалась формуванням проміжного інтермедіату гідразону глюкози, що в подальшому призводить до утворення нових *S*-глікозидних похідних на основі тiazоло[4,5-*b*]піразину **1.68**. У випадку взаємодії заміщеного похідного тiazолу з фенілгідразином та *D*-ксилозою авторами були одержані похідні піразоло[3,4-*b*][1,3]тiazоло[4,5-*e*]піразину **1.69** (схема 1.25) [70].

Схема 1.25



*Attmara Y. A.* і співавтори повідомили про ефективний спосіб одержання похідних тiazоло[4,5-*b*]хіноксаліну **1.71** шляхом взаємодії заміщеного хіноксаліну **1.70** і різноманітних тіосемікарбазонів як *S,N*-1,3-бінуклеофілів при кип'ятінні у середовищі ацетонітрилу [71]. Варто відзначити, що формування тiazольного циклу у даній реакції відбувається шляхом *S*-алкілювання, яке супроводжується нуклеофільним приєднанням  $C=NH$  (іміно) групи з подальшою елімінацією  $HCl$ .

Схема 1.26



1.2. Синтетичні підходи до одержання функціоналізованих похідних хінону з фрагментом тіазолу/тіазолідинону як потенційних біологічно активних сполук.

Похідні на основі хінону, являють собою клас сполук на основі спряженого циклогексадієнону та їх анельованих аналогів, які широко поширені у природі. Зокрема було ідентифіковано близько 1200 різних хінонів, які в основному містяться у багатьох видах рослин [72-77], грибів [78-81], бактерій [82-85], а також тваринах [86-89], особливо голкошкірих. Варто відзначити, що велика кількість токсичних похідних хінону утворюється також у навколишньому середовищі шляхом фотохімічного окислення поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) [90-93], як компонентів кам'яного вугілля, нафти, та які, як відомо, є потужними мутагенними, тератогенними та канцерогенними агентами. Основною структурною особливістю хінонів є *орто*- або *пара*-заміщений діон поєднаний із ароматичним ядром (бензохінон) або наявність поліциклічної ароматичної системи, зокрема нафтохінону, антрахінону, антрациклінону тощо (рис.1.4.). Відомо, що похідні на основі хінону також лежать в основі великої кількості лікарських засобів та біологічно активних сполук з різноманітною біологічною активністю [94-97].

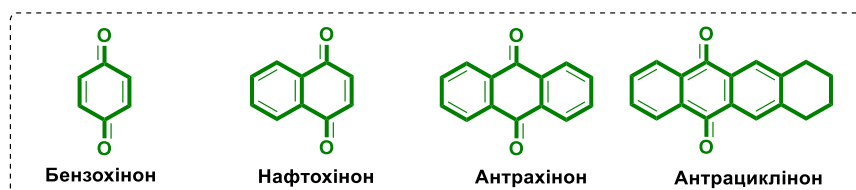
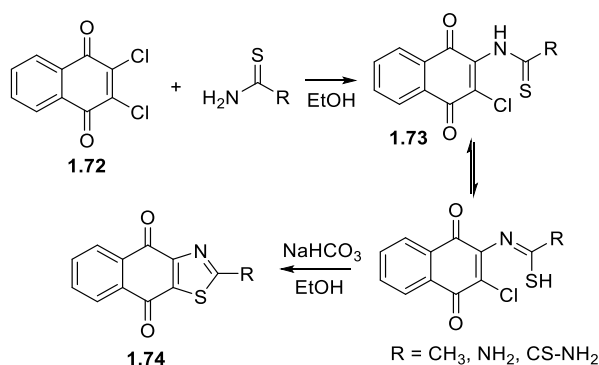


Рис. 1.4. Структури похідних на основі хінону з біологічною активністю, які представлені у даному фрагменті нашої роботи.

Структура хінонів дозволяє проводити їх широку синтетичну модифікацію, що приводить до похідних, які вміщують інші фармакофорні фрагменти у структурі, включно з фрагментами тіазолу/тіазолідинону.

Зокрема у роботах *Hammat A. S.* та співавторів було запропоновано синтез похідних нафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діону **1.74**, який реалізується взаємодією 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону **1.72** та тіоамідів в середовищі етанолу. Проміжні продукти, а саме похідні 2-тіоамідо-3-хлоро-1,4-нафтохінону **1.73** були також ізольовані, які надалі були трансформовані у кінцеві продукти шляхом нагрівання з натрій гідрокарбонатом у середовищі етанолу [98] (схема 1.27).

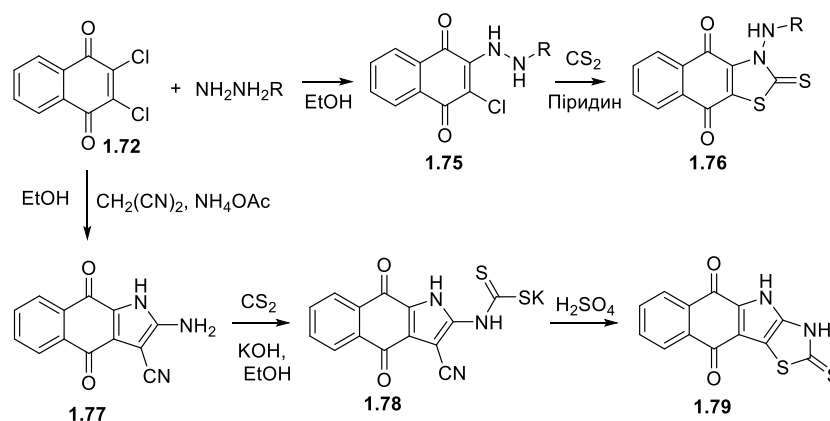
Схема 1.27



*Al-Alshaikh M. A.* та співавтори встановили, що похідні 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону **1.72** реагують із рядом інших нуклеофілів, що супроводжується заміщенням одного чи двох атомів хлору нафтохінонового фрагменту [99]. Зокрема досліджено взаємодію сполуки **1.72** із фенілгідразинами, малондинітрилом та дисульфідом карбону в умовах реакції нуклеофільного заміщення та Міхаелівського приєднання з подальшою елімінацією. Так, реакція 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону **1.72** з фенілгідразинами у середовищі етанолу призводила до одержання монозаміщених продуктів, а саме 2-хлоро-3-(2-арилгідразиніл)нафтален-1,4-діонів **1.75**, які в подальшому циклізували при взаємодії з дисульфідом карбону у середовищі піридину у відповідні 3-ариламіно-2-тіоксо-2,3-дигідро-нафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діони **1.76**. Окрім того, автори вводили сполуку **1.72** в реакцію з малондинітрилом і амоній ацетатом у середовищі етанолу з утворенням відповідного 2-аміно-4,9-діоксо-4,9-дигідро-1*H*-бензо[*f*]індол-3-карбонітрилу **1.77**. Зазначена сполука була трансформована

у відповідний 3-ціано-4,9-діоксо-4,9-дигідро-1*H*-бензо[*f*]індол-2-ілкарбамодітіоат **1.78** шляхом взаємодії з дисульфідом карбону у середовищі етанольного розчину натрій гідроксиду. На фінальній стадії сполука **1.78**, що вміщує нітрильну групу у структурі піддавалася гідролізу концентрованою сірчаною кислотою з утворенням відповідного похідного з карбоксильною групою у структурі, яке в подальшому вступало у реакцію нуклеофільного заміщення із меркапто-групою дитіокарбаматного фрагменту з утворенням цільового 2-тіоксо-2*H*-бензо[*f*]тіазоло[4,5-*b*]індол-5-10(3*H*,4*H*)-діону **1.79** (схема 1.28).

Схема 1.28



У роботі *Fandy R. F.* було здійснено синтез гетероциклічних похідних хінону з вузловими атомами Нітрогену виходячи із 2-амінонафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діону **1.80** [100]. Так, вихідний 2-амінонафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діон **1.80** при взаємодії з фенацилбромідом призводив до утворення гідроброміду 2-іміно-3-бензоілметилнафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діону **1.81**, як інтермедіату, який у середовищі абсолютного етанолу зазнає подальшої циклізації з утворенням 2-фенілімідазо[2,1-*b*]нафто[2,3-*d*]тіазол-5,10-діону **1.82**. Взаємодія вихідної сполуки з монохлороцтовою кислотою призводила до 2-гідроксиімідазо[2,1-*b*]нафто[2,3-*d*]тіазол-5,10-діону **1.83**. При нагріванні вихідної сполуки **1.80** з диетилноксалатом автором було одержано 2,3-дигідроімідазо[2,1-*b*]нафто[2,3-*d*]тіазол-2,3,5,10-тетрон **1.84** з високим виходом і задовільною чистотою. Взаємодія похідного **1.80** з 2,3-дихлорохіноксаліном у абсолютному етанолі дозволила одержати хіноксаліно[2,3:4,5]імідазо[2,1-*b*]нафто[2,3-*d*]тіазол-8,3-

діон **1.85** (Схема 1.29). Нагрівання сполуки **1.80** з етилакрилатом дозволило автору ізолювати проміжний продукт 2-( $\beta$ -етоксикарбонілетиліміно)нафто[2,3-*d*]тіазол-4,9-діон **1.86**, який в подальшому циклізував до відповідного 2,3,4-тригідронафто[2,3-*d*]тіазоло[3,2-*a*]піримідин-4,6,11-тріону **1.87**. Циклізація похідного **1.80** з етилацетоацетатом та диетилмалонатом у присутності поліфосфорної кислоти (PPA) дала змогу одержати оригінальні 2-метил-4-гідронафто[2,3-*d*]тіазоло[3,2-*a*]піримідин-4,6,11-тріон **1.88** та 2,3,4-тригідронафто[2,3-*d*]тіазоло[3,2-*a*]піримідин-2,4,6,11-тетрон **1.89**, відповідно (Схема 1.30).

Схема 1.29

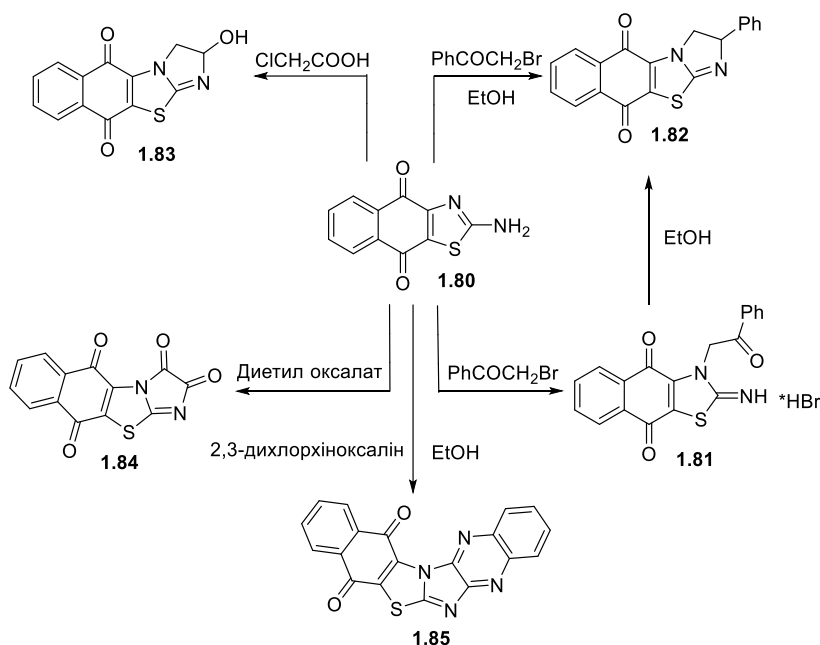
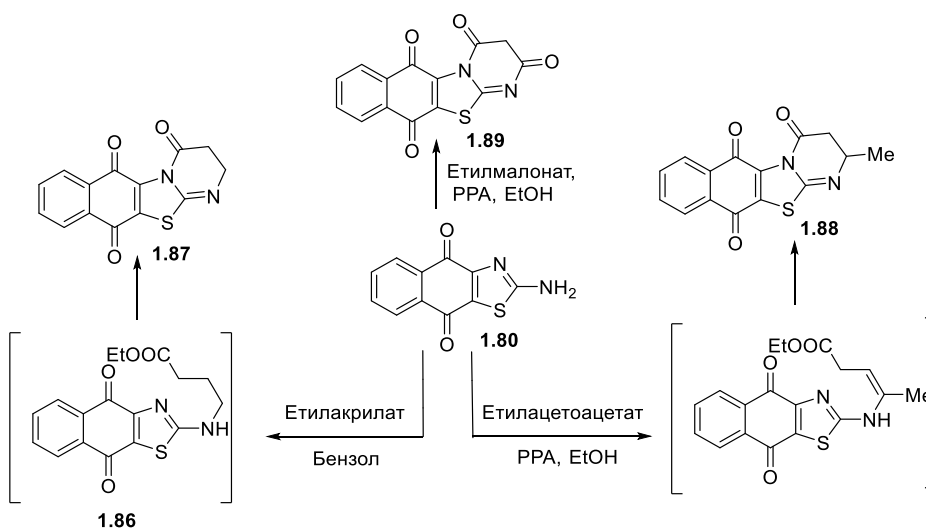
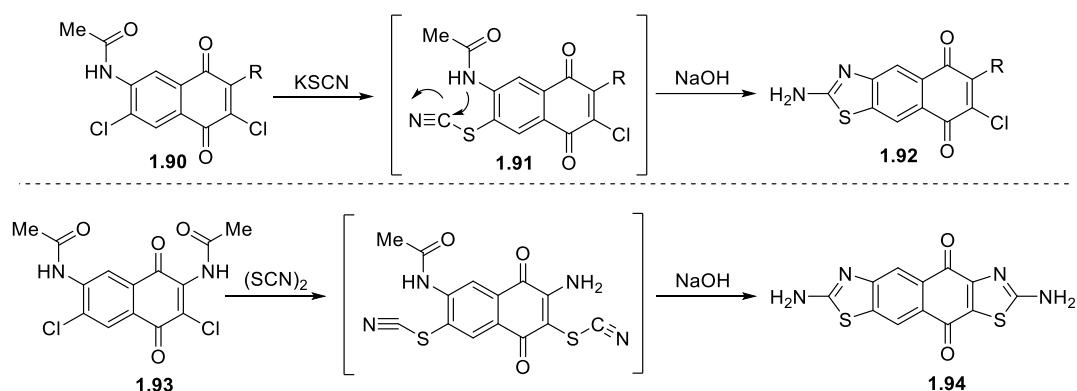


Схема 1.30



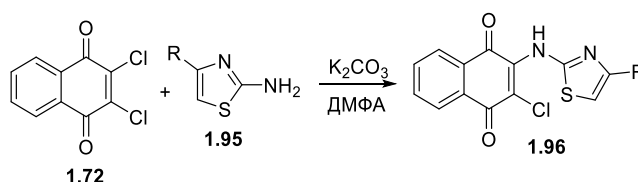
*Stasevych M.* розробила метод синтезу нових трициклічних похідних хінону з фрагментом тіазолу у структурі [101]. У якості вихідного реагенту було використано 2-*R*-3,6-дихлор-7-ациламіно-1,4-нафтохінон **1.90**, у якого атом Карбону в положенні 6 був активований ацилюванням аміногрупи в положенні 7. Дана сполука взаємодіяла з калію тіоціанатом шляхом приєднання нуклеофільного аніону тіоціанатної групи з утворенням інтермедіату **1.91**, який в подальшому при додаванні NaOH циклізував з утворенням відповідного амінопохідного **1.92**. Даним автором також було одержано відповідний 2,7-діаміно-1,8-дитіо-3,6-діазодіциклопентанафтален-4,10-діон **1.94** виходячи з діацильного похідного **1.93** при взаємодії із NaOH (схема 1.31).

Схема 1.31



У роботі *Olawode E. O.* та співавторів описано синтез 2-хлоро-3-[(тіазол-2-іл)аміно]-1,4-нафтохінонів **1.96** в умовах реакції нуклеофільного заміщення атому хлору 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону **1.72** похідними 2-амінотіазолу **1.95** в середовищі ДМФА в присутності карбонату калію (схема 1.32) [102].

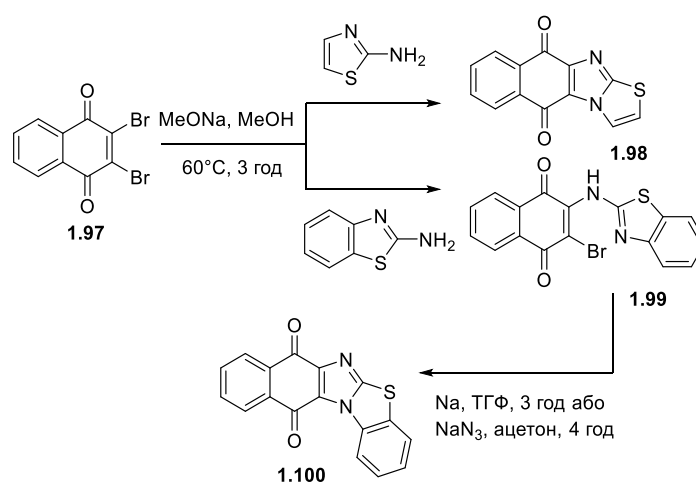
Схема 1.32



Синтез нафто[2',3':4,5]імідазо[2,1-*b*][1,3]тіазол-5,10-діону **1.98** та нафто[2',3':4,5]імідазо[2,1-*b*][1,3]бензотіазол-7,12-діону **1.100** було здійснено *Khalafy J.* та співавторами [103]. У якості вихідної сполуки було використано 2,3-

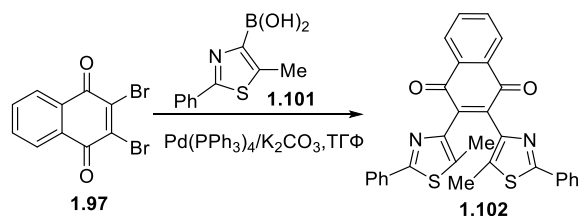
дибromo-1,4-нафтохіон **1.97**, який при взаємодії із 2-амінотіазолом у присутності метилату натрію у середовищі метанолу призводив до утворення цільової сполуки **1.98**. Окрім того в результаті реакції вихідної сполуки із 2-амінобензотіазолом за аналогічних умов реакції було одержано 2-(бензо[*d*]тіазол-2-іламіно)-3-бромонафтален-1,4-діон **1.99**, який в подальшому при взаємодії з металічним натрієм у середовищі ТГФ або азидом натрію у середовищі ацетону трансформувався у продукт **1.100** (Схема 1.33).

Схема 1.33



*Kose M.* та ін. запропонували ефективний метод синтезу 2,3-біс-(5-метил-2-феніл-4-тіазоліл)-1,4-нафтохіону **1.102** в результаті реакції Судзукі тіазоліл боронової кислоти **1.101** та 2,3-дибromo-1,4-нафтохіону **1.97** (схема 1.34) [104].

Схема 1.34

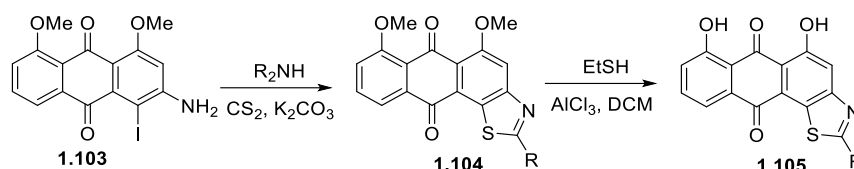


*Liang Y.-K.* та співавтори розробили зручний метод синтезу антра[2,1-*d*]тіазол-6,11-діонів **1.105** [105] як структурних аналогів топопірону С, природньої сполуки ізольованої з грибів, що володіє помітною протираковою активністю і є ефективним інгібітором топоізомерази I [106-111]. Спочатку



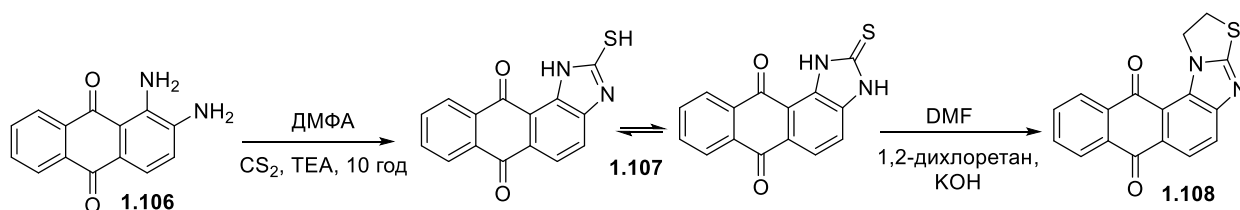
автори здійснили синтез ключової вихідної сполуки **1.103** шляхом селективного йодування у положення С-4 3-аміно-1,8-диметоксиантрацен-9,10-діону у присутності срібла сульфату. Одержану сполуку **1.103** вводили у «one pot» реакцію з вторинними амінами та сірковуглецем в середовищі ДМФА з утворенням похідних **1.104** з 50-90% виходом. Після цього було здійснене деметилювання похідних **1.104** в присутності EtSH/AlCl<sub>3</sub> або BBr<sub>3</sub> при кімнатній температурі з отриманням цільових антра[2,1-*d*]тіазол-6,11-діонів **1.105** (схема 1.35).

Схема 1.35



У роботі *Chen T.-C.* та співавторів було повідомлено про ефективний метод синтезу 1,2-дигідроантра[2',1':4,5]імідазо[2,1-*b*]тіазол-7,12-діону **1.108**, де у якості вихідного реагенту використано 1,2-діаміноантрацен-9,10-діон **1.106**. Зазначена сполука в подальшому зазнавала гетероциклізації із сірковуглецем у середовищі ДМФА з утворенням відповідного імідазол-антрахінонового похідного **1.107**, яке на наступному етапі в реакції з 1,2-дихлоретаном у середовищі безводного ДМФА було трансформоване у цільове похідне тіазолу **1.108** (схема 1.36) [112].

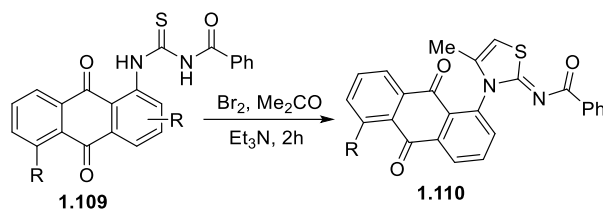
Схема 1.36



У роботі *Stasevych M.* та співавторів було повідомлено про ефективний метод синтезу 2-(*N*-бензоїліміно)-*N*-(9,10-діоксо-9,10-дигідроантрацен-1-іл)тіазолів **1.110** з відповідних *N*-бензоїл-*N'*-(9,10-діоксо-9,10-дигідроантрацен-

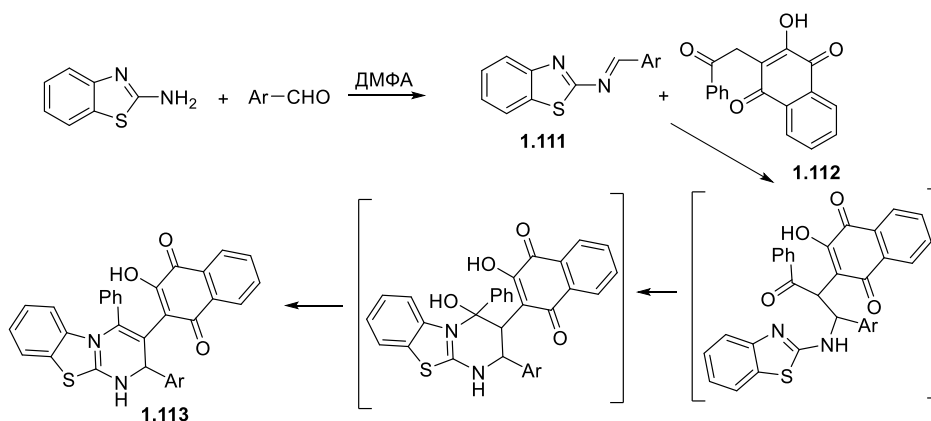
1-іл)тіосечовин **1.109** та утвореним *in situ*  $\alpha$ -бromoацетоном у присутності триетиламіну (схема 1.37) [113].

Схема 1.37



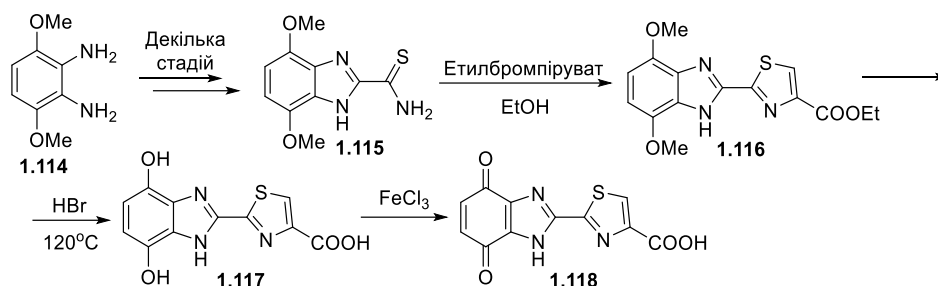
*Berghot M.A.* та співавтори запропонували реакцію основ Шиффа 2-амінобензотіазолу **1.111** та 2-гідрокси-3-(2-оксо-2-фенілетил)нафтален-1,4-діону **1.112**, яка призводить до утворення нових тіазоло[3,2-*a*]піримідинів із фрагментом нафтохінону у структурі **1.113** (схема 1.38) [114].

Схема 1.38



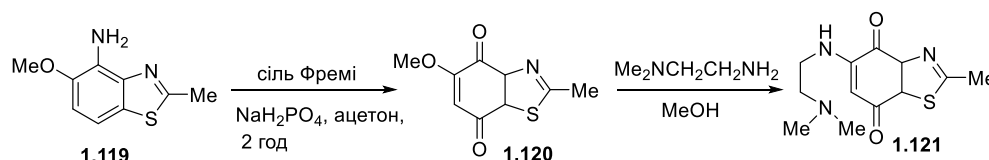
*Garuti L.* та співавтори здійснили синтез нових похідних тіазолілбензімідазол-4,7-діонів **1.118** при використанні як вихідної сполуки 2,3-діаміно-1,4-диметоксибензолу **1.114**, який в умовах кількастадійних перетворень був трансформований у відповідний тіоамід **1.115**. Сполука **1.116** з тіазольним циклом у структурі була одержана в умовах модифікованої реакції Ганча тіоаміду **1.115** з етилбромопіруватом у середовищі етанолу. Гідроліз сполуки **1.116** 48% розчином бромідної кислоти при 120 °C протягом 6 год призвів до утворення гідрохінону **1.117**, окислення якого ферум(III) хлоридом у водному середовищі при кімнатній температурі дозволило одержати цільовий хінон **1.118** (схема 1.39) [115].

Схема 1.39



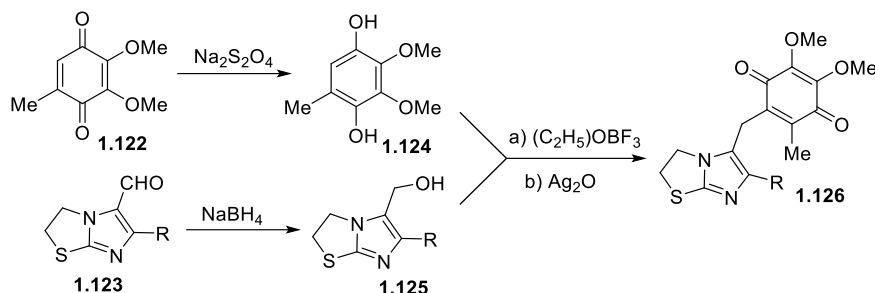
*Lavergne O.* та співавтори повідомили про синтез 5-((2-(диметиламіно)етил)аміно)-2-метил-3а,7а-дигідробензо[*d*]тіазол-4,7-діону **1.121** як CDC25C інгібітора фосфатази, яка є ключовим ензимом у регуляції клітинного циклу та відповідно, важливої біомішенню у розробці нових антипроліферативних агентів [116]. У якості вихідного реагенту авторами було використано 5-метокси-2-метилбензо[*d*]тіазол-4-амін **1.119**, який одержаний із бензотіазолу в умовах реакції нітрування та подальшого відновлення. Зазначена сполука **1.119** була окисдована до відповідного хінону **1.120** сіллю Фремі (калій нітродисульфонатом,  $(\text{KO}_3\text{S})_2\text{NO}$ ). Заміщення метоксильної групи сполуки **1.120** *N,N*-диметилетилендіаміном призводить до утворення цільового CDC25C інгібітора **1.121** (схема 1.40).

Схема 1.40



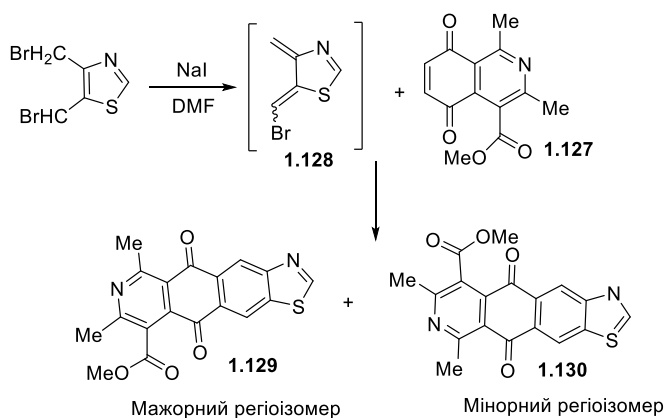
*Andreani A.* із співавторами розробили зручний метод синтезу убіхінон-імідазо[2,1-*b*]тіазолів **1.126** за допомогою реакції 2,3-диметокси-5-метилгідрохінону **1.124** та 5-гідроксиметилімідазо[2,1-*b*]тіазолу **1.125** (схема 1.41). Реакцію проводили в середовищі діоксану у атмосфері азоту щоб запобігти окисленню гідрохінону до відповідного бензохінону за використання етерату трифториду бору як кислотного конденсуючого агента та срібла (I) оксиду як окисника. Вихідна сполука **1.124** була одержана з 3-диметокси-5-метил-1,4-бензохінону **1.122** та дитіоніту натрію як відновлюючого агента, а сполука **1.125** шляхом відновлення відповідного альдегіду **1.123** борогідридом натрію [117].

## Схема 1.41



Реакція Дільса-Альдера є відомим підходом у синтезі поліциклічних похідних хінону. Проте її використання має також ряд обмежень, які базуються на помірній регіоселективності циклоприєднання, що часто призводить до складнощів у встановленні структури та ізолюванні цільових продуктів. Так, *Valderrama J. A.* та співавтори досліджували реакційну здатність похідного хінону **1.127** з 4-(бромометил)-5-(дибромометил)-тіазолом **1.128** у середовищі ДМФА та присутності йодиду натрію, що дозволило одержати суміш тетрациклічних хінонів **1.129** і **1.130** у співвідношенні 3:1, де похідне **1.129** було основним регіоізомером. Авторам не вдалось ізолювати окремі продукти методом флеш-хроматографії та препаративної ТШХ (схема 1.42) [118].

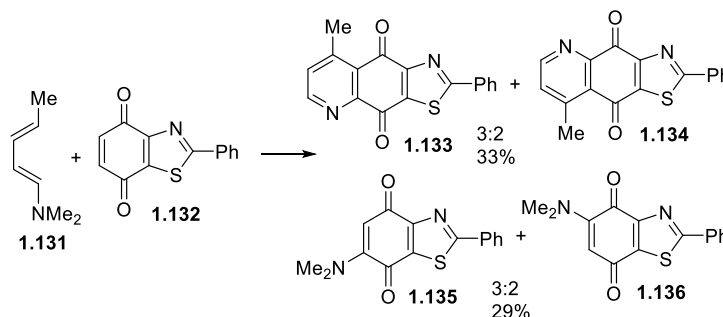
## Схема 1.42



У роботі *Lyon M. A.* та співавторів було повідомлено про синтез структурних аналогів куаноніаміну А, поліциклічного ароматичного алкалоїду на основі тіазолу, вперше ізолюваного із морського червоного молюска *Chelynotus semperi* [119-122]. Так, авторами було вивчено взаємодію азадієну **1.131** з тіазолобензохіноном **1.132** у середовищі ацетонітрилу при нагріванні з

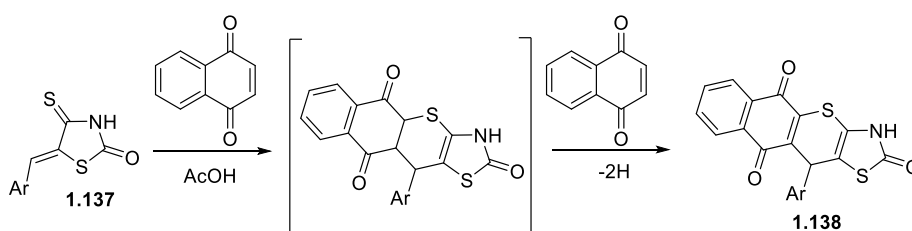
одержанням аддуктів реакції Дільса-Альдера у вигляді суміші регіоізомерів **1.133** і **1.134** (співвідношення 3:2) із 33% виходом, а також продуктів приєднання фрагменту диметиламіну до бензохінону **1.135** та **1.136** (співвідношення 3:2) із 29 % виходом (схема 1.43) [123].

Схема 1.43



Працівниками кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького також було апробовано використання похідних 1,4-нафтохінону як дієнофілів у реакції *гетеро*-Дільса-Альдера у синтезі поліциклічних тіопіранотіазолів з біологічною активністю. Так, у роботах *Atamanuyk D.* та співавторів було використано 5-ариліден-4-тіоксо-2-тіазолідинони **1.137** як гетеродієни у реакції *гетеро*-Дільса-Альдера з 1,4-нафтохіноном з утворенням 11-заміщених 3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів **1.138**. Реакцію проводили у середовищі оцтової кислоти у присутності 1,4-гідрохінону як інгібітора полімеризації. Варто відзначити, що у даному перетворенні продукти [4+2]-циклоприєднання піддаються спонтанній оксидації (дегідрогенуванню) з утворенням цільових сполук, як представлено на схемі 1.44 [124].

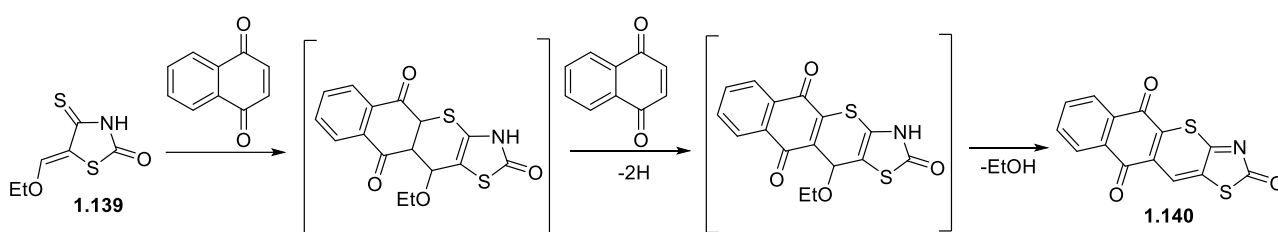
Схема 1.44



Продовуючи дослідження похідних тіопіранотіазолу на основі 1,4-нафтохінону *Atamanuyk D.* та співавторами було здійснено синтез 5,10-дигідро-

2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріону **1.140** в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера виходячи із 5-етоксиметиліден-4-тіоксо-2-тіазолідинону **1.139** як гетеродієну та 1,4-нафтохінону як дієнофілу. Утворення цільової сполуки **1.140** відбувається шляхом дегідрування надлишком гідрохінону аддукту [4+2]-циклоприєднання з утворенням додаткового ендоциклічного подвійного зв'язку, з подальшою елімінацією EtOH та делокалізацією спряженого подвійного зв'язку, що було підтверджено <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопією та мас-спектрометрією (схема 1.45) [125].

Схема 1.45



### 1.3. Механізми реалізації біологічної активності поліфункціональних похідних тіазолу/тіазолідинону.

У літературі представлені численні дані щодо синтезу нових похідних 4-тіазолідинону та їх структурних аналогів та скринінгу їх біологічної активності. Проте існує обмаль робіт, які присвячені детальному встановленню механізмів реалізації біологічної активності даного класу сполук. Враховуючи те, що основним завданням сучасної медичної хімії є пошук та ідентифікація сполук-лідерів, як основи для створення нових лікарських засобів, ідентифікація лише агентів із певним видом активності навіть високих значень явно є не достатнім. Це зумовлено тим, що високоактивні сполуки в подальшому підлягають набагато глибшим дослідженням, які охоплюють доклінічні, клінічні випробування, встановлення токсичності, які лише на фінальній стадії можуть дати розуміння чи буде мати сполука можливість на впровадження у медичну і фармацевтичну практику. Відповідно, даний фрагмент роботи присвячений аналізу літературних

даних, які описують механізми реалізації біологічної активності похідних 4-тіазолідинону на прикладі існуючих лікарських засобів або сполук, які перебувають на стадії доклінічного випробування або інших поглиблених досліджень.

Серед похідних на основі 4-тіазолідинону одними із найбільш відомих лікарських засобів є глітазони як відома група протидіабетичних засобів із детально встановленим механізмом біологічної активності [126-129]. Так, клітинний механізм дії глітазонів є опосередкований зв'язуванням і активацією пероксисомального проліфератор-активованого рецептора типу гамма (PPAR $\gamma$ ) [130-136]. PPAR $\gamma$  є ядерним рецептором, який діє як фактор транскрипції, регулюючи транскрипцію і експресію специфічних генів [137,138]. Разом із іншими ізоформами PPAR $\alpha$  та PPAR $\beta$  він належить до тієї групи, що рецептори гормонів щитовидної залози та стероїдів. Рівень експресії PPAR $\gamma$  є найвищим в адипоцитах, клітинах кишківника і макрофагах, але дуже низьким у більшості інших тканин, включаючи м'язову тканину. Ендогенними лігандами до PPAR $\gamma$  є довголанцюгові ненасичені жирні кислоти та протанойди. Під час активації PPAR $\gamma$  гетеродимеризується з рецептором ретиноїду X і активований комплекс згодом зв'язується зі специфічними сегментами ДНК, щоб індукувати транскрипцію PPAR-чутливих елементів (PPRE) (Рис.1.5) [139].

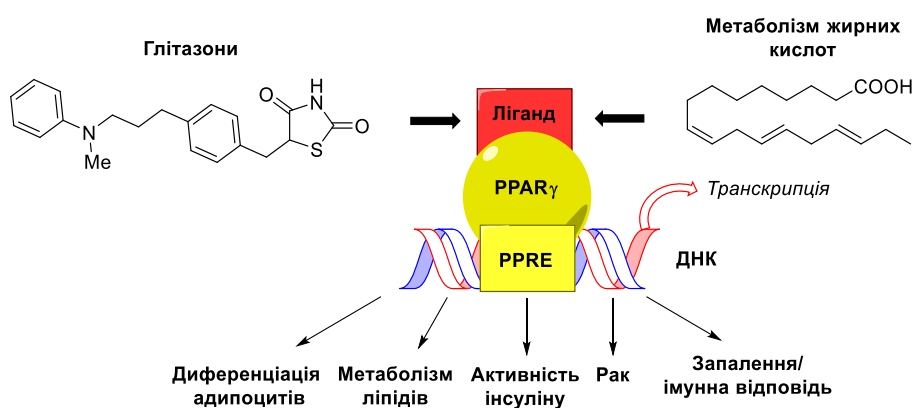


Рис. 1.5. Механізм активації пероксисомального проліфератор-активованого рецептора типу гамма (PPAR $\gamma$ ) глітазонами.

При проведенні клінічних досліджень глітазонами було встановлено збільшення стимульованого інсуліном поглинання глюкози, шляхом експресії PPAR $\gamma$  в жировій тканині [140-142]. Варто відзначити, що детально встановлено взаємозв'язок між ожирінням та інсулінорезистентністю. Зокрема ожиріння вважається основною причиною діабету 2-го типу. Дослідження показали також незначну експресію PPAR $\gamma$  в скелетних м'язах, що є також опосередкованим ефектом протидіабетичних тiazолідинонів [143]. По-друге, вплив глітазонів на інсулін-стимульовану утилізацію глюкози може бути зумовлено вторинними змінами у жировій тканині де проходить експресія PPAR $\gamma$ . Окрім того встановлено, що тiazолідиндіони також вибірково стимулюють ліпогенну активність у жирових клітинах, що призводить до інсулінової супресії ліполізу [142].

PPAR $\gamma$  рецептори відграють також важливу роль у інших фізіологічних і патологічних станах, таких як рак, запалення, серцево-судинні захворювання та безпліддя [144]. Зокрема, згідно з літературними літератури, PPAR $\gamma$  рецептори впливають на здатність до регуляції розвитку злоякісних новоутворень, шляхом пригнічення проліферації клітин та клітинного циклу, розвитку апоптозу ракових клітин та індукування міжклітинної адгезії та запалення в мікрооточенні пухлин [145]

Варто відзначити, що не лише протидіабетичні лікарські засоби глітазони мають афінитет до PPAR $\gamma$  рецепторів, а й також інші похідні на основі 4-тiazолідинону. Так, у роботах *Szychowski K. A.* та співавторів було ідентифіковано залучення PPAR $\gamma$  рецепторів у реалізації цитотоксичної та проапоптотичної дії серед похідних тiazолідинону та їх функціоналізованих похідних **1.141-1.145**, що володіють протипухлинною активністю на лінії плоскоклітинної карциноми людини лінії SCC-15 (рис. 1.6) [146, 147].



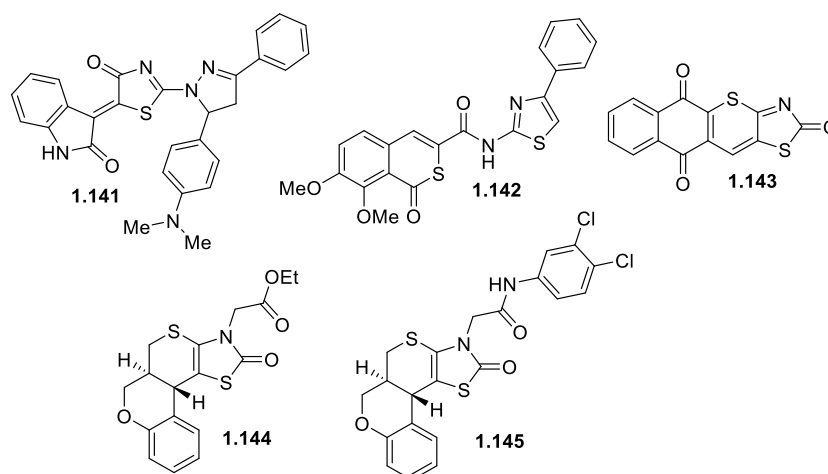


Рис. 1.6. Похідні тiazоліднону/tiazолу та їх конденсовані похідні з протипухлинною активністю як агоністи PPAR $\gamma$  рецепторів.

Цікаво, що серед глітазонів було також ідентифіковано не тільки високу афінність до PPAR $\gamma$  рецепторів, а й принципово інші механізми реалізації гіпоглікемічного ефекту. Так, препарат аземіглітазон – перший у своєму класі інсуліновий сенсibilізатор для перорального застосування, який діє шляхом стимуляції мітохондріальних білків (MPC2) і використовується як засіб у лікуванні цукрового діабету 2 типу та неалкогольного стеатогепатиту [148]. Варто відзначити, що мітохондріальний піруватний носій типу 2 (MPC2) це білок, який відіграє важливу роль у транспортуванні пірувату в мітохондрії через внутрішню мембрану мітохондрій. Ряд клінічних досліджень встановили, що збільшення рівня MPC2 протеїну в мітохондріях суттєво зменшує діабетичне ушкодження ниркових клубочків [149]. Також аземіглітазон запобігає фіброзу печінки та пригнічує експресію маркерів активації зірчастих клітин печінки. На даний момент аземіглітазон перебуває на III фазі клінічних досліджень (рис.1.7).

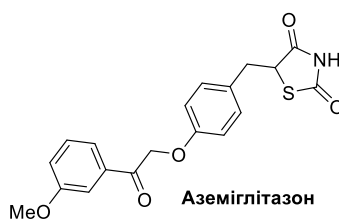


Рис. 1.7. Структура аземіглітазону як активатора мітохондріального піруватного носія типу 2 (MPC2).

Серед протидіабетичних тіазолідинонів було також ідентифіковано похідні, як високоактивні інгібітори альдозоредуктази (АР). Альдозоредуктаза – це НАДФН-залежний фермент, який присутній у більшості органів і тканин та каталізує один із етапів сорбітольного (поліолового) шляху. Діабетичні ускладнення, включаючи нейропатію, нефропатію, катаракту та ретинопатію, значною мірою викликані накопиченням сорбітолу, який виробляється з глюкози АР у поліоловому шляху [150]. Сорбіт не дифундує легко через клітинні мембрани і тому здатний до накопичення викликаючи відповідні осмотичні пошкодження органів і тканин. Інгібітори АР здатні до покращення гемодинаміки та нормалізації рівня сорбіту у тканинах та використовуються як додаткова терапія при лікуванні цукрового діабету [151,152]. Зокрема похідні тіазолідинону та його структурні аналоги лежать в основі ряду інгібіторів АР, зокрема епальрестату, різарестату, лідорестату та зополрестату (рис. 1.8) [153-157].

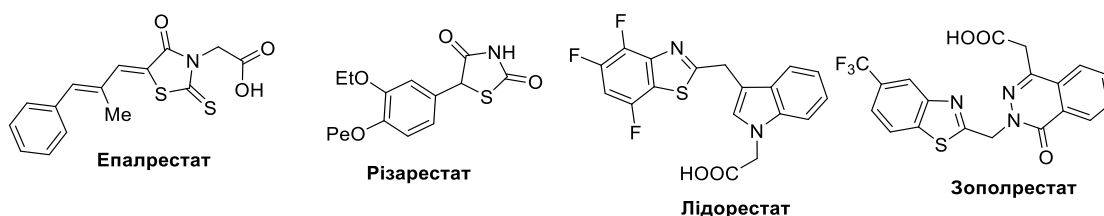


Рис.1.8. Похідні тіазолідинону/тіазолу як інгібітори альдозоредуктази.

Однією із видів біологічної активності, яка доволі добре вивчена для похідних тіазолідинону та їх структурних аналогів є протизапальна [158]. Так, є велика кількість літературних даних присвячених дослідженню дарбуфелону та його похідних. Дарбуфелон є подвійним інгібітором клітинного синтезу простагландинів типу PGF<sub>2</sub>R та LTB<sub>4</sub> лейкотрієнів та здатний до селективного інгібування ізоформи циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) (IC<sub>50</sub> = 0,19 мкМ) та в значно меншій мірі циклооксигенази-1 (ЦОГ-1) (IC<sub>50</sub> = 20 мкМ). При проведенні доклінічних випробувань встановлено відсутність ульцерогенного ефекту при його пероральному введенні на різних тваринних моделях [159,160]. На даний

момент дарбуфелон перебуває на III фазі клінічних досліджень компанії Pfizer та Zhuhai United Laboratories як засіб для лікування ревматоїдного артриту. Варто відзначити, що рівень інгібування дарбуфелону ізоформ ЦОГ-1 та ЦОГ-2 є значно вищим у порівнянні із іншим НПЗП, що вміщує тiazол у структурі – мелоксикамом (ЦОГ-1:  $IC_{50} = 36,6$  мкМ; ЦОГ-2:  $IC_{50} = 4,7$  мкМ) [159]. Цікаво, що володіючи високим рівнем протизапальної активності, дарбуфелон володіє також помітною протипухлинною активністю. Так, у роботі Ye X. та співавторів було встановлено дозозалежне зниження життєздатності клітин недрібноклітинної карциноми легень людини лінії NCI-H460, вплив на її клітинний цикл та індукування апоптозу шляхом активації каспази 3 та 8 на фоні дії дарбуфелону та його структурного аналога **1.146** (PD0167570) [160]. Для функціонального похідного на основі дарбуфелону **1.147** було також встановлено цитопротекторну активність у слизових оболонках тонкої кишки, зниження нітрузоокислювальних процесів та пригнічення активності ряду прозапальних ферментів індуцибельної NO синтази (iNOS) та мієлопероксидази (MPO) [161]. Деякі інші структурні аналоги дарбуфелону **1.148** у ряді досліджень проявили також високу афінність до ЦОГ-2, шляхом її інгібування, або перебувають на початкових етапах доклінічних досліджень проявивши високу активність на карагеніновій моделі запалення [162].

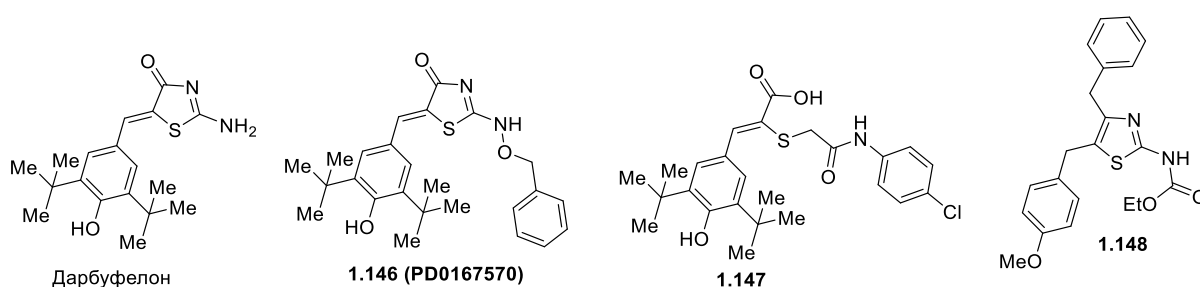


Рис. 1.9. Дарбуфелон та його похідні з протизапальною активністю.

Серед похідних на основі тiazолідинону та його структурних аналогів було ідентифіковано також велику кількість сполук з помітним протипухлинним ефектом [163,164]. Варто відзначити, що більшість публікацій присвячених вивченню даного виду активності для похідних тiazолідинону/тiazолу не містила

детальних досліджень механізмів реалізації протипухлинного ефекту зазначених сполук, а лише показана цитотоксичність на певні лінії клітин раку *in vitro*. Це обумовлено надзвичайною складністю у встановленні потенційної біомішені, оскільки часто у механізмі розвитку пухлин залучені десятки ензиматичних систем, взаємозв'язки між якими часто ще не повністю досліджені. Незважаючи на те, для ряду похідних тiazолідинону/tiazолу були з високою ймовірністю встановлені біомішені. Зокрема, у наведеному вище фрагменті огляду літератури було охарактеризовано деякі сполуки на основі тiazолідинону та його структурних аналогів, які володіли протидіабетичною та протизапальною активністю поєднану із протипухлинною. Окрім того, було ідентифіковане похідне хіноксалін-тiazолідинону **1.149** як високоактивний інгібітор гамма фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) – ферменту, який відіграє ключову роль у регуляції пухлинного росту [165]. Зазначена сполука вибірково інгібує ферментативну активність PI3K гамма, а також опосередковану нею сигнальну систему та хемотаксис *in vitro* та *in vivo*. Сполука **1.149** також проявила помірну активність щодо інших ізоформ PI3K. Структурно споріднене до сполуки **1.149** похідне піридинілхінолін-тiazолідинону **1.150** було ідентифіковане як подвійний інгібітор PI3K/mTOR. Зазначена сполука перебуває на фазі I клінічних випробувань у пацієнтів із солідними пухлинами або лімфомами [166]. Крім того, у нещодавно опублікованих результатах клінічних досліджень було показано, похідне **1.150** на моделях мишей із ксенотрансплантатом володіє цитотоксичною активністю щодо плоскоклітинної карциноми голови та шиї [167].

Велика кількість біологічно активних сполук, спрямованих на регуляцію процесів некроптозу, виявляють значний інтерес у створенні потенційних протипухлинних агентів. Некроптоз є регульованою некротичною формою загибелі клітин у каспазно-незалежний спосіб і в основному опосередковується рецепторно-взаємодіючим білками (RIP1, RIP3) та кіназним доменом змішаної лінії (MLKL). Некроптоз служить альтернативним способом запрограмованої клітинної смерті, долаючи резистентність до апоптозу, і може викликати та

посилювати стійкість до протипухлинної терапії. Експресія ключових регуляторів некроптотичного шляху зазвичай знижена в ракових клітинах, однак у деяких типах раку рівень експресії ключових медіаторів підвищений. Некроптоз також сприяє онкогенезу та процесам метастазування [168]. Так, у роботі *Zheng W.* та співавторів було ідентифіковано високоактивні інгібітори некроптозу з групи тiazолідинон-тіазол-піразольних гібридних молекул **1.151** [169]. (Рис. 1.10).

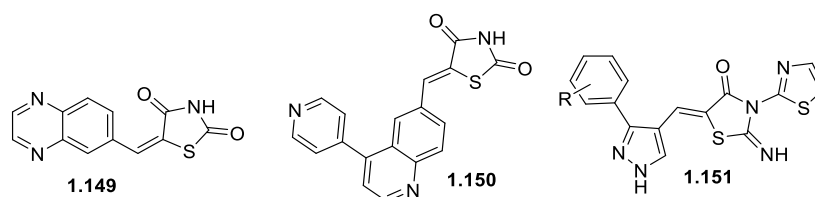


Рис. 1.10. Похідні 5-гетериліден-4-тіазолідинону з фрагментами азотовмісних гетероциклів з протипухлинною активністю.

У ряді похідних 2-ариліміно-5-іліден-4-тіазолідинону було ідентифіковано сполуку **1.152** (рис. 1.11), як високоактивного інгібітора інтегрину  $\alpha_v\beta_3$ , що було повідомлено у роботі *Dayam R.* та співавторів [170]. Зокрема, концентрація напівмаксимального інгібування ( $IC_{50}$ ) інтегрину  $\alpha_v\beta_3$  сполукою **1.152** становила 0,03 мкМ. Варто відзначити, що інтегрини є основною родиною рецепторів адгезії на поверхні клітини, які експресуються у всіх багатоклітинних. Інтегрин  $\alpha_v\beta_3$  є потенційною біомішенню для біологічно активних сполук, оскільки його аномальна експресія пов'язана з розвитком і прогресуванням різних патологічних станів, включно з ангіогенезом у злоякісних пухлинах [171].

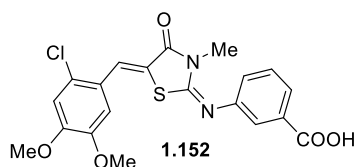


Рис. 1.11 Похідне 2-ариліміно-5-іліден-4-тіазолідинону як інгібітор інтегрину  $\alpha_v\beta_3$ .

Серед похідних на основі 2-тіоксо-4-тіазолідинону (роданіну) було ідентифіковано також ряд високоактивних сполук з протипухлинною дією для деяких з них було детально встановлено механізми біологічної активності (рис. 1.12). Так, похідне 5-іліден-3-фенілроданіну з фрагментом циннамового альдегіду у структурі **1.153** має здатність до стабілізації зв'язування інтегрину альфа(М)бета(2) з його ендogenousними лігандами proMMP-9 і фібриногеном. Сполука **1.153** пригнічує альфа(М)бета(2)-залежну *in vitro* клітинну міграцію та спричинену запаленням міграцію нейтрофілів *in vivo* [172]. Окрім того, похідне **1.153** пригнічувало ріст ксенотрансплантатів лейкемії та лімфоми у досліджуваних мишей та значно продовжувало їх виживаність. Для сполуки **1.153** проводяться поглиблені досліджень на активність щодо різних типів лейкемій, особливо лімфом [173].

Похідне роданінбензімідазолу **1.154** було ідентифіковане як селективний інгібітор Pim-1, 2, 3 кіназ зі значеннями IC<sub>50</sub> 16, 13 і 6.4 нМ, відповідно. Окрім того сполука **1.154** пригнічувала проліферацію ліній клітин солідних типів раку та раку крові у субмікромольних концентраціях. В досліджуваних клітинних лініях сполука **1.154** інгібувала фосфорилування Pim сигнальних субстратів, порушувала клітинний цикл та індукувала апоптоз [174]. У роботі *Vatolin S.* та співавторів було ідентифіковано похідне 5-іліден-3-фенілроданіну **1.155** як інгібітора протеїн дисульфід-ізомераз (PDI) [175]. Встановлено, що клітини множинної мієломи продукують велику кількість протеїнів з дисульфідними зв'язками набагато більшу ніж інші клітини. Інгібування протеїн дисульфід-ізомераз, є ключовим у згортанні білків ендоплазматичного ретикулуму (ER) зумовлюючи виникненню стресу ER, що в подальшому призводить до загибелі даного типу пухлинних клітин [176]. Для сполуки **1.155** було встановлено зв'язування з ізоферментами PDI A1, A3 і A4 в клітинах множинної мієломи. Дослідження *in vitro* інгібувальної активності PDI-редуктази показало приблизно в 100 разів сильніше інгібування даного ензиму, ніж відомі інгібітори PACMA 31 і LOC14 [174]. *Huang M. J.* та співавторами було ідентифіковане похідне роданіну **1.156** як інгібітора c-Myc [177]. Протоонкоген c-Myc відіграє важливу

роль у контролі клітинної проліферації, апоптозу та диференціації, і його аберантна експресія часто спостерігається в багатьох пухлинах людини, включаючи гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ). Оскільки c-Myc гетеродимеризується з Max-взаємодіючим білком зумовлюючи трансактивацію низхідних цільових генів у лейкемогенезі [178-180]. Як інгібітор взаємодії між доменом  $\text{VH}_3$  і Bcl-x1 було ідентифіковане похідне роданін-карбонової кислоти **1.157** [181]. Встановлено, що опосередковані  $\text{VH}_3$ -доменом гомодимеризації та гетеродимеризації відіграють ключову роль у регуляції апоптотичних функцій білків сімейства Bcl. Відповідно, ідентифікація сполук, які здатні до інгібування даної взаємодії дозволяють індукувати процеси апоптозу, що є ключовим у розробці нових протипухлинних агентів [182-185]. Серед похідних на основі роданіну було також ідентифіковано сполуку **1.158** як високоактивного інгібітора JNK-стимулюючої фосфатази-1 [186]. JSP-1 фосфатаза належить до класу атипових подвійноспецифічних фосфатаз (DSPs), які регулюють різні клітинні процеси, включаючи ріст, проліферацію, диференціацію, метаболізм, імунну відповідь, клітинно-клітинна адгезію та клітинно-матричні контакти. У пошуку потенційних протипухлинних агентів JSP-1 фосфатаза є цікавою мішенню, особливо у випадку фармакотерапії пухлин, розвиток яких, асоційований з дисфункцією  $\text{Jnk}_1$  сигнальної системи [187,188]. У роботі Carter P. H. та співавторів було повідомлено про похідне роданіну **1.159** як високоактивного інгібітора фактору некрозу пухлини альфа  $\text{TNF-}\alpha$  [189].  $\text{TNF-}\alpha$  є плеїотропним цитокіном, який виробляється переважно активованими макрофагами і лімфоцитами і відіграє центральну роль у запаленні та гомеостазі імунної системи [190-192].  $\text{TNF-}\alpha$  бере участь у ряді патологічних процесів, зокрема при хронічному запаленні, автоімунних захворюваннях та онкологічній патології [193-198].

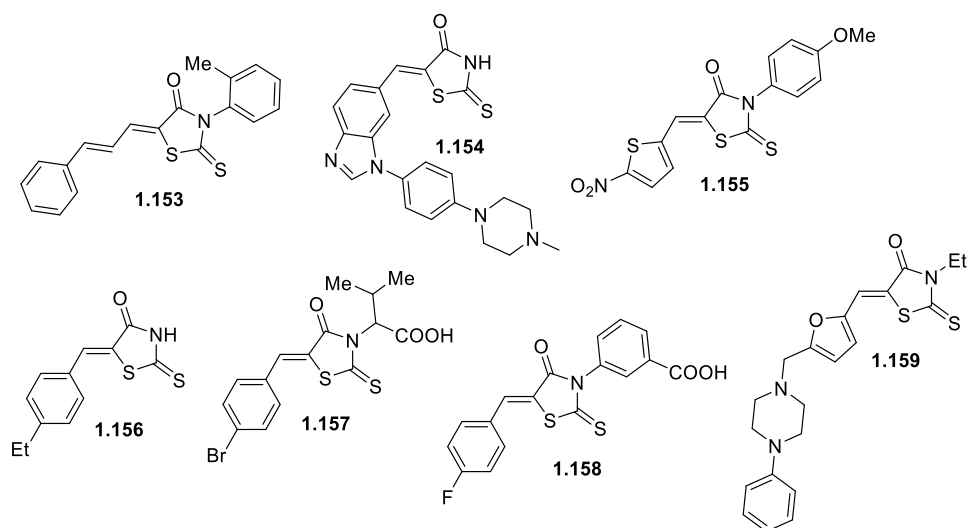


Рис.1.12 Похідні роданіну з протипухлинною активністю.

Серед похідних тiazолу було також ідентифіковано ряд високоактивних протипухлинних агентів з встановленим механізмом дії (рис. 1.13). Так, у роботі *Anh, D. T.* та співавторів було ідентифіковано 2-(4-хлорбензамідо)-*N*-гiдрокситiazол-4-карбоксамiд **1.170** як високоефективний iнгiбiтор гiстон деацетилази (HDAC) [199].  $IC_{50}$  сполуки **1.170** становило 0,033 мкМ, що було співмірним із значенням типового iнгiбiтора даного ферменту *N*-гiдрокси-*N'*-фенiл-октандiамiдju (ворiностату) ( $IC_{50} = 0,025$  мкМ). Вiдомо, що надмiрна експресiя рiзних класiв HDAC активно сприяє пролiферацiї клiтин i блокуванню процесiв апоптозу, одночасно запобiгаючи клiтиннiй диференцiацiї, таким чином викликаючи безперервний рiст клiтин. Окрiм того, активнiсть HDAC, сприяє процесам ангиогенезу та клiтинної мiграцiї, двом процесам, важливим у метастазуваннi пухлинних клiтин [200]. *Ge L.* та співавторами було синтезовано ряд похідних тiazолу серед яких була ідентифікована сполука **1.171**, що володіла найвищою iнгiбувальною активнiстю щодо матричних металопротеiназ (MMP) типу 2 та 8 [201]. Данi ферменти належать до групи мультигенних цинкзалежних ендопептидаз, що ремоделюють позаклiтинний матрикс з подальшим залученням до рiзних патологiчних процесiв, таких як запалення та канцерогенез. Пiдвищення активностi даних ензимiв вiдiграє ключову роль у пухлинному рiстi, процесах iнвазiї та метастазування, включаючи



протеолітичну деградацію позаклітинного матриксу, порушення взаємодій клітина-клітина та клітина-позаклітинний матрикс, міграції та ангіогенезу [202,203]. У роботі *Hu C. M.* та співавторів було повідомлено про похідні тіазолу **1.172**, які мають здатність порушувати взаємодію *Nes1/Nek2* – критичних мітотичних регуляторів, які забезпечують належну сегрегацію хромосом, надмірна експресія яких часто спостерігається при онкології з низькими показниками виживаності [204].

*Wilson K.* та співавтори синтезували серію тіофен-2-карбоксамідів з фрагментом 2-амінотіазолу у структурі **1.173** та вивчали їх здатність до зв'язування з урокіназою (uPa) ключовим ферментом у патогенезі раку, надмірна експресія якого призводить до метастазування. Авторами було ідентифіковано ряд сполук з даного класу, які в субмікромольному діапазоні концентрацій проявляли інгібувальну активність щодо даного ферменту [205].

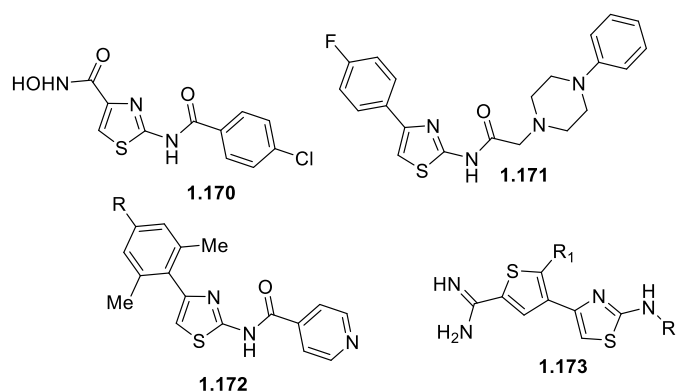


Рис. 1.13. Похідні тіазолу з протипухлинною активністю.

У ряді робіт для деяких конденсованих похідних тіазолу було також встановлено помітну протипухлинну активність та ідентифіковано молекулярні біомішені для даних сполук (рис. 1.14). Зокрема, *Shen X.* та співавтори синтезували похідне тритерпеноїда ородоніну з фрагментом тіазолу у структурі **1.174**, яке проявило високу інгібувальну активність щодо білка трансдуктора сигналу та активатора транскрипції типу 3 (STAT3), як одного із основних маркерів онкогенезу [206]. *Ali A. A.* та співавторами було синтезовано похідні парациклофаніл-тіазол-нафтохінону, серед яких було ідентифіковано сполуку

**1.175**, що проявляла високу протипухлинну активність щодо клітин меланоми лінії SK-MEL-5, а також високу інгібувальну активність щодо деяких ізоформ циклін-залежної кінази (CDK) [207]. У роботі Xie X. X. було здійснено синтез похідних бензотіазолу серед яких вдалося ідентифікувати високоактивну сполуку **1.176**, яка проявляла антипроліферативну активність щодо лінії клітин карциноми товстої кишки HCT-116, аденокарциноми молочної залози MCF-7, гліоми U87 MG та епітеліальної легеневої карциноми лінії A549. Окрім того, сполука **1.175** виявила високу інгібувальну активність щодо внутрішньоклітинного сигнального шляху PI3K/mTOR [208]. Luke R. W. A. та співавторами було повідомлено про синтез похідних тіазолопіримідину з фрагментом піразолу з подальшою ідентифікацією високоактивної сполуки **1.176**, що володіла високою інгібувальною активністю рецептора тирозин кінази Tie 2 [209]. Варто відзначити, що при онкологічній патології спостерігається надмірна експресія рецептора Tie2 в судинах пухлин. Окрім того виявлено, що Tie2 також експресується поза судинною системою у ряді типів раку, включаючи лейкемію, рак шлунка, молочної залози та гліому [210]. Серед похідних тіазоло[3,2-*a*]піримідину було ідентифіковано високоактивну сполуку **1.176**, яка проявляє високі показники зв'язування з ДНК, що перевищує доксорубіцин як контроль, як було повідомлено у роботі Al-Rashood S.T. та співавторів [58].

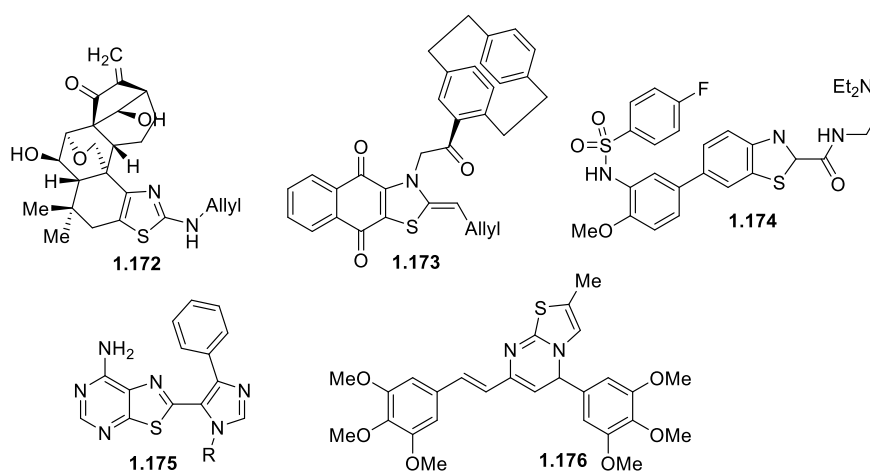


Рис. 1.14. Конденсовані похідні тіазолу з протипухлинною активністю.

Однією із ключових і добре вивчених видів біологічної активності похідних тiazолідинону/tiazолу та їх структурних аналогів є протибактеріальна та протигрибкова дія [211-214]. На рівні із рядом протимікробних лікарських засобів охарактеризованих на перших сторінках даного розділу є ідентифікована велика кількість сполук, які мають високу біологічну активність та встановлені біомішені, через які реалізується дана фармакологічна дія. Зокрема серед похідних на основі 5-бензиліден-2-тіоксотіазолідин-4-ону **1.177** було ідентифіковано високоактивні інгібітори UDP N-ацетилмурамат/L-аланін-лігази, ензиму, який відповідає за синтез компонентів клітинної стінки бактерій. Варто відзначити, що дані сполуки проявляли також високу активність проти грам-позитивного метацилінрезистентного *Staphylococcus aureus* MRSA, проте слабку дію щодо грамнегативної палички *Escherichia coli* [215]. У статті Grant E. B. та співавторів було повідомлено про 5-(2-оксоіндолін-3-іліден)-2-тіоксотіазолідин-4-он **1.178** як сполуку, яка володіє високою інгібувальною активністю проти  $\beta$ -лактамази класу C [216]. Серед похідних на основі роданіну, було також ідентифіковано похідне **1.179** з високими показниками інгібування метало- $\beta$ -лактамази, що було повідомлено Brem J. та співавторами [217].

У роботі Suree N. та співавторів було ідентифіковано похідне 5-ариліден-3-феніл-роданіну **1.180**, яке проявило високу інгібувальну активність проти сортази A [218]. Фактор вірулентності, сортаза A (SrtA), відіграє вирішальну роль у патогенезі грам-позитивних бактерій. SrtA – це мембранний фермент бактеріальної клітини, який закріплює важливі фактори вірулентності на поверхні клітинної стінки грам-позитивних бактерій [219].

Новий клас інгібіторів пептиддеформілази (PDF), що базуються на основі 5-іліден-2-тіоксо-4-тіазолідинону із бічним ланцюгом гексанової кислоти у положенні 3 базового ядра (сполука **1.180**), було ідентифіковано двома паралельними підходами, а саме високопродуктивним та віртуальним скринінгом лігандів, що було вперше повідомлено Howard, M. H. та співавторами (рис. 1.15) [220].

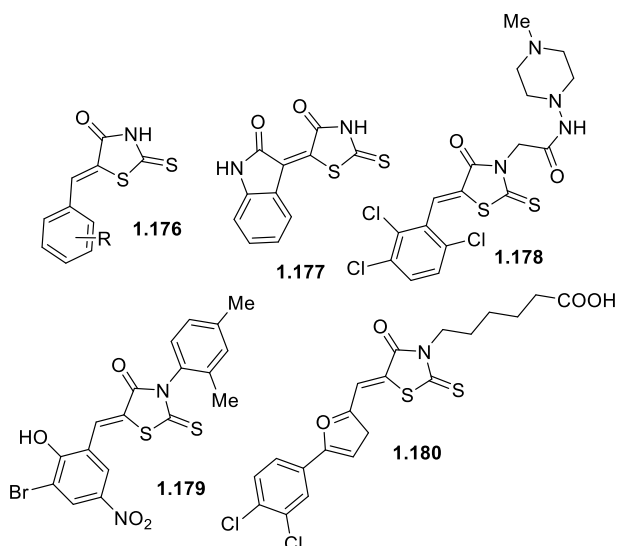


Рис. 1.15. Похідні на основі тiazолідинону з протимікробною активністю.

Серед тiazоло-хінолінових гібридних молекул **1.181** ідентифіковано ряд високоактивних протимікробних агентів щодо *S. aureus* та *E. Coli*, які володіли здатністю до інгубування дегідрофолат редуктази (DHFR) [221]. Також серед похідних тiazолу з фрагментом індолін-2-ону було ідентифіковано також високоактивні інгібітори DHFR, зокрема сполука **1.182**, яка окрім того проявляла виражений ефект проти антибіотикорезистентної *P. aeruginosa* [222]. Варто відзначити, що DHFR є ключовий фермент у регуляції стільникових пулів тетрагідрофолієвої кислоти та її похідних. Окрім того даний ензим забезпечує процеси метилювання деоксиуридинмонофосфату до деокситимідинмонофосфату, які забезпечують подальший клітинний ріст та проліферацію бактеріальних клітин [223].

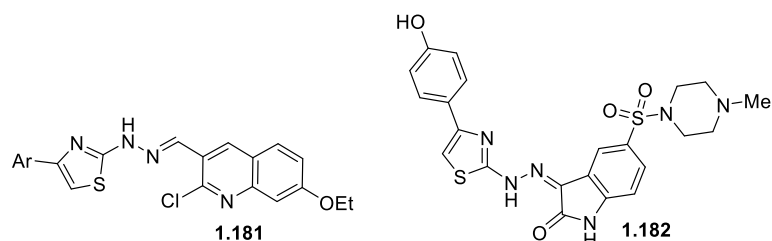


Рис.1.16. Похідні тiazолу з протимікробною активністю.

Конденсовані похідні тiazолу проявляють також помітну протимікробну активність (рис. 1.17). Так, серед похідних тiazоло[4,5-*b*]хіноксаліну було ідентифіковано похідне **1.183**, яке володіло здатністю інгібувати ДНК-гіразу *S. aureus*. [224] Серед похідних тiazоло[3,2-*a*]піримідину ідентифіковано похідне **1.184**, що володіє високими інгібувальними властивостями циклодифосфат синтази (IspF) збудників *Mycobacterium tuberculosis* та *Plasmodium falciparum* [225]. Варто відзначити, що фермент IspF є ключовим у регуляції немевалонатного шляху біосинтезу ізопреноїдів, що є клінічно підтвердженою біомішенню для лікування малярії [226]. Окрім того, метаболічний шлях є також важливий у рості багатьох патогенних бактерій, включно з *Mycobacterium tuberculosis* [227].

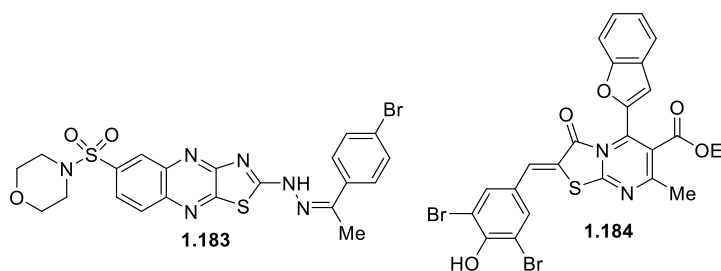


Рис. 1.17. Конденсовані похідні тiazолу з протимікробною активністю.

Враховуючи вищесказане похідні на основі тiazолу/тiazолідинону та їх структурні аналоги мають значний синтетичний та фармакологічний потенціал для досліджень з метою пошуку серед них потенційних «лікоподібних» молекул як основи для створення нових лікарських засобів.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [161]*

## РОЗДІЛ 2

## ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРІАЛІВ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1. Фізико-хімічні методи дослідження

Спектри  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР знімались на спектрометрі Varian Mercury 400 (Varian Inc., США) (400 MHz), розчинники: DMSO- $d_6$ , хлороформ, внутрішній стандарт – тетраметилсилан. Хромато-мас-спектри отримані на Finnigan MAT INCOS-50 (Thermo Finnigan LLC, США) із застосуванням методом іонізації розпиленням в електричному полі (ESI). Елементний аналіз (C, H, N) проводився на аналізаторі Thermo Scientific FlashSmart Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) та становив в межах  $\pm 0,4\%$  від теоретично розрахованих величин. Перебіг реакції та чистоту синтезованих сполук перевіряли методом тонкошарової хроматографії на алюмінієвих пластинках Merck Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck KGaA, Німеччина). Температури топлення речовин вимірювали відкритим капілярним методом на приладі Cole-Parmer IA9200 (Antylia Scientific Ltd., Великобританія) та не були кориговані. ІЧ-спектри реєстрували за допомогою спектрофотометра FT/IR-410 (Jasco Corp., Японія) з використанням гранул броміду калію (частоти виражені в  $\text{cm}^{-1}$ ).

*Встановлення будови синтезованих сполук рентгеноструктурним аналізом.* Кристалографічні дослідження для сполук **3.25**, **4.1**, **4.2**, **5.4**, **5.20** були проведені на автоматичному дифрактометрі Rigaku SuperNova Dual (Rigaku Technologies, Inc., США). Дані були скориговані з врахуванням ефектів Лоренца, поляризації та абсорбції. Структури були розшифровані за допомогою подвійно-просторового алгоритму з використанням комплексу програм SHELXT [228] та уточнені на основі  $F^2$  для всіх даних (SHELXL) [229]. Молекулярні ілюстрації досліджуваних сполук були створені за допомогою програмного пакету ORTEP-3 для Windows [230]. Іншим програмним забезпеченням для обробки результатів рентгеноструктурного аналізу були WINGX [230], OLEX2 [231] та PLATON

[232]. Дані кристалографічного аналізу сполук були розміщені у Кембріджському центрі кристалографічних даних (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC): номери CCDC 1889263 (3.25), CCDC 2172812 (4.1), CCDC 2177599 (4.2), CCDC 2235052 (5.4), CCDC 2210721 (5.20).

## 2.2. Дослідження біологічної активності

*Дослідження in vitro протипухлинної активності сполук в рамках програми Developmental Therapeutics Program (DTP) Національного інституту раку (Бетесда, Меріленд, США). Первинний in vitro скринінг протипухлинної активності проводили в одній концентрації ( $10^{-5}$  М) на панелі близько 60 ліній пухлинних клітин, що представлені дев'ятьма типами раку відповідно до протоколу Drug Evaluation Branch Національного інституту раку [233-236]. Сполуки були додані до відповідних клітинних ліній в одній концентрації ( $10^{-5}$  М) та інкубовані протягом 48 годин. Тест із сульфородаміном Б (SRB-тест) був використаний для визначення життєздатності клітин за інтенсивністю синтезу білка. Результати активності досліджуваних сполук представлені у відсотках росту клітин (Growth percent, GP%), порівняно з ростом у контролі (клітин без додавання сполук).*

Дослідження протипухлинної активності у градієнті концентрацій проводилося для оцінки цитотоксичності та/або інгібувального ефекту найбільш активних сполук, які були відібрані після проведення первинного скринінгу та в подальшому досліджені на повній панелі ліній пухлинних клітин в діапазоні концентрацій від  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  М. Протокол включає 48-годинне інкубування клітин з досліджуваними сполуками та подальшу оцінку життєздатності або росту клітин використовуючи SRB-тест. Використовуючи вимірювання величини абсорбції [нульовий час ( $T_z$ ), контрольний ріст за відсутності сполуки (С) і ріст у присутності досліджуваної сполуки ( $T_i$ )], було розраховано відсоток пригнічення росту клітин для кожної концентрації досліджуваної сполуки. Відсоток пригнічення росту розраховували за формулами:

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$  для концентрацій, для яких  $Ti \geq Tz$

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$  для концентрацій, для яких  $Ti < Tz$

Були розраховані три дозозалежні параметри ( $GI_{50}$ , TGI,  $LC_{50}$ ) для кожної досліджуваної сполуки. Інгібування росту на 50% ( $GI_{50}$ ) – концентрацію сполуки, яка спричиняє зниження на 50% рівня нативного білка в оброблених клітинах (вимірюного за допомогою SRB-тесту) порівняно з збільшенням рівня нативного білка в контрольних клітинах, розраховували за формулою  $[(Ti - Tz)/(C - Tz)] \times 100 = 50$ . Концентрацію сполуки, що призводить до тотального пригнічення росту (TGI), розраховували за формулою  $Ti = Tz$ .  $LC_{50}$  – концентрація сполуки, що призводить до 50% зниження вимірюного білка наприкінці інкубування порівняно з початком, що вказує на чисте зменшення кількості клітин після досліджу, розраховували за формулою  $[(Ti - Tz)/Tz] \times 100 = -50$ . Значення розраховане для кожного з цих параметрів, якщо рівень активності був досягнутий; або, якщо ефект не досягався або був надмірним, значення для цих параметрів було виражено як більше або менше, ніж максимальна або мінімальна досліджувана концентрація. Найнижчі значення були отримані з найбільш чутливими клітинними лініями. Сполуки, що мають значення  $GI_{50} \leq 100$  мкМ, вважались активними.

*Культури клітин.* Клітинні лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини, HCT-116 аденокарциноми товстої кишки людини, KB3-1 аденокарциноми шийки матки людини, Jurkat T-лімфобластної лейкемії людини, K562 хронічного мієлолейкозу людини, HL-60 гострого промієлоцитарний лейкозу людини, L-1210 гострої мишачої лейкемії, HaCaT людських кератиноцитів, J774.2 мишачих макрофагів, NIH/3T ембріональних фібробластів миші та HEK293 ембріональних клітинах нирки людини були отримані з колекції клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.С. Кавецького НАН України. Лінії клітин C6 гліоми щурів та U373 гліобластоми людини були отримані з колекції Інституту молекулярної біології та генетики



Національної академії наук України. Лінія клітин аденокарциноми товстої кишки людини HCT-116 p53<sup>-/-</sup> була надана з колекції Інституту дослідження раку Віденського медичного університету (Австрія), Т - лейкемія людини лінії CCRF-CEM – Інститутом молекулярної та трансляційної медицини (Чехія), лінії клітин гепатоцелюлярної карциноми людини HepG2 та фібробластів миші Balb/c 3T3 клон A31 – Національним науково-дослідним інститутом ветеринарії (Польща). Клітини культивували в повноцінному середовищі DMEM або RPMI-1640 доповненому 10% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція) відповідно до рекомендацій Американської колекції типових культур (ATCC) в інкубаторі при 95% вологості та 5% атмосфері CO<sub>2</sub>. Середовище оновлювали кожні 2 або 3 дні, субстратзалежні клітини трипсинізували за допомогою трипсину/етилендіамінтетраацетату (EDTA) (0.1% трипсину та 0.02% EDTA) після досягнення 70-80% конфлюенту.

Протоколи дослідження лімфоцитів людини, виділених із периферичної крові дорослих здорових донорів та хворих на гостру та хронічну лейкемію, затверджені Етичним комітетом Інституту біології клітини НАН України (протоколи № 2 від 27 січня 2019 р. та № 2 від 7 жовтня 2020 року) та письмовою згодою донора. Лімфоцити периферичної крові людини виділяли з крові донора, яка була відібрана у пробірку із антикоагулянтом (гепарину натрій 10 ОД/мл (B.BRAUN MEDICAL, S.A., Іспанія)) використовуючи розділення за градієнтом концентрації у Gradisol G (Polfa, Польща). Суміш крові з Gradisol G (1:1) центрифугували при 400×g при кімнатній температурі протягом 30 хв. Клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS). Залишки еритроцитів лізували в гіпотонічному розчині. Лімфоцити культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 20% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція) при 95% вологості та 5% атмосфері CO<sub>2</sub> [237].

Досліджувані речовини розчиняли в чистому диметилсульфоксиді (ДМСО). Альбендазол (Sigma, Польща) та доксорубіцин були використані як позитивний контроль. Кожну концентрацію сполук перевіряли в тричі у тьох

повторах. Час впливу на клітини досліджуваних сполук становив від 24 до 72 год.

*Тест з використанням реагенту МТТ для визначення життєздатності клітин.* Чутливість пухлинних, нормальних і псевдо-нормальних клітин до нових гетероциклічних похідних оцінювали за методикою описаною раніше [238], використовуючи МТТ тест (3-[4,5-диметилгіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолію бромід) (Sigma-Aldrich, США). Даний тест базується на відновленні тетразолієвого барвника до нерозчинного формазану, який має пурпурове забарвлення, мітохондріальною сукцинатдегідрогеназою [239,240]. 3500-4000 субстратних або 15000 суспензійних клітин на лунку висівали в 96-лункові планшети відповідно до рекомендацій АТСС у 100 мкл середовища DMEM або RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) та інкубували протягом 24-72 годин при 37 °C в CO<sub>2</sub>-інкубаторі з досліджуваними сполуками. Після періоду інкубації дослідне середовище зливали, реагент МТТ додавали до клітин відповідно до рекомендацій виробника (кінцева концентрація 5мг/мл) та інкубували протягом наступних 4 годин. Кристали формазану розчиняли за допомогою диметилсульфоксиду (ДМСО), абсорбцію вимірювали за допомогою приладу Absorbance Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США). Значення напівмаксимальної інгібуючої концентрації (IC<sub>50</sub>) розраховували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 6 (Сан-Дієго, Каліфорнія, США) використовуючи для обчислення нелінійну регресію. P <0,05 вважали статистично значущим.

*Визначення життєздатності клітин шляхом оцінки поглинання нейтрального червоного (NRU).* Даний тест проводився відповідно до протоколу з незначними модифікаціями, як було описано раніше [241,242]. Після періоду інкубації середовище із досліджуваними сполуками видаляли з усіх лунок, клітини промивали розчином PBS. Після чого додавали 100 мкл/лунку нейтрального червоного у концентрації 50 мкг/мл. Середовище інкубували

протягом 3 годин і знову промивали розчином PBS. Барвник з життєздатних клітин екстрагували сумішшю оцтової кислоти, етанолу та води. Після 10 хвилин легкого перемішування абсорбцію вимірювали за допомогою приладу Absorbance Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) при 550 нм, використовуючи пробу без сполуки як еталон.

*Визначення загального вмісту білка (Total protein content (TPC) аналіз).* Загальний вміст білка оцінювали за методом Бредфорда з незначними модифікаціями [242,243]. Після періоду інкубації середовище з досліджуваними сполуками видаляли усіх планшетів і в кожному лунку додавали по 100 мкл барвника Кумассі (діамантовий синій R-250). Розчин у планшетах перемішували протягом 10 хв. Після цього барвник видаляли і клітини промивали 100 мкл суміші оцтової кислоти, етанолу та води. Промивний розчин видаляли і додавали 100 мкл десорбуючого розчину (1М ацетат калію), планшети обережно перемішували протягом 10 хв. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 595 нм за допомогою приладу Absorbance Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США), використовуючи порожню пробу без сполуки як еталон.

Середню оптичну густину використовували для розрахунку відсотку виживання клітин для кожної концентрації досліджуваної сполуки. Значення концентрацій IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> та IC<sub>80</sub>, необхідні для 20, 50 і 80% інгібування життєздатності клітин кожною сполукою, розраховували згідно з рівнянням Хілла використовуючи програму Graph Pad Prism v. 6.0.

*Клоногенний тест для оцінки ефективності інгібування росту клітин досліджуваними сполуками.* У кожному лунку 6-лункового планшета висівали по 700 субстратних клітин у 1,5 мл середовища для росту та залишали для прикріплення протягом 24 годин в інкубаторі. Наступного дня додавали досліджувані сполуки у відповідних концентраціях. Через 3 дні дослідне середовище змінювали і залишали клітини на 7 днів у інкубаторів. Після цього

клітини фіксували метанолом протягом 20 хвилин при 4°C і фарбували кристалічним фіолетовим (0,01% у PBS). Поглинання кристалічного фіолетового вимірювали за допомогою рідера BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США). Кількісне визначення проводилося за допомогою програмного забезпечення ImageJ (США). Отримані дані представлені у вигляді дозозалежної кривої частки живих клітин за допомогою програмного пакету Graph Pad Prism 6 (Graph Pad, США) [244].

*Дослідження взаємодії сполук із ДНК методом конкурентного витіснення метилового зеленого.* Сполуки були оцінені на здатність до взаємодії із ДНК за допомогою методу конкурентного витіснення метилового зеленого. ДНК сперми лосося (50 мкг/мл) інкубували протягом 1 години при 37°C з 15 мкл розчину метилового зеленого (1 мг/мл у H<sub>2</sub>O). Досліджувані сполуки додавали в концентрації 10 мкМ/мл та інкубували при 37°C у темному приміщенні протягом 24 годин. Загальний об'єм зразків становив 1 мл. Поглинання метилового зеленого вимірювали при довжині хвилі 630 нм за допомогою рідера Plate Reader BioTek (США). Як позитивний контроль використовували доксорубіцин [245].

*Спектроскопічний аналіз для вивчення здатності сполук взаємодіяти з ДНК.* ДНК сперми лосося (1,65 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) розчиняли у воді Milli-Q при 4°C протягом 24 годин. Чистоту розчину ДНК перевіряли шляхом вимірювання коефіцієнта поглинання A260/A280 спектрофотометром NanoDrop N-1000 UV/VIS (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Досліджувані сполуки розчиняли в ацетоні (стоковий розчин концентрацією 5 мМ/мл). Етап денатурації ДНК з подальшим повторним відпалом у присутності сполук був включений. Після інкубації ДНК з сполуками додавали KMnO<sub>4</sub> до кінцевої концентрації 0,3 мМ і вимірювали поглинання при 420 нм (BioTek ELx800, BioTek Instruments, Inc., США) у різні періоди часу до 3 годин. Результати представлені як зміна

поглинання (NetAbs, нет А420) під час реакції з  $\text{KMnO}_4$  між нульовим часом і вибраними точками часу (1, 2, 3 год) і розраховувалися за формулою:

$$\text{Net A420 нм} = [\text{A420 нм Expt (120 хв)} - \text{A420 нм Expt (2 хв)}] - [\text{A420 нм контролю (120 хв)} - \text{A420 нм контролю (2 хв)}],$$

де величина Net A420 це рівень окислення ДНК хімічним агентом. A420 Expt = ДНК+досліджувана сполука + $\text{KMnO}_4$ . A420 Контроль: ДНК+ $\text{KMnO}_4$ .

У дослідження були включені відповідні контролю: окремо ДНК та сполуки, значення їх абсорбції віднімали від досліджуваного зразка, щоб отримати чисту зміну абсорбції. ДНК-зв'язувальні сполуки, як правило, входили до групи, де чиста зміна поглинання між нулем і різними моментами часу становила  $>0,05$  або  $<-0,05$ . Сполуки, що не зв'язуються з ДНК, були визначені як такі, де чиста зміна поглинання між нулем і різними точками часу була в діапазоні від 0,05 до -0,05 [246].

Також для дослідження механізму взаємодії сполук із ДНК використовували УФ-спектроскопію. Дослідження проводили в фосфатному буфері використовуючи фіксовану концентрації сполуки (250 мкМ), яку титрували розчином ДНК. Розчини інкубувати протягом 5 хв до реєстрації спектрів оптичного поглинання [247]. Спектри поглинання вимірювали за допомогою спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Вілмінгтон, США).

*Метод ДНК драбинки для оцінки фрагментації ДНК.* Процес екстракції ДНК і її електрофорез у гелі проводили за методикою описаною раніше [248]. Клітини лінії осаджували центрифугуванням та лізували у буферному розчині (1% NP-40 у 20 мМ ЕДТА, 50 мМ Трис-НСІ, рН 7.5; 10 мкл на  $10^6$  клітин, мінімальний об'єм 50 мкл). Після центрифугування протягом 5 хвилин при  $1600 \times g$  супернатант відбирали, а екстракцію повторювали ще раз додаючи до осаду таку ж кількість буферу для лізису. До супернатанту вносили SDS до кінцевої концентрації 1% і обробляли протягом 2 годин РНКазою А (кінцева концентрація 5 мкг/мл) при температурі  $56^\circ\text{C}$ . Після цього додавали протеїназу

К (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) та інкубували протягом 2 годин при температурі 37 °С. Після інкубації додавали 1/2 об'єму 10М ацетату амонію та осаджували ДНК 2.5 об'ємами етанолу. Виділену ДНК розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі (при 70 В), що містив етидій бромід [248].

*Дослідження морфологічних змін у клітинах за допомогою флуоресцентної мікроскопії.* Клітини висівали на культуральні скельця поміщені в 24-лункові планшети у концентрації 50 000 клітин/мл та залишали на 24 години для прикріплення. Після цього клітини протягом 24 годин інкубували із досліджуваними сполуками. Клітини фарбували ДНК специфічним барвником Hoechst-33342 (0,2-0,5 мкг/мл), згідно методики описаної раніше [249]. Для мікроскопічних досліджень клітин використовувались флуоресцентний мікроскоп (Carl Zeiss, Єна, Німеччина), камера AxioImager A1 (зі збільшенням 400×) і програмне забезпечення для аналізу зображень AxioVision Release 4.6.3.0 для мікроскопії Carl Zeiss (Imaging Associates Ltd., Корк, Ірландія, Великобританія). Для додаткового аналізу отриманих мікрофотографій використовували програмне забезпечення ImagePro7 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, США).

*Виявлення змін у проходженні клітинного циклу при дії досліджуваних сполук.* Методика аналізу та мічення маркерів проходження клітинного циклу була повідомлена раніше [250, 251]. Зокрема, клітини інкубували з досліджуваними сполуками протягом 24 годин, після цього їх відбирали, промивали холодним розчином PBS, фіксували в холодному 70% етанолі, обробляли РНКазою А (0,5 мг/мл) та фарбували пропідій йодидом (PI) (0,1 мг/мл). Мітотичний маркер гістону H3Ser10 був виявлений за допомогою зв'язування з специфічними антитілами анти-фосфогістону H3 (Ser10) (Merck Millipore, США). Первинні антитіла були розчинені в блокуючому буфері та помічені вторинними FITC-кон'югованими антитілами миші (Sigma-Aldrich, США). Дані аналізу клітинного циклу були отримані за допомогою приладу

FACSCalibur (Becton Dickinson, США) і проаналізовані за допомогою програмного пакету ModFitLT (Verity, США). Апоптоз було виміряно в логарифмічному режимі як відсоток частинок із вмістом PI нижчим, ніж у клітинах у фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (суб-G<sub>1</sub>) клітинного циклу, а поліплоїдію вимірювали в лінійному режимі як відсоток частинок із вмістом PI вищим, ніж у клітинах у фазі G<sub>2</sub>/M клітинного циклу [250].

*Оцінка синтезу ДНК за допомогою аналізу інкорпорації BrdU.* Клітини інкубували з дослідними сполуками протягом 24 годин. Перед відбором до них додавали 10 мкМ 5-бром-2-дезоксидуридину (BrdU) для імпульсного мічення протягом 30 хвилин. Клітини фіксували охолодженим 70% етанолом і залишали протягом 12 годин. Перед аналізом клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і ресуспендували в 2 М HCl протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, щоб денатурувати їхню ДНК. Після нейтралізації 0,1 М Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> клітини промивали PBS, що містив 0,5% твіну 20 і 1% бичачого сироваткового альбуміну. Після цього здійснювали фарбування первинним антитілом проти BrdU (Exbio, США) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Клітини промивали PBS і інкубували з вторинними антитілами миші міченими за допомогою FITC (Sigma-Aldrich, США). Після цього клітини знову промивали PBS та інкубували з PI (0,05 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) та RNКазою А (1 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) протягом 1 години при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Зразки аналізували методом проточної цитометрії з використанням однопроменевого лазера при довжині хвилі 488 нм (FACS Calibur; Becton Dickinson, США) [250, 251].

*Оцінка синтезу РНК за допомогою аналізу інкорпорації BrdU.* Клітини інкубували з дослідними сполуками протягом 24 годин. Після цього проводили імпульсне мічення клітин 1 мМ BrU протягом 30 хвилин перед їхнім відбором. Клітини фіксували в 1% забуференому розчині параформальдегіду з 0,05% вмістом NP-40 при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім залишали

при 4°C протягом 12 годин. Перед вимірюванням їх промивали PBS з 1% вмістом гліцину, знову промивали PBS і фарбували первинними антитілами до BrdU (Exbio, США) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Після ще одного промивання в PBS клітини фарбували вторинним антитілом миші міченими FITC (Sigma-Aldrich, США). Після фарбування клітини промивали PBS і фіксували 1% параформальдегідним буфером PBS з 0.05% вмістом NP-40 протягом 1 години. Клітини промивали PBS, інкубували з PI (0,05 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) та РНКазою А (1 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) протягом 1 години при кімнатній температурі в захищеному від світла місці та аналізували методом проточної цитометрії з використанням однопроменевого лазера 488 нм (FACS Calibur; Becton Dickinson, США) [250, 251].

*Визначення рівня апоптозу за допомогою з анексину V та протидій йодиду.*

Індукцію апоптозу досліджуваними сполуками оцінювали за допомогою анексину V, міченого флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC), з яким, з високою спорідненістю в присутності іонів кальцію  $Ca^{2+}$ , зв'язується фосфатидилсерин клітинної мембрани. Для цього використовували FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, США) і проточний цитометр (BD FACSCanto II, BD Biosciences Systems, США). Аналіз проводили відповідно до інструкцій виробника. Клітини інкубували протягом 24 годин з досліджуваними сполуками. Калібрування проточного цитометра проводили шляхом підготовки двох контролів – позитивного та негативного. Позитивним контролем були клітини, в яких індукували апоптоз шляхом інкубації їх на льоді протягом 30 хвилин у 2 мкл 3% формальдегіду. Негативний контроль був представлений клітинами, які не були оброблені жодним із проапоптичних агентів. Спочатку в клітинах, оброблених досліджуваними сполуками, а також у контролі, середовище видаляли і клітини двічі промивали розчином PBS. Згодом клітини ресуспендували в буфері для зв'язування, включеному в набір, у концентрації  $1 \times 10^6$  клітин/мл. З кожного зразка було взято 100 мкл клітинної суспензії та



перенесено в пробірки, до яких потім додано по 5 мкл FITC Annexin V та пропідію йодиду (PI). Вміст пробірок обережно перемішували та інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Через певний час вміст пробірок було доведено до 500 мкл буферним розчином для зв'язування та максимально швидко проаналізовано на проточному цитометрі. Після зчитування проточного цитометра, результати аналізували за допомогою програмного забезпечення FACSDiva (BD Biosciences Systems, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Обладнання було відкалібровано за допомогою BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) [252].

*Визначення зміни мембранного потенціалу мітохондрій (МПМ).* Зниження МПМ оцінювали за допомогою ліпофільного катіонного зонда 5,5,6,6-тетрахлор-1,1,3,3-тетраетилбензімідазолкарбоціанін йодиду (набір JC-1 MitoScreen; Vестон Dickinson Biosciences, США), як описано раніше [253]. Клітини інкубували протягом 24 годин із досліджуваними сполуками. Нефіксовані клітини промивали і ресуспендували в PBS з додаванням JC-1. Після цього клітини інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі у темряві, промивали та ресуспендували в розчині PBS та швидко проводили аналіз на проточному цитометрі BD FACSCanto II. Відсоток клітин із порушеним МПМ розраховували за допомогою програмного забезпечення FACSDiva (BD Biosciences Systems, США). Калібрування обладнання проводилося за допомогою BD Cytometer Setup та Tracking Beads (BD Biosciences, США).

*Дослідження рівня активних каспаз 3/7, 8 та 9.* Активація каспазного каскаду відбувається в результаті ініціації процесу апоптозу в клітині та індукується цитотоксичною активністю сполук. У зв'язку з цим оцінку активності ініціюючих каспаз 8 і 9 та ефекторних 3 і 7 проводили за допомогою наборів FAM-FLICA® Caspase Assays (ImmunoChemistry Technologies, США) відповідно до інструкцій виробника. Після 24-годинної інкубації з

досліджуваними сполуками клітини відбирали, промивали двічі розчином PBS і ресуспендували в буфері для промивання у кількості  $5 \times 10^5$  клітин/мл. На наступному етапі відбирали по 290 мкл клітинної суспензії та переносили в пробірки. Після цього по 10 мкл розчину FLICA, розведеного безпосередньо перед використанням (1:5, з використанням розчину PBS), додавали до клітин, перемішували та інкубували в захищеному від світла місці протягом 1 години при температурі  $37^\circ\text{C}$ . Далі клітини двічі промивали, центрифугували та ресуспендували в 300 мкл буферного розчину. Підготовлені таким чином зразки максимально швидко аналізували за допомогою проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences Systems, США) (10 000 подій) із програмним забезпеченням FACSDiva (BD Biosciences Systems, США). Калібрування обладнання проводилося за допомогою BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences США) [252].

*Вестерн-блот аналіз про- і антиапоптозних білків.* З метою оцінки здатності досліджуваних сполук викликати стрес ендоплазматичного ретикулуму в ході дослідження механізму реалізації цитотоксичної активності, було проведено Вестерн-блот аналіз відповідних білків (VIP, PDI, кальнексин). Клітини висівали в 6-лункові планшети ( $5 \times 10^5$  клітин/мл/лунка) та інкубували з дослідними сполуками протягом 3 або 24 годин. Через відповідний проміжок часу клітини відбирали, білки виділяли та проводили електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію за методом Леммлі, як було описано раніше [254]. У процесі дослідження було використано наступні антитіла: VIP (#3177, Cell Signaling Technology, США), PDI (#2446, Cell Signaling Technology, США), кальнексин (#2433, Cell Signaling Technology, США) і  $\beta$ -актин (A5441, Sigma Aldrich). Усі первинні антитіла використовували у розведенні 1:1000 у 3% BSA та 5%- $\text{Na}_3\text{N}$ -вмісному трис-буферному фізіологічному розчині. Крім того, використовували мічені пероксидазою вторинні антитіла миші (#7076 Cell Signaling Technology, США) і антитіла кролика (A0168, Sigma-Aldrich) у робочих розведеннях 1:10000 [255].

*Дослідження гострої токсичності сполук in vivo.* Лабораторні тварини. Дослідження *in vivo* гострої цитотоксичної активності сполук проводили на базі віварію Інституту біології клітини НАН України. 14 дорослих самців мишей лінії C57BL/6 із середньою масою 23 г утримували в стандартних умовах віварію з постійним доступом до повноцінного корму та питної води. Тварини були розділені на 3 групи. Як позитивний контроль використовували доксорубіцин, його кумулятивна доза становила 20 мг/кг. Мишам 2-ї групи внутрішньочеревно вводили препарат доксорубіцин (Dox, n=4) у дозі 6,6 мг/кг кожні 48 годин з 1-ї по 5-ту добу експерименту (3 ін'єкції). Тваринам 3-ї групи вводили (n=6) внутрішньоочеревинно досліджувану сполуку у дозі 6,6 мг/кг кожні 48 годин тричі (загальна доза також становила 20 мг/кг). Мишам 1-ї контрольної групи вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину (0,9% розчин натрію хлориду) у аналогічний спосіб.

Лабораторним мишам щодня проводили оцінку виживаності та маси тіла. Дані про виживаність були представлені у вигляді кривих Каплана-Мейєра. Складено графіки зміни маси тварин протягом досліду. Тварин умертвляли на 22-й день експерименту (тобто на 22-й день після 1-го і на 17-й день після останнього введення сполук). Органи (серце, печінку, селезінку, нирки, легені) виділяли та зважували. Потім розраховували показники маси органу до тіла за такою формулою:  $(\text{маса органу} \times 100) / \text{маса тіла}$ .

Забір крові. Зразки крові відбирали з ретроорбітального синуса мишей. Для взяття крові тварину тримали великим і вказівним пальцями недомінантної руки, а шкіру навколо ока натягували. Потім капілярну трубку/піпетку вставляли в медіальний кут ока (кут 30 градусів до носа). Капілярну трубку/піпетку обережно виймали та протирали око миші стерильною ватою. Для гематологічного аналізу зразки крові (100 мкл) відбирали в мікропробірки, що містять 5 мкл 10% розчину динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (розчин  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) як антикоагулянту.

*Гематологічний аналіз.* Зміни гематологічного профілю вивчали за допомогою 5-компонентного автоматизованого гематологічного аналізатора DF-51 (DYMIND Biotechnology Co., Ltd, Китай) з використанням реагентів для гематологічного аналізатора (Dymind Biotechnology Co., Ltd, Китай) відповідно до інструкцій виробника. Кров для дослідження відбирали на 22 добу після першого введення досліджуваної сполуки.

Усі досліді *in vivo* проводились відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин під контролем Комітету з біоетики вищезазначеної установи (Протокол № 4/2016 від 05.06.2016 Комітету з біоетики) в Інституті біології клітини НАН України).

*Цитотоксичні та гістологічні дослідження кон'югатів похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу **6.16**, **6.17** з лектинами, та сироватковим альбуміном.* Методика кон'югації сполуки **6.16** з лектином насіння гороху (PSA, *Pisum sativum* agglutinin). 30 мг лектину насіння гороху розчиняли в 2,7 мл 0.15 М карбонатного буферу (рН 9,0), розділяли на три порції по 0,9 мл і додавали різні кількості 10 % розчину сполук, розчинених в 90° етанолі (0,05 мл спирту – 0,5 мг сполуки; 0,1 мл спирту – 1 мг сполуки; 0,2 мл спирту – 2 мг сполуки). Реакційну суміш залишали при кімнатній температурі на 48 год. Після цього реакцію зупиняли додаванням до кожної проби 0,1 мл етиленгліколю і після перемішування через 10 хв додавали у кожну пробірку по 5 мг борогідриду натрію. Для відділення непрореагованих сполук від кон'югату суміш діалізували проти 50 мл 20° етанолу протягом ночі, а після цього для видалення етанолу діалізували проти 0,05 М карбонатного буферу (рН 8,0). Необхідність діалізу проти лужного буферного розчину обумовлена значно кращою розчинністю лектину гороху в слабо лужному середовищі.

*Методика кон'югації сполуки **6.17** з лектинами та сироватковим альбуміном людини (HSA).* 10 мг лектину та HSA розчиняли в 1,0 мл 1% водного розчину гідрокарбонату натрію до якого додавали 0,025 мг – 0,2 мл 1 % розчину сполук в ДМСО. Розчин перемішували і залишали на 3 години при кімнатній

температурі. Після цього спостерігалось поступове світлішання каламутного розчину. Надалі до даного розчину додавали 5 мг борогідриду натрію і залишали на 12 годин. Для відділення непрореагованої сполуки від кон'югату суміш діалізували проти 50 мл 20 % водного розчину ДМСО, а потім проти 50 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР).

Аналіз кон'югату сполуки **6.16** з лектином насіння гороху. Важливими характеристиками одержаного кон'югату є його лектинова активність (здатність зв'язуватись з специфічними вуглеводами та глікопротеїнами клітинної поверхні), загальний вміст білка та вміст приєднаної до лектину сполуки. Лектинову активність до і після кон'югації оцінювали шляхом визначення титру аглютинації 2% суспензії еритроцитів людини групи А у ЗФР в перерахунку на мг білка препарату. Детальніше методика визначення титру аглютинації була описана раніше [256]. Концентрацію білка у розчинах лектину гороху визначали за оптичним поглинанням при довжині хвилі 280 нм. Концентрацію сполуки визначали за оптичним поглинанням при 310 нм ( $\lambda_{\max}$ ), однак, у зв'язку з тим, що сполука має високий коефіцієнт поглинання також при 280 нм, більш практичним виявилось визначення його концентрації при 280 нм. Вміст сполуки у кон'югаті вираховували за приростом екстинції при 280 нм.

Аналіз кон'югату сполуки **6.17** з лектинами та сироватковим альбуміном людини. Лектинову активність до і після кон'югації оцінювали шляхом визначення титру аглютинації 2 % суспензії еритроцитів кролика у забуференому фізіологічному розчині в перерахунку на мг білка препарату. Вміст сполуки **6.17** у кон'югаті оцінювали за значенням екстинції при 361 нм. При цій довжині хвилі сполука проявляє характерний максимум. Вміст білка визначали методом Лоурі, визначаючи екстинцію при довжині хвилі 740 нм.

Дослідження цитотоксичності кон'югатів сполуки **6.16** та **6.17** з лектинами та сироватковим альбуміном людини. Для визначення цитотоксичності лектинів, сполук **6.16**, **6.17** та їх кон'югатів досліджували клітинні лінії висівали у 96-лункові планшети і додавали вищеназвані зразки у різних концентраціях. В якості контролю було використано протипухлинний препарат доксорубіцин.

Підрахунок кількості клітин здійснювали в камері Горяєва через певні проміжки часу із використанням барвника трипанового синього (DV-T10282, Invitrogen, США), як індикатора проникливості зовнішніх плазматичних мембран. Забарвлені в синій колір клітини вважали такими, що зазнали пронекротичних змін. Густину клітинної суспензії визначали за формулою:  $c=12500n$ , де  $c$  – кількість клітин в 1 мл суспензії,  $n$  - середня кількість клітин у 5-ти великих квадратах камери Горяєва.

*Гістологічні дослідження кон'югату сполуки 6.16 з лектином насіння гороху.* Для дослідження було використано аутопсійний матеріал товстої кишки дорослої людини. Матеріал фіксували в формаліні, обезводнювали в зростаючих концентраціях спиртів, просвітлювали у ксилолі, заливали в парафін та робили зрізи товщиною 5-7 мкм. Для дослідження загальної морфології використали фарбування гематоксилін-еозином.

Виготовлення міченого препарату лектину гороху. Для виявлення вуглеводних детермінант, з якими зв'язувався лектин гороху було використано лектин, мічений колоїдним золотом (КЗ). Золь колоїдного золота з розміром часточок 15 нм готували за методикою, що полягає у відновленні 0,01% розчину  $\text{NaAuCl}_4$  точно визначеною кількістю цитрату калію до утворення золю золота заданого розміру [257]. Концентрацію часточок визначали шляхом вимірювання екстинції утвореного золю при  $A_{520}$  нм. До 50 мл золю золота з  $A_{520} = 5,0$  для стабілізації додавали 0,25 мл 10 % розчину полівінілпролідону (М.м. = 24 кДа) та 5,0 мл 0,1 М ацетатного буферу рН 6,0. Далі до золю золота додавали розчин лектину гороху в цьому ж ацетатному буфері. Масу внесеного лектину визначали експериментально з використанням нестабілізованих (без додавання полівінілпролідону) часточок золота.

Виявлення місць зв'язування *лектину в клітинах.* Зрізи виготовляли за загальноприйнятою гістологічною методикою, доведені після депарафінізації до води інкубували в розчині міченого КЗ лектину гороху при кімнатній температурі протягом 60 хв. Після відмивання від незв'язаного лектину препарати обробляли розчином ацетату срібла у гідрохіноновому проявнику,

приготовленому на 0.1 М цитратному буфері, рН 3.5. Необхідність такої обробки пояснюється тим, що частинки колоїдного золота не видно у світловому мікроскопі й для їх візуалізації необхідне підсилення сигналу шляхом фізичного проявлення солями срібла [258]. У місцях локалізації частинок колоїдного золота відбувається відкладання металічного срібла, яке добре видно у світловому мікроскопі (аналогічно до імпрегнації сріблом). Щоб уникнути надлишкових відкладень срібла, процес контролювали під мікроскопом. Зазвичай, тривалість проявлення ацетатом срібла становила 10-15 хв.

*Дослідження протимікробної активності.* Протимікробну та протигрибкову дію визначали *in vitro* методом дифузії в агар та методом серійних мікророзведень на основі резазурину [259] на референс-культурах та клінічних ізолятах мікроорганізмів виділених від пацієнтів. Як контроль було використано диметилсульфоксид (ДМСО) та ванкоміцин, ципрофлоксацин, амоксацилін, амфотерцин В, клотримазол як еталонні лікарські засоби. Було використано 48 еталонних і клінічних мікробних і грибкових штамів, попередньо ідентифікованих за допомогою системи MALDI TOF (Bruker, Бремен, Німеччина) і послідовностей генів 16S рРНК. Референс-культури: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* CE5556, *Enterobacter kobei* 3683, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Raoultella terrigena* ATCC 33257, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 (F-49), *Staphylococcus aureus* CCM 4223 MSSA ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 4591 MRSA, *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221, *Enterococcus faecium* VanA 419/Ana (VRE), *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus licheniformis* (ВКПМ-7038), *Candida albicans* ATCC 885/653, *Aspergillus niger* муз. №162; клінічні ізоляти: *Pseudomonas aeruginosa* №7, *Pseudomonas aeruginosa* R, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas putida* № 182, *Brevundimonas vesicularis* № 111, *Escherichia coli* №37, *Escherichia coli* № 168, *Escherichia coli* №5, *Escherichia coli* CCM 3954, *Escherichia coli* 20574, *Proteus mirabilis* № 113, *Raoultella terrigena* №1, *Achromobacter xylosoxidans* № 147, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Citrobacter freundii* № 2, *Staphylococcus lentus* №21, *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus* №23, *Staphylococcus aureus* №120, *Staphylococcus haemolyticus* MRSH, *Kocuria marina* № 133, *Staphylococcus lugnuniensis* №142, *Micrococcus luteus* № 136, *Enterococcus faecalis* № 26, *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida albicans* CCM 8161, *Candida albicans* №60, *Candida albicans* №139, *Candida kefyr* № 68, *Saccharomyces cerevisiae* № 62, *Candida dubliniensis* №67. Усі клінічні штами були полірезистентними (MDR) або широко стійкими (EXR) до антибіотиків. Клінічні штами були виділені від пацієнта з інфекціями, пов'язаними з наданням медичної допомоги з відділень лікарень. Досліджувані сполуки (у концентрації 1мМ) поміщали у лунки діаметром  $5,5 \pm 0,5$  мм (50 мкл/лунку), що містили суспензію культури мікроорганізмів (McFarland 2.0) на пластинці агару (м'ясо-пептонний агар або середовище Сабуро для грибів). Сполука, що спричиняла діаметр інгібування росту мікроорганізмів, більше, ніж на 10 мм, вважалася активною. Метод серійних розведень на основі ресузурину передбачав внесення в 96-лункову планшетку 50 мкл поживного середовища (бульйон Мюллера-Хінтона), 100 мкл досліджуваної сполуки та 50 мл суспензії відповідного мікроорганізму (McFarland 2.0), з додаванням 15 мкл 0,02% розчину резазурину в кожен лунку. Усі тести повторювали тричі.

Оцінку синергізму з амоксициліном для синтезованих сполук проводили шляхом порівняння МІК амоксициліну в присутності субінгібіторних концентрацій сполук [259]. Для оцінки синергізму використовували наступні штами бактерій із резистентністю до  $\beta$ -лактамних антибіотиків: Es $\beta$ L ( $\beta$ -лактамази розширеного спектру) – *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; метицилінрезистентний *Staphylococcus haemolyticus* (MRSH) з подвійними механізмами резистентності до  $\beta$ -лактамів включав як атипичний пеніцилінзв'язуючий білок PBP2\*, так і  $\beta$ -лактамазну активність. Вироблення атипичного пеніцилінзв'язуючого білка PBP2\* було доведено за допомогою реакції латексної аглютинації (Slidex® MRSA Detection, bioMérieux Corporate, France). Результати досліджень опрацьовано методами варіаційної статистики.



*Дослідження протитрипаносомної активності.* Гемолімфатичні форми *Trypanosoma brucei brucei* штаму 90-13 культивували в середовищі НМІ9 з додаванням 10% FCS при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> [260]. У всіх експериментах культури паразитів отримували шляхом центрифугування при 3000g і відразу по тому використовувалися. Дослідження сполук базувалося на перетворенні окисно-відновного барвника (резазурину) у флуоресцентний продукт життєздатними клітинами, як було описано раніше [261]. Розчини досліджуваних сполук готували шляхом розчинення в ДМСО. Гемолімфатичні форми *Trypanosoma brucei brucei* (105 клітин/мл) культивували в 96-лункових планшетах за відсутності або в присутності різних концентрацій інгібіторів у кінцевому об'ємі 200 мкл. Після 72-годинної інкубації в кожному лунку додавали розчин резазурину в кінцевій концентрації 45 мкМ і вимірювали флуоресценцію при довжинах хвиль 530 нм і 590 нм після подальшої 4-годинної інкубації. Відсоток інгібування швидкості росту паразитів розраховували шляхом порівняння флуоресценції культур паразитів в присутності досліджуваних сполук та флуоресценції без досліджуваних речовин. ДМСО використовували як контроль. Концентрацію, що інгібує 50% росту паразитів (IC<sub>50</sub>), визначали із дозо-залежних кривих із концентраціями речовин в діапазоні від 10 мкг/мл до 0,625 мкг/мл і виражали в мкМ. Значення IC<sub>50</sub> є середнім ± стандартним відхиленням трьох незалежних експериментів.

*Дослідження антиексудативної активності in vivo.* Антиексудативну активність досліджуваних сполук оцінювали на карагеніновій моделі набряку лап щурів [262]. Для дослідження було використано дорослі щури обох статей масою 190-220 г. Як контроль було використано диклофенак натрію (8 мг/кг) і кеторолак трометамін (10 мг/кг). Усіх тварин перед досліддами годували стандартним раціоном та давали воду. Контрольні лікарські засоби і досліджувані сполуки у дозі 50 мг/кг розчиняли у фізіологічному розчині з додаванням однієї краплі твіну-80 і вводили внутрішньоочеревинно. Контрольна

група щурів отримувала тільки фізіологічний розчин з додаванням однієї краплі твіну-80; через 40 хвилин 0,1 мл 2% розчину карагенану в фізіологічному розчині вводили в підошовну область правої задньої лапи кожного щура. Приріст об'єму задньої лапи (у мл) вимірювали електронним онкографом безпосередньо перед і через 4 години після ін'єкції карагенану, а зменшення набряку лапи порівнювали з контрольною групою. Антиексудативну активність виражали як зменшення набряку лапи щурів і відображали у відсотках. Порядок, застосований для оцінки антиексудативної активності, розглянуто та з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 9 від 22.11.2021 року).

*Дослідження антиоксидантної активності на основі ДФПГ-тесту.* Методологія визначення антиоксидантної активності сполук на основі інгібування 2,2-дифеніл-1-пікрилгидразилу (ДФПГ) була детально повідомлена раніше [263]. Варто відзначити, що ДФПГ як сполука здатний до утворення стабільного радикалу завдяки делокалізації вільної електронної пари запобігаючи утворенню його димеру. Значений радикал використовується в аналізі здатності сполук до його поглинання з метою визначення кількісної оцінки антиоксидантної активності. Темно-фіолетовий колір ДФПГ буде знебарвлюватись, при його відновленні сполуками з антиоксидантними властивостями до нерадикальної форми. ДФПГ-тест широко використовуються в методології дослідження антиоксидантної активності широкого спектру органічних сполук, включно із сполуками природного походження. Коли радикал ДФПГ поглинається, колір реакційної суміші змінюється з фіолетового на жовтий із зменшенням поглинання при довжині хвилі 517 нм. Маточні розчини досліджуваних сполук готували в суміші метанолу та буферу трис-НСІ (рН=7,4). Після цього 1 мл розчину ДФПГ (8 мг у 100 мл метанолу) додавали до зразка досліджуваної сполуки та пустої проби. Зазначені суміші реагентів залишали при кімнатній температурі на одну годину при постійному

перемішуванні. Оптичну гуштину зразків визначали при довжині хвилі 517 нм проти етанолу за допомогою спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Японія). Кожен зразок аналізували в трьох повторах. Відсоток інгібування розраховували проти пустої проби за формулою:

$$I\% = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} * 100\%,$$

де  $A_{\text{blank}}$  – це абсорбція контрольної проби, що містить усі реагенти, крім досліджуваної сполуки, а  $A_{\text{sample}}$  – абсорбція досліджуваної сполуки.

*Дослідження in vivo антиконвульсантної активності на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом. Лабораторні тварини.* Дослідження проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою 18-22 г на базі віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету м. Харків. Тварин утримували групами по 10 у стандартних пластикових клітках при температурі  $20 \pm 2$  °С, піддаючи циклу світло/темрява по 12 годин із стандартним раціоном та водою. Усі досліди проводили у період з 9<sup>00</sup> по 15<sup>00</sup> години. Досліджувані групи склалися з 6-7 мишей та були відібрані рандомізовано. Усі маніпуляції, проведені із залученням лабораторних тварин, відповідали етичним стандартам та були схвалені етичним комітетом Національного фармацевтичного університету, Харків, Україна (протокол №: 3/2019).

*Пентилентетразолова (PTZ) модель судом.* Судоми, викликані пентилентетразолом проводили шляхом його підшкірної ін'єкції у дозі 90 мг/кг. Тварин поміщали в окремі прозорі пластикові циліндричні контейнери та безперервно спостерігали протягом 60 хвилин. Натрію вальпроат (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція) у дозі 300 мг/кг [264] у формі сиропу для перорального застосування та фенітоїн (Діфенін, Київський вітамінний завод, Україна) у дозі 40 мг/кг [265] були використані як препарати порівняння. Для порівняння використовували також високоселективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб (Celebrex, Pfizer, США) у дозі 4 мг/кг. Досліджувані похідні 4-тіазолідинону

вводили одноразово внутрішньошлунково у вигляді водної суспензії, стабілізованої твіном-80 у дозі 100 мг/кг за 30 хв до індукції судом [264]. Доза досліджуваних сполук 100 мг/кг була обрана на основі попередніх скринінгових досліджень похідних 4-тіазолідинону, що володіли вираженою протисудомною дією [266]. Ефективність досліджуваних сполук оцінювали за такими показниками: латентний період, кількість клоніко-тонічних судом у окремої миші, відсоток тварин у групі окремо з клонічними та тонічними судомами, тяжкість нападу у балах (1 бал – поодинокі тремтіння; 2 бали – «манежний» біг або положення «кенгуру»; 3 бали – клонічні судоми без латерального положення; 4 бали – клоніко-тонічні судоми з латеральним положенням; 5 балів – тонічне розгинання; 6 бали – тонічне розширення, що призвело до загибелі тварини), тривалість судомного періоду (період судом), тривалість життя тварин до моменту загибелі та летальність. Якщо нападів не спостерігалось протягом 1 години, латентність вважалася рівною 60 хв [267]. Для статистичного аналізу результатів використовувалася програмний пакет Statistica v. 12.0 (Dell, США) для Windows. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. Рівень статистичної значущості вважався  $p < 0,05$ . Статистичні відмінності між групами аналізували за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента у випадках нормального розподілу; непараметричний U-критерій Манна–Уїтні за його відсутності. Для результатів в альтернативній формі (летальність, відсоток мишей з клонічними та тонічними судомами) використовували кутове перетворення Фішера (при необхідності з поправкою Єйтса).

*Імунохімічні дослідження головного мозку мишей після PTZ-індукованого кіндлінгу.* На 16 день після PTZ-індукованого кіндлінгу через 1 год після введення препаратів та досліджуваних сполук для лабораторних тварин виконували евтаназію шляхом дислокації шийних хребців [268]. негайно вилучали головний мозок, який заморожували рідким азотом, зберігали в морозильній камері при  $-70^{\circ}\text{C}$  та гомогенізували безпосередньо перед дослідженням проб. У гомогенаті головного мозку мишей з використанням

стандартних видоспецифічних наборів визначали вміст ЦОГ-1 (Cyclooxygenase-1 ELISA Kit), ЦОГ-2 (Cyclooxygenase-2 ELISA Kit), простагландинів: PGE2 (Prostaglandin E2 (PG-E2) ELISA Kit), PGF2 $\alpha$  (Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) ELISA Kit), PGI2 (Prostacyclin (PGI2) ELISA Kit), TXB2 (Thromboxanes B2(TXB2), ELISA Kit), 8-ізопростану (8-isoprostane ELISA, Enzyme immunoassay for the quantitative determination of 8-isoprostane) та NSE (Mouse Neuron-specific enolase (NSE) ELISA Kit).

*Дослідження психотропних властивостей 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону **8.62**.* Дослідження виконано на базі Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету м. Харків відповідно до Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо правил по проведенню експериментів на лабораторних тваринах. Дослідження проведено на 71 білій нелінійній миші обох статей масою 20-27 г. Тварин утримували за стандартних умов віварію Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету м. Харків. Досліджувану сполуку вводили тваринам у дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково у вигляді стабілізованої твіном-80 суспензії за 30 хв до проведення тесту. Тварини у контрольній групі отримували внутрішньошлунково воду очищену в співвідношенні 0,1 мл на 10 г маси тварини.

У цьому дослідженні проводили тест відкритого поля, щоб вивчити вплив сполуки **8.62** на рухову, орієнтаційно-дослідницьку та емоційну активність тварин, а також її вегетативний супровід, протягом трьох хвилин.. Тварин розташовували в центрі поля та вимірювали кількість пройдених квадратів, вертикальних стійок, обстежених отворів, актів грумінгу, фекальних болюсів і уринацій [264].

У тесті піднесеного-хрестоподібного лабіринту з'ясовували вплив сполуки на тривожність. Тварину поміщали на центральну площину лабіринту з головою, спрямованою до освітленого коридору. Протягом п'яти хвилин реєстрували час,

що пройшов до входу у темний коридор (латентний час), тривалість перебування в коридорах, кількість відвідувань освітлених і затемнених коридорів, а також вегетативний супровід емоційних реакцій (фекальні болюси та уринації) [264].

В іммобілізаційному тесті підвішування за хвіст вивчали вплив сполуки на депресивну поведінку. Протягом шести хвилин було зареєстровано латентний час, коли тварина перебуває у нерухомому стані, а також кількість актів і тривалість іммобілізації.

Вплив сполуки **8.62** на пам'ять інтактних тварин визначали у тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ). Тварини були розміщені на освітленій площадці пристрою, і було виміряно латентний час, необхідний для їх входу в темну камеру, де мишей піддавали електричному подразненню струмом силою від 0.3 до 0.6 мА. Через 24 години тварини були знову розміщені на освітленій площадці пристрою, і було зареєстровано кількість невиконаних спроб та латентний час для входу. Тварин, які не входили в темну камеру протягом 3 хвилин, вважалися навченими згідно з критерієм.

У тесті стрижня, що обертається, оцінювали вплив сполуки **8.62** на тонус м'язів і координацію рухів. Протягом п'яти хвилин було зареєстровано кількість тварин, які упали зі стрижня протягом певних інтервалів часу, коли він обертася зі швидкістю 10 обертів за хвилину [264].

Дослідження впливу сполуки **8.62** на фізичну витривалість проводилося за допомогою тесту примусового плавання з навантаженням. Мишам на корінь хвоста було закріплено вантаж, що становив 10% від їхньої маси тіла, після чого тварин розміщували у басейн з водою при температурі 23-24 °С. Було зафіксовано час плавання до моменту, коли тварина не могла піднятися над поверхнею води протягом 10 секунд.

Як препарати порівняння у дослідженнях психотропних властивостей було використано класичний антиконвульсант вальпроат натрію з доведеними нормотимічними властивостями у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково у вигляді сиропу для орального застосування (Депакін, Sanofi-Aventis, Франція) [266, 269]. У тесті УРПУ використано пірацетам (Пірацетам-Дарниця, Дарниця, Україна) у

дозі 200 мг/кг внутрішньошлунково як препарат з ноотропними властивостями [270]. У тесті плавання з навантаженням як референс-препарат, для якого характерне посилення фізичної витривалості за рахунок екстреної мобілізації резервних можливостей організму, використано кофеїн-бензоат натрію (Кофеїн-бензоат натрію-Дарниця розчин д/ін. 100 мг/мл, Дарниця, Україна) у дозі 20 мг/кг внутрішньоочеревинно [271].

Для статистичної обробки використовували програмний пакет Statistica v. 12.0 (Dell, США). Спершу проводили перевірку на нормальність розподілу, використовуючи метод boxplot, критерії Колмогорова-Смирнова та Шапіро-Вілка. Якщо в одному з тестів розподіл не був нормальним, гіпотезу про нормальність відхиляли. Використовували критерій Краскела-Волліса для множинного порівняння та U-критерій Манна-Вітні для попарного порівняння. Результати наведено у вигляді  $Me[Q^{25};Q^{75}]$ . Відмінності вважали статистично значущими у разі  $p < 0,05$  (з урахуванням перерахунку на кількість досліджуваних груп).

*Дослідження фригопротекторного ефекту 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону 8.62.* Вивчення фригопротекторної активності виконано на базі віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету м. Харків на білих мишах самцях масою 20-24 г (78 особин) протягом одного дня з 12<sup>00</sup> до 18<sup>00</sup> год.

Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію за вільного доступу до води, постійної вологості та температурного режиму + 22-23 °С. Під час виконання експерименту дотримано норми та принципи, затверджені Гельсінською декларацією щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.) та Директивою Ради Європейського Союзу щодо захисту тварин, що використовуються з наукової метою (2010 р.).

Для моделювання гострого загального охолодження (ГЗО), були використані лабораторні тварини, які поміщали в індивідуальні пластикові клітки об'ємом 500 см<sup>3</sup>. Рухова активність та доступ до повітря не обмежувалися. Для створення ГЗО, клітки розміщувалися у морозильній камері Nord Inter-300

(Україна) з прозорою кришкою при температурі -18 °С. В якості інтегрального показника ефективності фригопротекторної дії був обраний час життя тварин [272].

У ході дослідження було використано наступні препарати: ацетилсаліцилова кислота (АСК) (Bayer, Німеччина), диклофенак натрію (Novartis, Швейцарія), целекоксиб (Pfizer, США), еторикоксиб (Merck Sharp & Dohme Idea Inc., США), а також ряд похідних на основі 4-тіазолідинону.

Лікарські засоби та досліджувані сполуки подрібнювали в ступці та суспендували у воді з додаванням твіну-80. Отримані суспензії вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда в обсязі 10 мл на кілограм маси тіла (приблизно 0,20-0,24 мл на кожну тварину) у профілактичному режимі за 30 хвилин до викликання холодової травми (ХТ), відповідно до рекомендацій для дослідження фригопротекторних властивостей [273]. Тварини були розділені на 13 груп у випадковому порядку. Перша група була контрольною (n=6), їм вводили воду в дозі 10 мг на кілограм маси тіла, і вони були піддані холодовій травмі (ХТ). Друга група отримувала ацетилсаліцилову кислоту (АСК) у дозі 50 мг на кілограм маси тіла (n=6), після чого їх також піддавали ХТ. Третя група отримувала парацетамол у дозі 125 мг/кг, четверта група - парацетамол у дозі 250 мг/кг, п'ята група - дарбуфелон у дозі 30 мг/кг, шоста група - дарбуфелон мезилат у дозі 20 мг/кг, сьома група - дарбуфелон мезилат у дозі 40 мг/кг, восьма група - дарбуфелон мезилат у дозі 100 мг/кг, дев'ята група - 5-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксибензиліден)-2-(тіазол-2-іліміно)-тіазолідин-4-он у дозі 40 мг/кг, десята група - диклофенак натрію у дозі 14 мг/кг, одинадцята група - целекоксиб у дозі 74 мг/кг, дванадцята група - еторикоксиб у дозі 10 мг/кг, а тринадцята група - еторикоксиб у дозі 20 мг/кг. Ацетилсаліцилова кислота, диклофенак натрію та целекоксиб використовувалися як препарати порівняння з відомою фригопротекторною активністю.

Для визначення доз препаратів були використані дані з літератури та попередніх досліджень. Ацетилсаліцилова кислота (АСК) була введена у дозі 50 мг/кг. Диклофенак та целекоксиб були використані у дозах 14 мг/кг та 74 мг/кг,



відповідно [274-276]. Дарбуфелон мезилат в експерименті зазвичай застосовується у діапазоні доз від 10 до 180 мг/кг [277-279], тому було вибрано 3 дози: 20, 40 та 100 мг/кг. З урахуванням цього діапазону були обрані дози дарбуфелону та 5-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксибензиліден)-2-(тіазол-2-іліміно)-тіазолідин-4-ону відповідно 30 мг/кг і 40 мг/кг. Дози інших препаратів були розраховані на основі середніх терапевтичних доз для людини з використанням рекомендованих коефіцієнтів перерахунку FDA [280].

Для статистичної обробки використовували критерій Краскела-Уолліса для множинного порівняння та U-критерій Манна-Вітні для попарного порівняння. Аналіз проводили за допомогою програми Statistica v. 13.5 (Dell, США). Результати наведено у вигляді  $M \pm m$  та  $Me[Q_1; Q_3]$ . Відмінності вважали статистично значущими в разі  $p < 0,05$  (з урахуванням перерахунку на кількість досліджуваних груп).

*Дослідження алергенної дії 3-[5-(1H-індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонової кислоти* **8.3.** Експеримент проводили на 16 мурчаках (по 8 тварин у кожній групі) білої масті віком 3-3,5 місяці і масою тіла 280–350 г. Тварини утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького за температури 19,0–20,5°C в умовах природного світлового циклу. Харчовий раціон стандартний з вільним доступом до води та їжі [281]. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей” (Страсбург, 1985), Директиви ЄС 2010/63/EU та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» в редакції № 440-IX від 14.01.2020.

Дослідження алергенної дії сполуки проводили згідно методик повідомлених раніше [282, 283]. Сенсibiliзацію тварин проводили за методом О. Г. Алексєєвої, А. І. Петкевич [284] шляхом внутрішньошкірного введення 200 мкг препарату розведеного в 0,02 мл розчинника (фізіологічний розчин для

контрольної групи і 20 % розчин етилового спирту) в шкіру зовнішньої поверхні вуха тварини. Контрольним тваринам вводили по 0,02 мл розчинника. Через 10 діб додатково наносили 20 аплікацій на попередньо депільовану ділянку бокової поверхні тулуба. Ступінь сенсibiliзації встановлювали після постановки внутрішньошкірних проб в розведеннях: 1:10, 1:100. Вираженість алергенної дії сполуки встановлювали у порівнянні з контролем, за інтенсивністю місцевої гіперемії, набряку, наявності ерозій та некрозу тканин. Реакцію організму оцінювали шляхом візуального огляду поверхні шкіри (діаметр еритеми, інфільтрат чи набряк в місці інокуляції або генералізований) на місці введення проб через 20-30 хв., 4-5 год та 24 год. після введення і за результатами клінічних та алергічних тестів.

*Визначення зміни показників периферійній крові на фоні дії сполуки 8.3.* На фоні дії сполуки **8.3** було визначено зміни показників периферійній крові (лейкоцитів та лейкоцитарну формулу) [285, 286]. На основі лейкоцитарної формули проводили обчислення співвідношення окремих популяцій лімфоцитів (CD-3, CD-4, CD-8, CD-16, CD-22), які можуть бути використані в якості загальної характеристики клітинних реакцій неспецифічного і специфічного захисту організму. Враховували гематологічні індекси: індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ), що вказує на наявність взаємодії ефекторної та афекторної ланок імунної відповіді; індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ), індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ), що характеризують роль кожного компонента мікрофагальної та макрофагальної системи захисту організму [287, 288].

Стан неспецифічної резистентності організму вивчали за фагоцитарним індексом (ФІ) – відсотком нейтрофілів, які беруть участь у процесі фагоцитозу; фагоцитарним числом (ФЧ) – кількістю часточок полістиролового латексу, поглинутих одним фагоцитом [289]. Для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів в лунку пластикової планшетки вносили 0,5 мл крові, 0,5 мл суспензії полістиролового латексу і перемішували. Після 30-хвилинної інкубації

при 37 °С пробірки центрифугували. З осаду готували мазки, висушували на повітрі не менше 1 години, фіксували і забарвлювали. Під світловим мікроскопом підраховували 200 нейтрофілів, визначали відсоток клітин, які вміщують гранули латексу (фагоцитарний індекс) та середню кількість гранул латексу у 1 фагоциті (фагоцитарне число).

*Визначення індексу завершеності фагоцитозу на фоні дії сполуки 8.3.* Стан імунологічної реактивності організму оцінювали за відносним та абсолютним вмістом в периферичній крові субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD<sub>3</sub> (Т-лімфоцитів), CD<sub>4</sub> (Т-хелпери), CD<sub>8</sub> (Т-цитотоксичні), CD<sub>16</sub> (природні кілери), CD<sub>22</sub> (В-лімфоцити). Дослідження проводили з використанням еритроцитарних діагностикумів (ТОВ НВЛ “Гранум”, Україна). Також розраховували імунорегуляторний (відношення CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>).

Отримані дані виражали у відсотках і в абсолютних одиницях у перерахунку на 1 літр крові (10<sup>9</sup>/л), (г/л). Достовірність отриманих змін оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента.

Дозвіл на проведення експериментів на тваринах затверджений протоколом № 6 комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ЛНМУ імені Данила Галицького від 25 червня 2018 року.

### 2.3 Дослідження сполук методами комп’ютерної хімії.

*COMPARE аналіз.* Алгоритм COMPARE аналізу ґрунтувався на кореляції протипухлинної активності 60 типів пухлинних клітинних ліній людини між досліджуваними сполуками та раніше оціненими протипухлинними агентами, включно із лікарськими засобами з баз даних Національного інституту раку

США (NCI) ([https://dtp.cancer.gov/databases\\_tools/compare.htm](https://dtp.cancer.gov/databases_tools/compare.htm)) [290-292]. Цей статистичний підхід використовується для прогнозування та визначення механізмів дії синтетичних сполук та сполук природнього походження. COMPARE аналіз проводився шляхом порівняння результатів скринінгу протипухлинної активності *in vitro* досліджуваних сполук з базою даних NCI на рівнях GI<sub>50</sub>.

*Молекулярний докінг сполук-хімії.* Для прогнозу ймовірного механізму реалізації антимікробної (сполука **3.14**), протипухлинної (сполука **5.15**) та протизапальної (сполука **8.62**) активностей були проведені докінгові дослідження з використанням програмного пакету *AutoDock Vina*® v. 1.2.0 (Scripps Research, США). Структури ферментів для молекулярного докінгу були отримані зі сховища Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Для розрахунків та візуалізації для сполуки **3.14** було використано наступні потенційні біологічні мішені: MurD лігаза (код 2Y67), ДНК-гіраза (код 2XCT); для сполуки **5.15** TGFβ (код 1VJY), топоізомераза I (код 1T8I), топоізомераза II (код 3QX3), дигідрооротат дегідрогеназа (hDHODH) (код 6LP7); для сполуки **8.62** ЦОГ-1 (код 4O1Z), ЦОГ-2 (код 3LN1), 5-ЛОГ (код 3V99) та FLAP (код 6VGI). Графічний редактор Biovia Draw (Dassault Systemes, Франція) було використано для побудови структурних формул досліджуваних сполук. Оптимізація просторової структури була проведена з використанням програмного пакету *HyperChem 7.5* (Hypercube, Inc., США) методом молекулярної механіки MM+ до досягнення середньоквадратичного градієнта (RMS) менше 0,1 ккал/(моль·Å). Фінальна мінімізація енергій досліджуваних структур здійснювалась напівемпіричним квантово-хімічним методом PM3 до досягнення RMS градієнта менше 0,01 ккал/(моль·Å). Решітка тривимірних блоків була створена розміром хуз 50×50×50 точок з відстанню 0.375 Å, а карти решітки, що представляють інтактний ліганд у фактичному місці стикування, були зроблені за допомогою програмного пакету Auto Grid Tool. Для більш

точних результатів було змінено параметри алгоритму Ламарка (LGA) із стандартних налаштувань на розширені. Оцінку взаємодії проводили шляхом визначення енергії зв'язування (ккал/моль) і константою інгібування (мкМ) шляхом розрахунку кількості водневих зв'язків утворених із амінокислотними залишками. Валідацію обраних параметрів молекулярного докінгу проводили шляхом повторної оцінки взаємодії вихідних лігандів та цільових біомішеней. Точність експериментів оцінювали шляхом обчислення середньоквадратичних відхилень (RMSD) не враховуючи значення  $\text{RMSD} > 2$ . Для візуалізації особливостей взаємодії фермент-ліганд було використано програму Discovery Studio Visualizer (Dassault Systemes Biovia, Франція).

*Оцінка параметрів лікоподібності синтезованих сполук за допомогою онлайн сервісу SwissADME.* Для ряду синтезованих сполук використовуючи онлайн платформу SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) розроблену Швейцарським інститутом біоінформатики (Swiss Institute of Bioinformatics) [293]. були обчислені основні фізико-хімічні дискриптори, параметри ADME (абсорбція, дистрибуція, метаболізм, елімінація, токсичність), а також ряд інших специфічних параметрів таких як BOILED-Egg, iLOGP та біодоступність (Bioavailability Radar) та встановлено відповідність критеріям лікоподібності.

*Розробка фармакофорних моделей протимікробної дії похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу щодо метицилін-резистентного штаму *Staphylococcus aureus* (MRSA).* З метою ідентифікації можливих фармакофорних груп, що забезпечують протимікробну активність щодо метицилін-резистентного золотистого стафілококу (MRSA) було використано методологію фармакофорного пошуку в програмі MOE версії 2007.09 (Chemical Computing Group, Канада) [294]. Використовуючи даний програмний пакет було створено базу даних сполук, що володіли ідентифікованими позитивними та негативними результатами дослідження протимікробної активності. Тривимірна геометрія

досліджуваних сполук була обчислена методом молекулярної механіки з використанням силового поля MMFF94x. Оптимізацію геометрії було здійснено до досягнення середньоквадратичного градієнта (RMS) 0.001. В подальшому було здійснено генерування бази конформерів використовуючи метод стохастичного пошуку. Конформери, що мали внутрішню енергію, яка на понад 7 ккал/моль перевищувала внутрішню енергію оптимальної структури були невраховані як енергетично не вигідні. У конформерах було здійснено маркування позицій фармакофорно значущих компонентів, зокрема ароматичних ядер,  $\pi$ -зв'язків, гідрофобних груп, донорів і акцепторів протону та їх відповідних просторових проєкцій. Надалі комп'ютерний алгоритм здійснював підбір комбінацій фармакофорно значущих компонентів, присутність яких дало змогу з високою точністю розділяти активні молекули щодо пригнічення росту метицилін-резистентного золотистого стафілококу (MRSA) відносно неактивних.

### РОЗДІЛ 3

## СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ТІАЗОЛО[4,5-*b*]ПІРИДИН-2(3*H*)-ОНУ

3.1. Обґрунтування синтезу похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук.

Сполуки, що вміщують піридиновий фрагмент у структурі є в основі багатьох вітамінів, алкалоїдів, дезінфікуючих засобів, барвників, гербіцидів та особливо, великої кількості лікарських засобів та біологічно активних сполук [295, 296]. Широкий спектр застосування зазначених похідних зумовлений можливістю їхньої різноманітної хімічної оптимізації. На теперішній час для даного типу сполук також добре вивчені механізми біотрансформації шляхом реакцій N-метилування, N- та C-окислення [297]. З іншого боку, токсична дія похідних на основі піридину також добре відома, зокрема встановлено гепатотоксичну, нефротоксичну, нейротоксичну, іритативну дію [298, 299].

Особливої уваги у контексті пошуку потенційних біологічно-активних сполук на основі піридину належить їх конденсованим похідним. Так, конденсовані системи з піридиновим фрагментом у структурі зустрічаються в багатьох лікарських засобах з різними механізмами біологічної активності (Рис. 3.1). Окрім того, серед конденсованих похідних на основі піридину було ідентифіковано високоактивні протимікробні [300, 301], протипухлинні [302, 303], антитрипаносомні [304], антиоксидантні [305, 306] та протизапальні агенти [307, 308]. Також, серед конденсованих похідних піридину був ідентифікований афінітет до багатьох біомішеней, зокрема глікогенсинтази-кінази-3 (GSK-3) [309], CDK5 протеїнкінази [310], тирозил-тРНК-синтетази [311], cdc2-подібної кінази 1 (CLK1) [312] і фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [313].

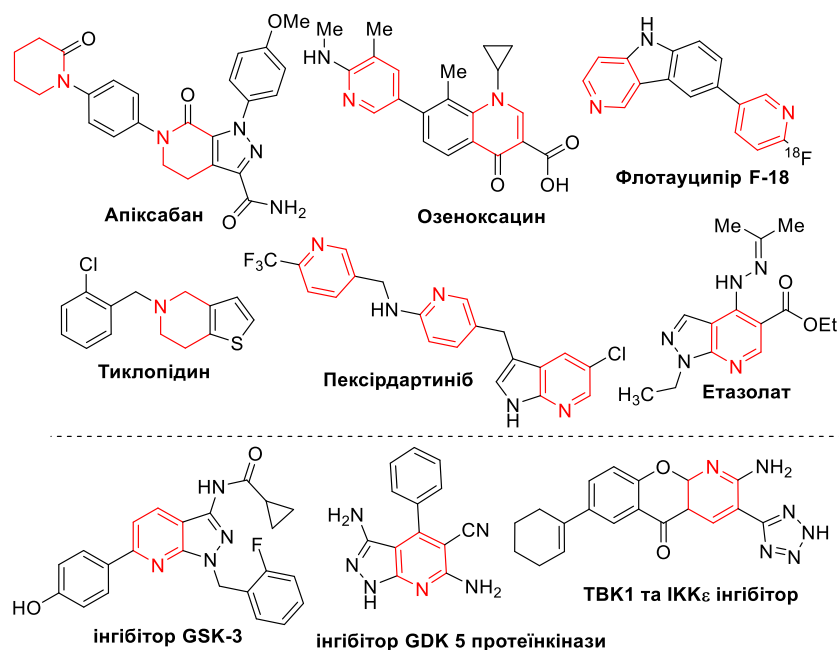


Рис 3.1. Біологічно активні конденсовані похідні з піридиновим фрагментом у структурі.

Одним із ефективних підходів до одержання конденсованих похідних піридину є взаємодія похідних аміноазолів як бінуклеофілів із різними електрофільними реагентами [314-316]. Так, двокомпонентна реакція аміноазолів з  $\alpha,\beta$ -ненасиченими альдегідами та кетонами,  $\alpha$ -кетокислотами, кетоестерами,  $\beta$ -дикарбонільними сполуками призводить до утворення різних класів конденсованих похідних піридину [317, 318] (Рис 3.2.). Слід зазначити, що значний внесок у розвиток даної тематики відіграли професори В. Орлов, В. Чебанов та С. Десенко, роботи яких присвячені вивченню багатоконпонентних гетероциклізацій з керованою селективністю, зокрема реакцій карбонільних сполук з азотовмісними моно-, бі- та полінуклеофілами [319, 320]. Окрім того, згадані карбонільні сполуки з ненасиченим ланцюгом є також ефективними реагентами в інших перичклічних реакціях, особливо в реакціях Дільса-Альдера з різними дієнофілами в побудові поліциклічних гетероциклічних систем [321, 322].



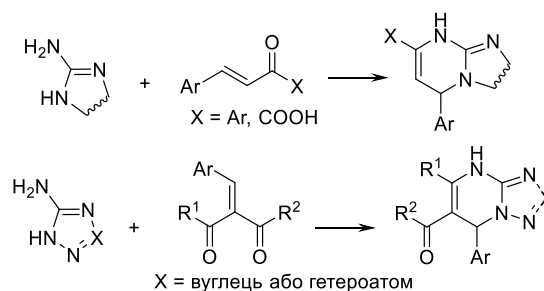


Рис 3.2. Похідні аміноазолів у синтезі конденсованих похідних піридину.

Даний розділ нашої роботи присвячений синтезу та вивченню біологічної активності конденсованих похідних піридину, а саме тіазолопіридинів. Варто відзначити, що приєднання тіазольного циклу до фармакофорного піридинового фрагмента є успішним напрямком у створенні потенційних біологічно активних сполук у рамках гібридно-фармакофорного підходу. Такий підхід дозволяє отримати нові класи органічних сполук з підвищеною активністю та зниженою токсичністю [323]. Так, серед похідних тіазолопіридину були ідентифіковано сполуки з антиоксидантою [324], протизапальною [325], протигрибковою [326], протипухлинною [327] та гербіцидною активністю [328]. Крім того, серед похідних тіазоло[4,5-*b*]піридину було ідентифіковано інгібітори сімейства ErbB-рецепторних тирозинкіназ [329], антагоністи рецепторів, пов'язаних з білками, що зв'язують гуанілові нуклеотиди (mGluR5) [330] та інгібітори фосфодієстерази (ФДЕ) III типу [331].

Ураховуючи значення даного класу сполук відомо багато методів синтезу похідних тіазоло[4,5-*b*]піридину, зокрема в умовах реакції солей 2-амінотіазол-4(5*H*)-імінію з різними 1,3-ССС-діелектрофільними реагентами та взаємодії 4-іміно-2-тіоксо-3-тіазолідинацетату з  $\beta$ -етокси-3-оксобутановою кислотою (рис. 3.3.).

Отже, в даному розділі нами проведено розробку методів синтезу, вивчення фізико-хімічних властивостей та біологічної активності нових тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів та їх функціональних похідних.

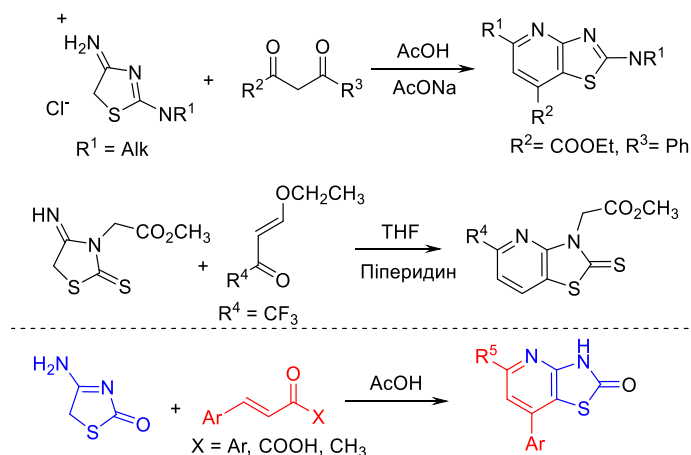


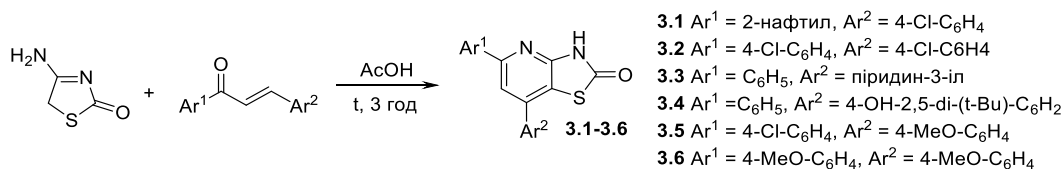
Рис 3.3. Обґрунтування дизайну цільових похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

3.2. Синтез похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону на основі бензиліденацетофенонів, бензиліденацетонів та ариліденпіровиноградних кислот.

### 3.2.1. Синтез та перетворення 5,7-діарил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів.

Синтез цільових 5,7-діарил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів було здійснено взаємодією 4-аміно-5*H*-тiazол-2-ону та відповідних бензиліденацетофенонів (схема 3.1) [332-334]. Вихідний 4-аміно-5*H*-тiazол-2-он одержано шляхом амінолізу 4-тіоксо-1,3-тiazолідин-2-ону за відомою методикою [335].

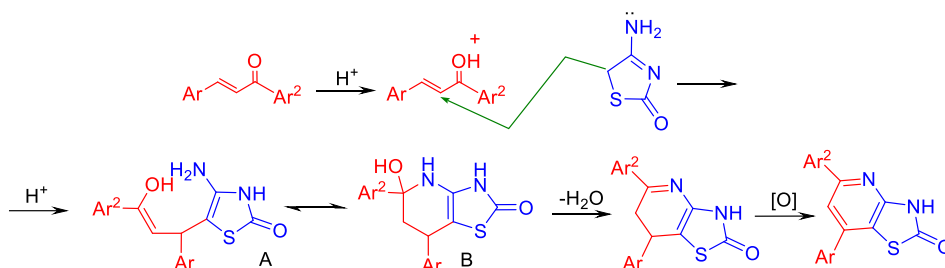
Схема 3.1



При вивченні особливостей взаємодії 4-аміно-5*H*-тiazол-2-ону та бензиліденацетофенонів встановлено, що зазначені реагенти вступають у реакцію [3+3]-циклоприєднання з утворенням похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону. На нашу думку, на першій стадії процесу утворюється продукт приєднання за Міхаелем бензиліденацетофенону до активної метиленової групи

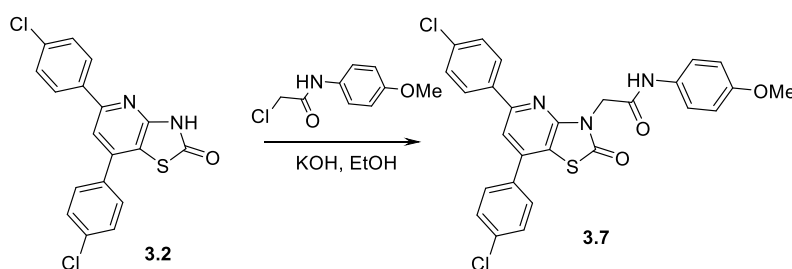
4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону, який в подальшому гетероциклізує до конденсованої біциклічної системи, яка, в свою чергу, в результаті оксидації призводить до утворення цільових 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів **3.1-3.6** (схема 3.2.).

Схема 3.2



З метою диверсифікування похідних 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів у положенні *N*-3 базового гетероциклу здійснено реакцію алкілування хлорацетамідом з утворенням *N*-заміщеного похідного **3.7**. Одержання сполуки **3.7** відбувалось через стадію утворення *in situ* калійної солі 5,7-біс-(4-хлорофеніл)-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону в середовищі етанолу. Як алкілюючий агент нами обрано 2-хлоро-*N*-(4-метоксифеніл)-ацетамід (схема 3.3.).

Схема 3.3



Синтезовані сполуки **3.1-3.7** – дрібнокристалічні порошки білого кольору, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті, нерозчинні у воді, спиртах та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

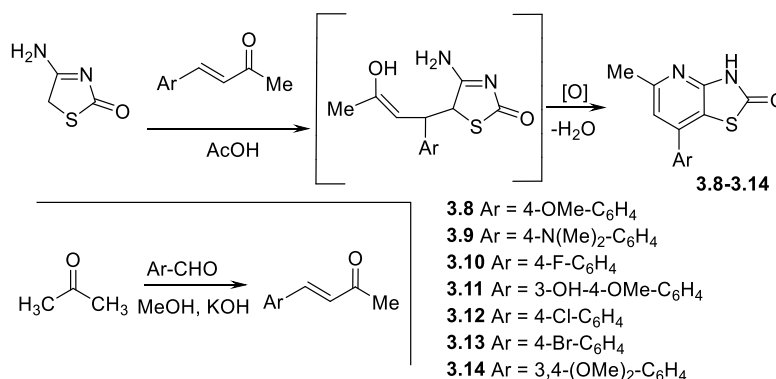
**Фізико-хімічні характеристики синтезованих 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °C	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				C, %	H, %	N, %	C, %	H, %	N, %
<b>3.1</b>	58	165-167	C <sub>22</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> OS	67,95	3,37	7,20	67,80	3,30	7,30
<b>3.2</b>	55	168-170	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> OS	57,92	2,70	7,50	57,80	2,80	7,70
<b>3.3</b>	50	270-272	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> OS	66,87	3,63	13,76	66,90	3,50	13,90
<b>3.4</b>	61	185-187	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	72,19	6,52	6,48	72,10	6,40	6,50
<b>3.5</b>	71	178-180	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	61,87	3,55	7,59	61,70	3,40	7,40
<b>3.6</b>	56	184-186	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	65,92	4,43	7,69	65,80	4,50	7,60
<b>3.7</b>	60	>280	C <sub>27</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	60,45	3,57	7,83	60,57	3,68	7,91

3.2.2. Синтез 5-заміщених 7-феніл-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів.

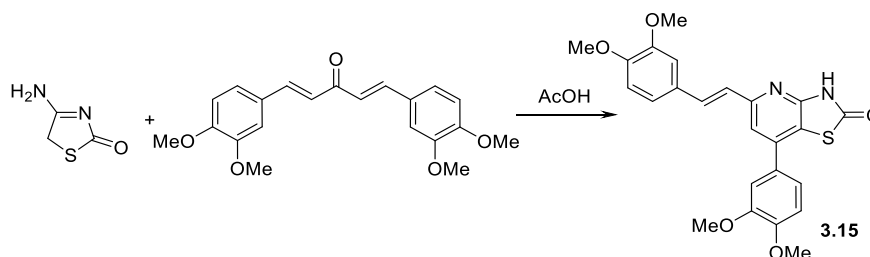
Продовжуючи вивчення похідних тіазолопіридину нами здійснено синтез 5-метил-7-феніл-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів виходячи з 4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону як бінуклеофілу та ряду бензиліденацетонів як електрофільних реагентів (схема 3.4) [336]. Вихідні бензиліденацетони взаємодією ароматичних альдегідів та ацетону у водному розчині гідроксиду калію [337]. Оптимальними умовами для одержання цільових похідних **3.8-3.14** є нагрівання еквімолекулярних кількостей реагентів в середовищі льодяної оцтової кислоти протягом 1 год.

Схема 3.4



Наступним етапом стало отримання 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-[2-(3,4-диметоксифеніл)-вініл]-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону **3.15** взаємодією 4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону та 3,4-диметоксидибензиліденацетоном в середовищі льодяної оцтової кислоти при нагріванні протягом 6 год (схема 3.5) [332].

Схема 3.5



Синтезовані сполуки **3.8-3.15** – дрібнокристалічні порошки жовтого кольору, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті, нерозчинні у воді, спиртах та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

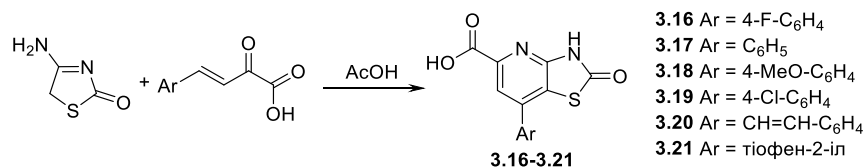
**Фізико-хімічні характеристики синтезованих 5-метил(ариліден)-7-феніл-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>3.8</b>	71	>240	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	61,75	4,44	10,29	61,62	4,34	10,38
<b>3.9</b>	74	>240	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> OS	63,13	5,30	14,72	63,22	5,40	14,68
<b>3.10</b>	67	220-222	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> OS	59,99	3,49	10,76	60,09	3,32	10,68
<b>3.11</b>	65	>240	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	58,32	4,20	9,72	58,45	4,32	9,61
<b>3.12</b>	73	>240	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> OS	56,42	3,28	10,12	56,30	3,34	10,19
<b>3.13</b>	74	>240	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> OS	48,61	2,82	8,72	48,52	2,91	8,59
<b>3.14</b>	68	236-238	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	55,59	4,67	9,27	55,40	4,54	9,19
<b>3.15</b>	55	245-247	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	63,99	4,92	6,22	64,10	5,10	6,30

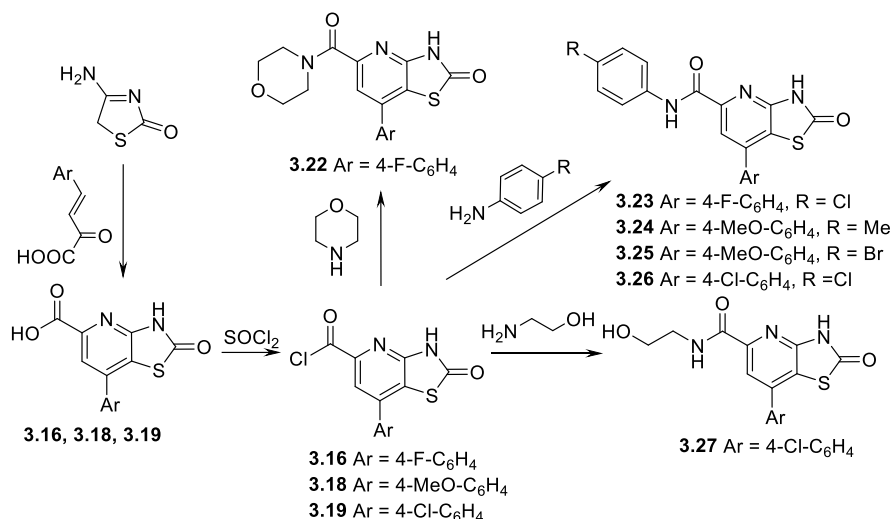
3.2.3. Синтез 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот та їх амідів.

Дотримуючись обраного підходу у проведенні наукових досліджень ми опрацювали ще один підхід до одержання похідних тiazоло[4,5-*b*]пiридин-2(3*H*)-онiв використовуючи арилiденпiрoвинoграднi кислоти [332-334]. Так, застосування арилiденпiрoвинoградних кислот, як C<sub>2</sub>-циклiзуючих агентiв з метиленактивними дикарбонiльними сполуками є перспективним методом синтезу рiзних класiв конденсованих похiдних [338]. Нами встановлено, що при взаємодiї 4-амiно-5*H*-тiazол-2-ону з арилiденпiрoвинoградними кислотами проходить реакцiя [3+3]-циклоконденсацiї з утворенням 2-оксо-7-арил-2,3-дигiдротiazоло[4,5-*b*]пiридин-5-карбoнових кислот **3.16-3.21** (схема 3.6). Сполуки **3.17-3.21** одержано згiдно методики [332].

Схема 3.6



Одним iз варiантiв структурної модифiкацiї похiдних тiazоло[4,5-*b*]пiридин-5-карбoнових кислот є введення амiдного фрагменту, що як пiдтверджено багатьма попереднiми дослідженнями дозволяє одержати сполуки, що мають широкий спектр бiологiчної активностi [339, 340]. Цiльовi амiди тiazоло[4,5-*b*]пiридин-5-карбoнових кислот **3.22-3.27** було одержано взаємодiєю хлорангiдридiв 2-оксо-7-арил-2,3-дигiдротiazоло[4,5-*b*]пiридин-5-карбoнових кислот з 4-замiщеними анiлинами, морфолiном, моноетаноламiном в середовищi безводного дiоксану та в присутностi триетиламiну (схема 3.7).



Синтезовані сполуки **3.16**, **3.22-3.27** – дрібнокристалічні порошки білого кольору, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті нерозчинні у воді та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

**Фізико-хімічні характеристики синтезованих 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот та їх амідів**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>3.16</b>	71	332-334	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	53,79	2,43	9,65	53,60	2,40	9,70
<b>3.22</b>	80	245-247	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	56,82	3,93	11,69	56,70	3,85	11,52
<b>3.23</b>	75	324-326	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	57,08	2,77	10,51	57,20	2,65	10,40
<b>3.24</b>	78	255-257	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	54,82	2,66	10,09	54,91	2,55	10,19
<b>3.25</b>	67	300-302	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	52,64	3,09	9,21	52,80	3,15	9,12
<b>3.26</b>	70	306-308	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	54,82	2,66	10,09	54,91	2,55	10,19
<b>3.27</b>	64	330-332	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	51,51	3,46	12,01	51,41	3,55	12,11

3.3. Спектральні характеристики одержаних сполук.

Структура синтезованих похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону підтверджена елементним аналізом, методами <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопії, мас-

спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом. Спектральні характеристики сполук наведені у таблиці 3.4.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сполук **3.1-3.6** спостерігається характерний субспектр ароматичних протонів в ділянці 6,86-8,18 м.ч., сигнал СН протону піридинового ядра у вигляді синглету при 7,49-8,95 м.ч. та синглет амідного протону при 12.67-12.91 м.ч. Проходження реакції ацилювання при одержанні сполуки **3.7** встановлено за відсутністю у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сигналу амідного протону у положенні N-3 вихідної сполуки і, відповідно, появою синглету в діапазоні 10,40 м.ч. амідного CONH-протону. Сигнал метиленової групи фрагменту N3- $\text{CH}_2\text{CONH}$  проявляється у вигляді синглету у ділянці 4,91 м.ч. У спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР синтезованих сполук **3.1-3.6** сигнал карбонільної групи (C=O) знаходиться в ділянці 164,4-169,8 м.ч. Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР-спектру сполуки **3.5** представлено на рис. 3.4.

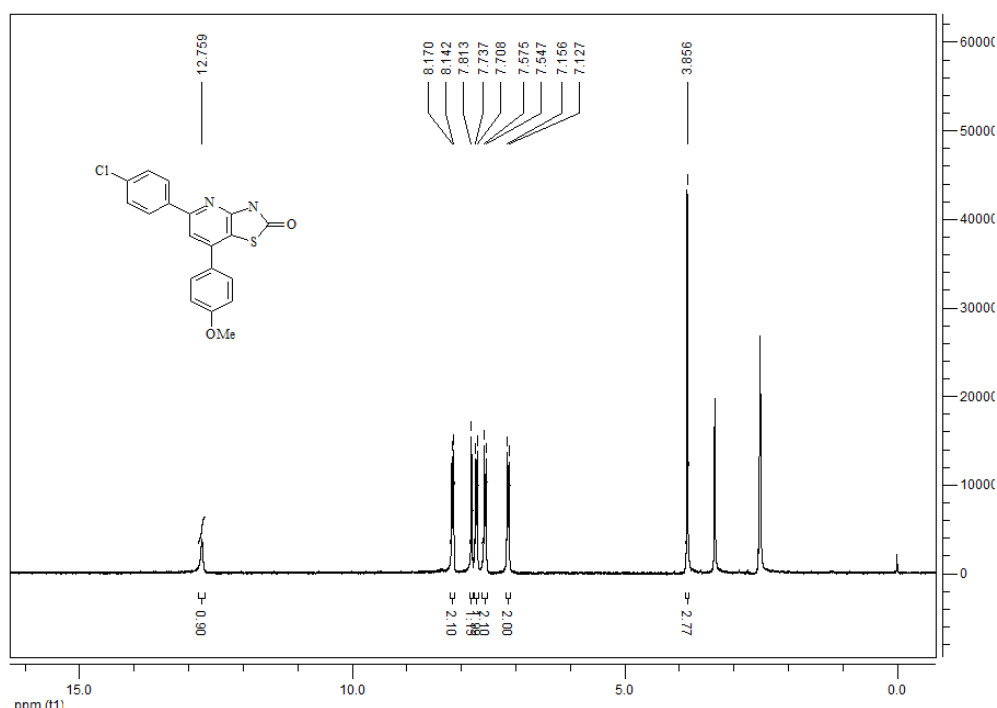


Рис 3.4. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР 5-(4-хлорофеніл)-7-(4-метоксифеніл)-3H-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону **3.5**.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР похідних 5-метил-7-феніл-3H-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону **3.8-3.14** сигнал метильної групи проявляється у вигляді синглету в ділянці



2,38-2,49 м.ч., СН протон піридинового фрагменту характерний синглетом у ділянці 7,09-7,21 м.ч. Сигнал амідного протону зазначених вище сполук проявляються у вигляді синглету в області від 12,48 до 12,54 м.ч. В спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки **3.15** вініленова група  $-\text{CH}=\text{CH}-$  утворює дублет ( $J \sim 16,0$  Гц) та мультиплет в області 7,23-7,29 м.ч. через накладання з сигналами ароматичних протонів.

Приклад  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектрів 7-(4-диметиламінофеніл)-5-метил-3H-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону **3.9** представлено на рис. 3.5.

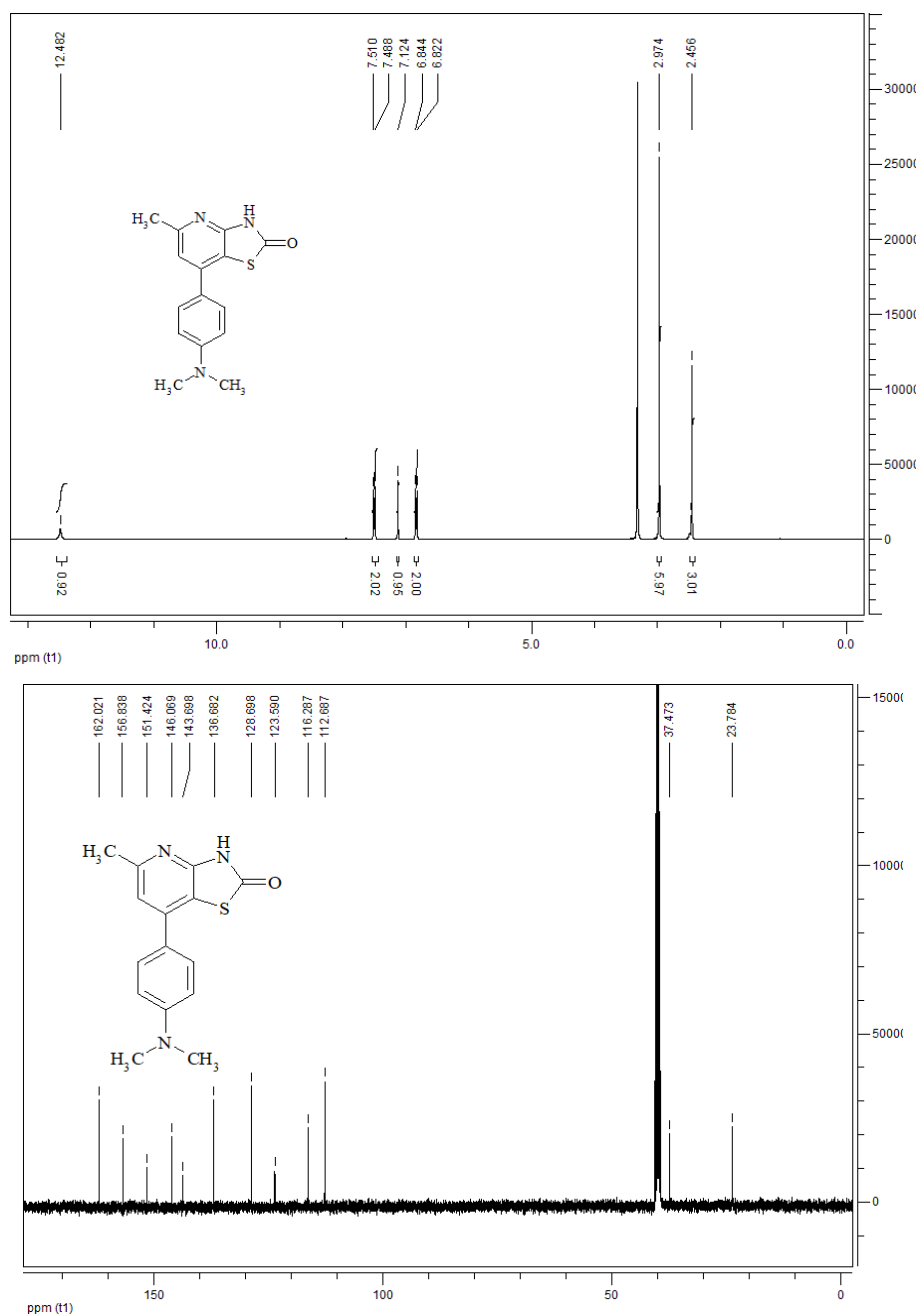


Рис. 3.5. Спектри  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР сполуки **3.9**.

Перебіг реакції одержання амідів 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот **3.23-3.27** у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР встановлено за відсутністю сигналу карбоксильної групи вихідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот **3.16**, **3.18**, **3.19** і, відповідно, появою сигналу амідного CONH-протону у вигляді синглету при 8,47-10,44 м.ч. Сигнал амідного протону у положенні N-3 тіазольного ядра амідів **3.22-3.27** проявляється у вигляді синглету при 12,45-13,20 м.ч., а ароматичні фрагменти утворюють типовий субспектр в ділянці 7,14-7,86 м.ч. У сполуці **3.21** сигнали аліфатичних протонів морфолінамідного фрагменту проявляються у вигляді двох мультиплетів при 3,48-3,56 та 3,61-3,66 м.ч., а аліфатичні протони моноетаноламідного фрагменту у сполуці **3.27** утворюють два широкі синглети при 2,72 та 2,87 м.ч.

Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР спектру сполуки **3.23** представлено на рис. 3.6.

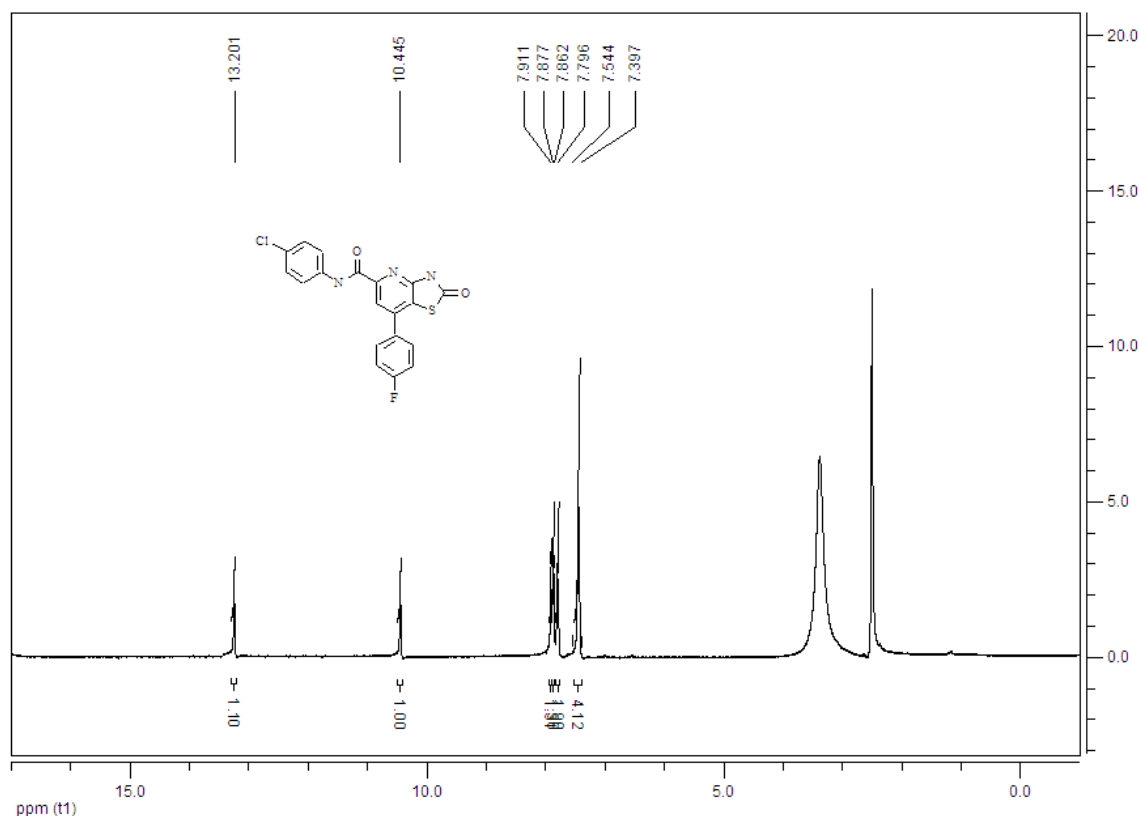


Рис. 3.6. Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки **3.23**.

**Спектри  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону на основі бензиліденацетофенонів,  
бензиліденацетонів та ариліденпіровиноградних кислот**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)
3.1	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,82-7,84 (м, 3H, аром.), 8,12-8,18 (м, 6H, аром.), 8,29 (д, 1H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 8,72 (с, 1H, аром.), 8,95 (с, 1H, CH), 12,88 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 115,2, 118,1, 123,2, 124,5, 127,4, 128,2, 128,9, 129,4, 129,8, 130,0, 130,1, 131,0, 131,1, 132,8, 134,2, 135,2, 135,6, 142,9, 157,8, 169,8
3.2	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,56 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,67 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,78 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,87 (с, 1H, CH), 8,18 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 12,91 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 114,9, 116,2, 120,0, 126,2, 128,9, 129,7, 134,5, 135,8, 137,1, 142,9, 151,3, 152,7, 160,9, 168,8
3.3	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 6,86 (т, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,09-7,20 (м, 5H, аром., пірид.), 7,60 (д, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,79 (д, 1H, $J = 7,9$ Гц, пірид.), 8,47 (с, 1H, CH), 12,70 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 114,5, 118,2, 123,8, 125,5, 127,8, 128,5, 133,0, 135,7, 137,9, 145,5, 146,6, 148,0, 149,5, 158,0, 166,1
3.4	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,42 (с, 18H, $\text{CH}_3$ ), 7,44-7,49 (м, 6H, аром., CH), 7,76 (с, 1H, OH), 8,09 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 12,71 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 30,6, 35,2, 114,4, 116,0, 120,2, 124,6, 127,1, 128,1, 129,2, 129,5, 138,6, 140,2, 152,8, 155,8, 159,9, 164,4
3.5	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,85 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,14 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,56 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,72 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,81 (с, 1H, CH), 8,15 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 12,75 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 55,8, 114,6, 115,6, 115,7, 128,8, 129,1, 129,2, 129,5, 134,4, 137,3, 143,8, 151,2, 152,6, 160,8, 169,0
3.6	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,83 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,84 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,05 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,13 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,69-7,72 (м, 3H, аром., CH), 8,08 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 12,67 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 55,5, 114,5, 117,0, 120,1, 127,3, 128,7, 129,3, 134,3, 135,6, 137,0, 142,6, 152,2, 152,9, 160,1, 168,2
3.7	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,61 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,91 (с, 2H, $\text{CH}_2$ ), 6,70 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,33 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,43 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,62 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,80 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,91 (с, 1H, CH), 8,21 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 10,40 (с, 1H, NH)

Продовження табл. 3.5.

3.8	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,47 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,82 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 7,10 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,15 (с, 1H, CH), 7,59 (д, 2H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 12,55 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 23,8, 55,8, 113,4, 115,1, 117,1, 129,2, 131,8, 138,6, 143,2, 150,4, 153,4, 160,6
3.9	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,45 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,32 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 6,83 (д, 2H, $J = 8,8$ Гц, аром.), 7,12 (с, 1H, CH), 7,50 (д, 2H, $J = 8,8$ Гц, аром.), 12,48 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 23,7, 37,4, 112,6, 116,2, 123,5, 128,6, 136,6, 143,6, 146,0, 151,4, 156,8, 162,0
3.10	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,48 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,18 (с, 1H, CH), 7,38 (т, 2H, $J = 8,8$ Гц, аром.), 7,68 (дд, 2H, $J = 5,3, 8,8$ Гц, аром.), 12,55 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 20,0, 110,7, 116,8, 124,3, 130,2, 142,4 (д, $J = 6,0$ Гц, C–F), 144,8, 157,5 (д, $J = 30,0$ Гц, C–F), 162,9, 165,2, 166,5 (д, $J = 220,0$ Гц, C–F), 169,1
3.11	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,38 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,81 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 7,03-7,05 (м, 3H, аром.), 7,09 (с, 1H, CH), 9,36 (с, 1H, OH), 12,49 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 21,1, 56,1, 113,0, 119,0, 122,5, 129,5, 130,8, 138,4, 143,4, 147,4, 149,2, 153,6, 165,6, 169,3
3.12	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,49 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,20 (с, 1H, CH), 7,61-7,68 (м, 4H, аром.), 12,64 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 23,8, 117,4, 120,1, 129,6, 129,7, 134,7, 135,8, 142,1, 156,6, 160,1, 163,4
3.13	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,49 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,21 (с, 1H, CH), 7,59 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,76 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 12,64 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 23,8, 115,4, 117,3, 123,4, 129,9, 132,7, 136,2, 142,2, 150,9, 165,2, 169,0
3.14	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,40 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,82 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3,83 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 7,13 (с, 1H, CH), 7,19-7,21 (м, 3H, аром.), 12,54 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 27,6, 54,5, 56,0, 110,8, 112,0, 123,4, 125,6, 127,5, 143,9, 149,4, 151,4, 155,0, 158,6, 162,7, 164,9
3.15	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,79 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,84 (с, 6H, $2^*\text{CH}_3$ ), 3,86 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 6,98 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,14-7,17 (м, 3H, аром.), 7,23-7,29 (м, 3H, CH, аром.), 7,45 (с, 1H, CH), 7,59 (д, 1H, $J = 16,0$ Hz, CH), 12,59 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 54,3, 55,5, 55,6, 55,8, 114,6, 115,1, 116,8, 120,7, 122,1, 122,5, 124,5, 124,8, 129,1, 131,3, 132,7, 136,3, 140,4, 147,1, 147,7, 148,3, 148,9, 152,7, 160,5, 169,0

Закінчення табл. 3.5.

3.16	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,43 (т, 2Н, $J = 7,2$ Гц, аром.), 7,76 (дд, 2Н, $J = 4,4, 6,4$ Гц, аром.), 7,88 (с, 1Н, СН), 13,15 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 116,8, 117,0, 119,3 (д, $J = 5,0$ Гц, C-F), 121,6, 130,3, 130,4, 132,8, 143,7 (д, $J = 30,0$ Гц, C-F), 146,0, 156,5 (д, $J = 250,0$ Гц, C-F), 166,2, 168,5
3.22	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,48-3,56 (м, 2Н, морфолін), 3,61-3,66 (м, 2Н, морфолін), 7,36-7,48 (м, 3Н, СН, аром.), 7,74 (дд, 2Н, $J = 5,6, 8,4$ Гц, аром.), 12,92 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ NMR: $\delta$ 44,9, 45,5, 66,7, 67,2, 116,8, 117,0, 119,3 (д, $J = 5,0$ Гц, C-F), 121,4, 130,3, 130,4, 132,9, 142,6, 145,5 (д, $J = 30,0$ Гц, C-F), 151,4, 163,2 (д, $J = 186,0$ Гц, C-F), 166,2, 168,7
3.23	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,39-7,54 (м, 4Н, аром.), 7,79 (д, 2Н, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,86 (д, 2Н, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,91 (с, 1Н, СН), 10,44 (с, 1Н, NH), 13,20 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 116,8, 117,0, 119,3 (д, $J = 5,0$ Гц, C-F), 121,6, 125,2, 130,3, 130,4, 132,7, 137,0, 140,4, 145,7 (д, $J = 30,0$ Гц, C-F), 151,3, 155,7, 163,3 (д, $J = 198,0$ Гц, C-F), 166,2, 168,5
3.25	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,28 (с, 3Н, $\text{CH}_3$ ), 3,84 (с, 3Н, $\text{OCH}_3$ ), 7,14-7,19 (м, 4Н, аром.), 7,67-7,69 (м, 4Н, аром.), 7,90 (с, 1Н, СН), 10,12 (с, 1Н, NH), 12,95 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 21,0, 55,9, 115,4, 116,4, 120,2, 128,5, 129,5, 129,7, 133,6, 136,1, 143,9, 147,8, 150,3, 161,0, 162,5, 168,8
3.25	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,83 (с, 3Н, $\text{OCH}_3$ ), 7,14 (д, 2Н, $J = 8,8$ Гц, аром.), 7,55 (д, 2Н, $J = 8,9$ Гц, аром.), 7,68 (д, 2Н, $J = 8,8$ Гц, аром.), 7,79 (д, 2Н, $J = 8,9$ Гц, аром.), 7,89 (с, 1Н, СН), 10,39 (с, 1Н, NH), 12,95 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ NMR: $\delta$ 55,9, 115,4, 116,2, 116,5, 120,5, 122,4, 128,5, 129,5, 132,1, 143,8, 147,5, 150,5, 161,0, 163,1, 168,8
3.26	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,42 (д, 2Н, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,65 (д, 2Н, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,73 (д, 2Н, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,84 (д, 2Н, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,90 (с, 1Н, СН), 10,38 (с, 1Н, NH), 13,03 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 116,9, 121,1, 122,1, 128,2, 129,2, 130,0, 135,2, 135,3, 137,6, 142,9, 147,7, 150,4, 162,9, 168,6
3.27	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,72 (шс, 2Н, $\text{CH}_2$ ), 2,87 (шс, 2Н, $\text{CH}_2$ ), 4,87 (с, 1Н, OH), 7,59 (д, 2Н, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,68 (д, 2Н, $J = 8,6$ Гц, аром.), 7,94 (с, 1Н, СН), 8,47 (с, 1Н, NH), 12,45 (с, 1Н, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 47,1, 58,4, 119,1, 121,6, 129,8, 129,9, 135,2, 135,3, 142,3, 145,7, 151,4, 166,2, 168,4

Структурні особливості (4-бромобеніл)аміду 7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти **3.25** були підтверджені рентгеноструктурним аналізом. Структура сполуки **3.25** представлена на рис. 3.7.

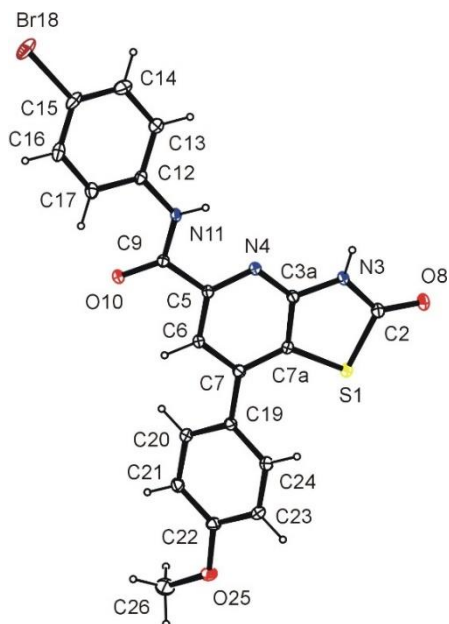


Рис. 3.7. ORTEP вигляд сполуки **3.25** зображено еліпсоїдами з 30-відсотковим відхиленням від рівноважного положення. Атоми Гідрогену показано як сфери довільного радіусу.

Структурні дослідження, проведені для сполуки **3.25**, показали, що 2-оксо-2,3-дигідро[4,5-*b*]піридиновий фрагмент, центральний фрагмент молекули, є майже плоским (r.m.s. (середньоквадратичне відхилення) = 0,0244 Å). Центральна площина утворює з двома фенільними циклами (C12 – C17) і (C19 – C24), що належать до *N*-(4-бромобеніл)-5-карбоксамідного та 7-(4-метоксифенільного) залишків дигедральні кути, які становлять 18,73(7) і 41,99(5)°, відповідно.

Планарна система, що містить атоми C9, O10 і N11, що належать до *N*-(4-бромобеніл)-5-карбоксамідного молекулярного фрагменту, утворює із середньою площиною 2-оксо-2,3-дигідро[4,5-*b*]піридинової системи дигедральний кут із значенням 9,6(3)°. Просторове розташування згаданої

системи атомів також визначається торсійним кутом N4–C5–C9–N11 із значенням  $7,7(2)^\circ$ , що свідчить про синперипланарність зв'язків C4–C5 та C9–N11.

У кристалі молекули зв'язані водневими зв'язками N3–H3 $\cdots$ O10<sup>i</sup> та N11–H11 $\cdots$ O8<sup>ii</sup> у шари, паралельні площині *bc*. Товщина шару подібна до значення параметру *a*. Зв'язок між молекулами, розташованими всередині шару, посилюється слабкими водневими зв'язками C13–H13 $\cdots$ O8<sup>ii</sup> та C21–H21 $\cdots$ S1<sup>iii</sup> (табл. 3.5, рис. 3.8).

Таблиця 3.5

### Геометрія водневих зв'язків (Å, °) для структури 3.25

Водневі зв'язки (між частинками)	Донор-Н (Å)	Н $\cdots$ Акцептор (Å)	Донор $\cdots$ Акцептор (Å)	Донор-Н $\cdots$ Акцептор (°)
C17–H17 $\cdots$ O10	0,95	2,34	2,857(3)	113
N3–H3 $\cdots$ O10 <sup>i</sup>	0,82(3)	2,00(3)	2,776(2)	159(3)
N11–H11 $\cdots$ O8 <sup>ii</sup>	0,79(3)	2,26(3)	2,971(2)	151(2)
C13–H13 $\cdots$ O8 <sup>ii</sup>	0,95	2,53	3,167(3)	125
C21–H21 $\cdots$ S1 <sup>iii</sup>	0,95	2,87	3,706(2)	148

Коди симетрії: (i)  $x, 1.5-y, -0.5+z$ ; (ii)  $1-x, -0.5+y, 0.5-z$ ; (iii)  $x, 2.5-y, 0.5+z$ ;

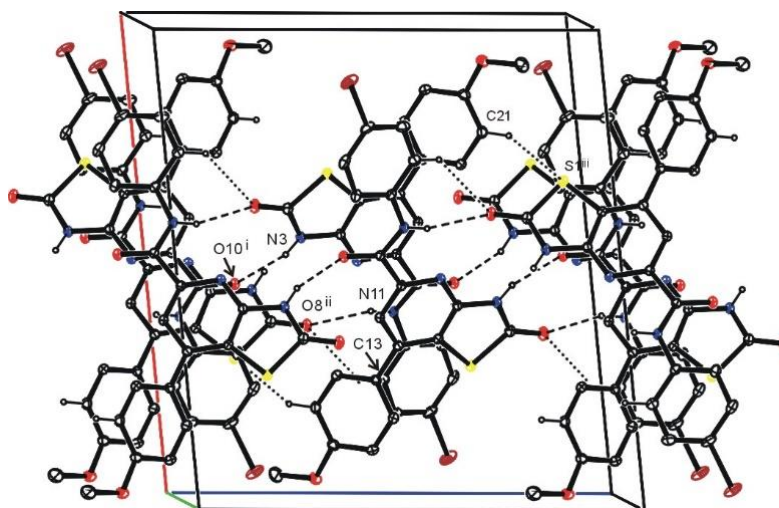


Рис. 3.8. Водневі зв'язки у кристалічній структурі сполуки 3.25. Коди симетрії зображені у таблиці 3.5. Атоми водню, які не беруть участь у водневих зв'язках не відображено.

### 3.4. Біологічна активність похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

3.4.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI.

Протипухлинна активність синтезованих похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону вивчалась у рамках міжнародної наукової програми DTP NCI (*Developmental Therapeutic Program*) Національного інституту раку (Бетезда, Меріленд, США) [233-236]. Для сполук **3.2**, **3.4-3.7**, **3.9**, **3.15-3.17**, **3.19-3.26** було проведено первинний скринінг в одній концентрації ( $10^{-5}$  M) на панелі близько 60 ліній ракових клітин (табл. 3.6, додатки В.1-В.17) [332, 339, 341, 342].

Таблиця 3.6

#### Сумарні результати прескринінгу протипухлинної активності похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону на 60 лініях клітин (концентрація $10^{-5}$ M)

Сполука	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>3.2</b>	82,68	38,22÷109,15	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 40,84 UO-31, рак нирок / 49,91 T-47D, рак молочної залози / 38,22
<b>3.4</b>	78,74	28,10÷114,68	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 48,34 T-47D, рак молочної залози / 28,10
<b>3.5</b>	89,65	27,10÷108,56	A498, рак нирок / 27,10 UO-31, рак нирок / 48,80
<b>3.6</b>	88,57	-1,47÷115,33	A498, рак нирок / -1,47
<b>3.7**</b>	97,68	63,30÷128,68	SR, лейкемія / 63,30
<b>3.9</b>	60,80	4,12÷98,82	HL-60(TB), лейкемія / 14,34 K-562, лейкемія / 24,47 HCT-15, рак прямої кишки / 29,37 MDA-MB-435, меланома / 4,12 MCF7, рак молочної залози / 28,40



## Продовження табл 3.6

<b>3.15</b>	90,49	28,94÷133,13	A498, рак нирок / 28,94
<b>3.16**</b>	100,81	62,31÷127,64	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 62,31
<b>3.17**</b>	100,42	76,76÷117,61	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 76,76
<b>3.19**</b>	100,04	78,84÷119,54	T-47D, рак молочної залози / 78,84
<b>3.20**</b>	100,67	76,77÷150,85	HL-60 (ТВ), лейкемія / 76,77
<b>3.21**</b>	97,57	73,76÷114,44	A498, рак нирок / 73,76
<b>3.22**</b>	96,72	75,80÷115,70	PC-3, рак простати / 75,80
<b>3.23</b>	7,71	-86,10÷72,22	HL-60(ТВ), лейкемія / -30,55 HOP-92, недрібноклітинний рак легень / -24,25 SF-539, рак ЦНС / -4,01 SNB-75, рак ЦНС / -5,08 SK-MEL-5, меланома / -86,10 UACC-257, меланома / -8,82 OVCAR-4, рак яйників / -0,62 SAKI-1, рак нирок / -12,74 BT-549, рак молочної залози / -13,14 MDA-MB-468, рак молочної залози / -8,30
<b>3.24</b>	68,26	9,83÷102,28	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 24,25 SK-MEL-2, меланома / 29,18 SK-MEL-5, меланома / 37,21 UACC-62, меланома / 31,25 A498, рак нирок / 9,83
<b>3.25</b>	36,54	-9,13÷84,94	RPMI-8226, лейкемія / 14,18 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -9,13 SK-MEL-2, меланома / -5,01 SK-MEL-5, меланома / 8,56 UACC-62, меланома / 8,05 A498, рак нирок / -2,87 T-47D, рак молочної залози / -0,89

## Закінчення табл. 3.6

3.26	-3,85	-53,72÷32,04	HL-60(TB), лейкемія / -53,72 K-562, лейкемія / -12,81 MOLT-4, лейкемія / -24,22 RPMI-8226, лейкемія / -6,18 HOP-62, недрібноклітинний рак легень / -19,01 NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / -5,14 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -26,29 COLO 205, рак прямої кишки / -52,11 HT29, рак прямої кишки / -24,05 SF-29, рак ЦНС / -12,48 MALME-3M, меланома / -13,80 SK-MEL-2, меланома / -29,35 SK-MEL-5, меланома / -19,62 UACC-257, меланома / -24,94 UACC-62, меланома / -14,73 SK-OV-3, рак яйників / -24,27 A498, рак нирок / -43,80 SN12C, рак нирок / -9,70 UO-31, рак нирок / -5,54 PC-3, рак простати / -13,47 MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -30,91 HS 578T, рак молочної залози / -14,42 T-47D, рак молочної залози / -22,78 MDA-MB-468, рак молочної залози / -3,42
------	-------	--------------	---

\* Для окремих ліній наведені дані з GP% ≤ 50%.

\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результат мітотичної активності однієї найбільш чутливої лінії.

Результати *in vitro* прескринінгу протипухлинної активності похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону дозволили встановити їхню помірну активність на досліджених клітинних лініях, а також деякі закономірності селективної дії. Так, сполука **3.4** продемонструвала помірну цитотоксичну дію до деяких окремих клітинних ліній, серед яких була лінія клітин раку молочної залози T-47D (GP = 28,10%), сполуки **3.5** та **3.6** та **3.5** були активними щодо лінії клітин

раку нирки A498 (GP = 27,10, -1,41 та 28,94 %, відповідно). *N*-заміщене похідне **3.7** в основному не проявило помітного протипухлинного ефекту, при середніх показниках пригнічення росту для панелі з 60 клітинних ліній на рівні 63,30÷128,68 %. Для похідних 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот також встановлений слабкий цитостатичний ефект *in vitro* із середнім значенням рівнів інгібування росту клітин ( $GP_{\text{mean}}$ ) в межах 88,57÷100,81%. З іншого сторони, даний клас сполук має хорошу здатність до хімічної модифікації, зокрема в положенні 5 тіазоло[4,5-*b*]піридинового ядра з утворенням відповідних амідів карбонових кислот, що зумовлює значне підвищення протипухлинної дії. Так, аміді 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот **3.23** та **3.26** проявили найкращу цитотоксичну дію із середніми значеннями пригнічення росту ( $GP_{\text{mean}}$ ) 7,71 та -3,85 %, відповідно. Сполука **3.23** продемонструвала високу цитотоксичну дію щодо клітин лінії меланому SK-MEL-5 (GP = -86,10%), лейкемії HL-60(TB) (GP = -30,55%) та лінії недрібноклітинного раку легень HOP-92 (GP = -24,92%). Сполука **3.26** проявила активність відносно лінії лейкемії HL-60(TB) (GP = -53,72%), раку товстої кишки COLO 205 (GP = -52,11%) і недрібноклітинного раку легень лінії NCI-H522 (GP = -26,29%).

На основі результатів прескринінгу сполуки-хіти **3.23** та **3.26** було відібрано для поглибленого вивчення в градієнті концентрацій згідно стандартної процедури *DTP NCI*. Результати дослідження наведені в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

**Особливості протипухлинної активності сполук 3.23 та 3.26 щодо окремих клітинних ліній**

Захворювання	Клітинна лінія	GI <sub>50</sub> , μM		TGI, μM		LC <sub>50</sub> , μM	
		<b>3.23</b>	<b>3.26</b>	<b>3.23</b>	<b>3.26</b>	<b>3.23</b>	<b>3.26</b>
Лейкемія	CCRF-CEM	0,65	2,50	9,90	40,3	81,9	>100,0
	HL-60(TB)	-	1,27	-	6,68	-	>100,0
	K-562	0,58	1,27	10,9	>100,0	81,5	>100,0
	MOLT-4	0,72	2,52	4,02	11,8	32,3	>100,0
	RPMI-8226	0,39	1,21	2,22	14,2	33,1	>100,0
	SR	0,67	3,63	10,5	>100,0	56,2	>100,0

Продовження табл. 3.7

	<b>MG_MID</b>	<b>0,60</b>	<b>2,06</b>	<b>7,50</b>	<b>45,49</b>	<b>57,0</b>	<b>&gt;100</b>
Недрібноклітинний рак легень	A549/ATCC	2,45	2,49	10,1	12,7	69,2	>100,0
	EKVX	1,64	1,63	6,11	11,7	>100,0	>100,0
	HOP-62	2,04	2,58	5,69	8,85	30,5	80,6
	HOP-92	0,20	0,52	0,94	3,94	4,64	43,7
	NCI-H266	1,11	2,26	3,93	9,18	22,8	>100,0
	NCI-H23	1,19	1,24	5,79	6,85	55,0	>100,0
	NCI-H322M	2,11	2,81	6,12	9,72	>100,0	>100,0
	NCI-H460	1,73	2,19	4,29	12,6	16,7	>100,0
	NCI-H522	0,47	0,40	5,42	3,12	>100,0	73,9
	<b>MG_MID</b>	<b>1,43</b>	<b>1,79</b>	<b>5,37</b>	<b>8,74</b>	<b>54,42</b>	<b>88,68</b>
Рак товстої кишки	COLO 205	1,76	1,63	3,82	3,54	8,26	7,71
	HCC-2998	2,25	2,17	10,9	14,5	51,2	>100,0
	HCT-116	1,43	2,40	2,96	10,8	6,14	>100,0
	HCT-15	1,73	1,27	10,1	9,54	44,1	82,5
	HT29	3,02	2,13	11,4	6,29	59,7	>100,0
	KM12	1,81	1,58	6,04	10,3	48,4	61,8
	SW-620	3,01	2,90	16,2	15,2	>100,0	>100,0
	<b>MG_MID</b>	<b>2,14</b>	<b>2,01</b>	<b>8,77</b>	<b>10,02</b>	<b>45,40</b>	<b>78,85</b>
Рак ЦНС	SF-268	2,59	2,56	17,2	22,3	>100,0	>100,0
	SF-295	1,10	1,56	3,80	4,37	18,5	>100,0
	SF-539	2,07	2,43	5,71	11,6	28,7	88,7
	SNB-19	2,73	3,64	16,2	>100,0	93,2	>100,0
	SNB-75	2,02	1,70	5,33	8,03	36,0	>100,0
	U251	1,50	1,88	4,71	11,8	23,5	65,3
	<b>MG_MID</b>	<b>2,00</b>	<b>2,29</b>	<b>8,82</b>	<b>26,35</b>	<b>49,98</b>	<b>92,33</b>
Меланома	LOX IMVI	1,68	2,88	4,43	10,6	17,8	46,5
	MALME-3M	1,70	2,31	6,80	6,25	>100,0	33,0
	M14	1,88	2,75	5,13	10,3	68,7	84,0
	MDA-MB-435	3,01	2,70	17,4	11,2	>100,0	>100,0
	SK-MEL-2	1,59	1,18	3,93	3,99	9,71	44,5
	SK-MEL-28	1,39	1,57	10,1	17,8	>100,0	>100,0
	SK-MEL-5	0,49	0,68	2,13	2,99	7,10	16,6
	UACC-257	1,11	1,19	5,06	4,69	>100,0	>100,0
	UACC-62	0,36	1,04	2,32	4,91	21,9	34,5
	<b>MG_MID</b>	<b>1,46</b>	<b>1,81</b>	<b>6,36</b>	<b>8,08</b>	<b>58,35</b>	<b>62,12</b>

Закінчення табл. 3.7

Рак яйників	IGROV1	1,78	2,83	7,06	28,9	69,2	>100,0
	OVCAR-3	0,94	2,32	11,4	7,45	58,0	49,2
	OVCAR-4	1,99	2,02	9,12	9,98	>100,0	>100,0
	OVCAR-5	2,34	3,41	7,90	29,3	>100,0	>100,0
	OVCAR-8	1,72	2,04	4,93	12,8	44,3	>100,0
	NCI/ADR-RES	2,32	1,98	10,9	7,61	>100,0	>100,0
	SK-OV-3	1,57	2,08	5,41	7,47	24,2	>100,0
	<b>MG_MID</b>	<b>1,80</b>	<b>2,38</b>	<b>8,10</b>	<b>14,78</b>	<b>70,81</b>	<b>92,74</b>
Рак нирок	786-0	1,35	2,64	2,85	20,6	6,01	>100,0
	A498	0,46	0,47	3,35	3,42	41,2	>100,0
	ACHN	1,69	2,27	4,02	8,89	9,52	37,7
	CAKI-1	2,15	1,95	4,99	13,1	14,4	>100,0
	RXF 393	1,70	2,77	3,99	7,42	9,41	84,8
	SN12C	1,99	2,12	7,93	20,1	>100,0	>100,0
	TK-10	1,88	-	4,94	-	19,5	-
	UO-31	1,61	1,59	3,89	5,36	9,37	24,5
<b>MG_MID</b>	<b>1,60</b>	<b>1,97</b>	<b>4,49</b>	<b>11,27</b>	<b>26,17</b>	<b>78,14</b>	
Рак простати	PC-3	0,65	1,66	13,3	12,2	>100,0	>100,0
	DU-145	3,70	3,31	28,9	26,5	>100,0	>100,0
<b>MG_MID</b>	<b>2,17</b>	<b>2,48</b>	<b>21,1</b>	<b>19,3</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>	
Рак молочної залози	MCF7	1,31	1,78	11,3	9,26	>100,0	>100,0
	MDA-MB-231/ATCC	1,77	1,66	4,78	3,56	20,0	7,62
	HS 578T	2,13	3,04	13,1	21,5	>100,0	>100,0
	BT-549	1,73	2,08	6,89	6,88	73,0	60,3
	BT-549	0,73	0,58	5,25	5,46	>100,0	>100,0
	T-47D	0,68	1,73	4,97	6,62	>100,0	>100,0
	MDA-MB-468						
<b>MG_MID</b>	<b>1,39</b>	<b>1,81</b>	<b>7,71</b>	<b>8,88</b>	<b>82,16</b>	<b>77,98</b>	
<b>MG_MID</b>	<b>1,57</b>	<b>2,01</b>	<b>7,31</b>	<b>15,71</b>	<b>55,41</b>	<b>83,51</b>	

Сполуки **3.23** та **3.26** продемонстрували широкий спектр пригнічення росту практично всіх тестованих ліній пухлинних клітин із середніми значеннями  $GI_{50}/TGI$  1,57/7,31 мкМ (**3.23**) та 2,01/15,71 мкМ (**3.26**), відповідно. Індекс селективності (SI) сполук, обчислений як відношення MG-MID (мкМ) сполук до індивідуального MG-MID для кожної субпанелі (мкМ) розглядається як міра селективності сполук. Так, активні сполуки **3.23** і **3.26** не продемонстрували селективності дії як на рівнях  $GI_{50}$ , так і на TGI (показники

селективності 2,17-7,85/0,54-7,77 (**3.23**) і 2,95-5,00/2,87-5,25 (**3.26**), відповідно) (табл. 3.8). Проте згадані похідні **3.23** і **3.26** продемонстрували певний рівень селективності щодо окремих ліній клітин на рівні TGI. Так, показники селективності сполуки **3.23** склали 3,15-7,77 для RPMI-8226 (лейкемія), HOP-92 (NCS рак легень), SK-MEL-2 та UACC-62 (меланома). У той же час сполука **3.26** на рівні TGI проявила помірну селективність щодо ліній недрібноклітинного раку легень NCI-H522 (SI = 5,03), HOP-92 (SI = 3,98), раку товстої кишки COLO 205 (SI = 4,43), раку ЦНС SF-295 (SI = 3,59), ліній меланоми SK-MEL-2 (SI = 3,93) та SK-MEL-5 (SI = 5,25) і раку нирки A498 (SI = 4,59).

Таблиця 3.8

**Показники селективності сполук 3.23 та 3.26 щодо окремих ліній пухлинних клітин на рівнях GI<sub>50</sub> та TGI (SI (GI<sub>50</sub>) ≥ 2.00).**

Сполука	Захворювання/Клітинна лінія	SI (GI <sub>50</sub> )	SI (TGI)
<b>3.23</b>	Лейкемія/CCRF-CEM	2,41	0,73
	Лейкемія/K-562	2,70	0,67
	Лейкемія/RPMI-8226	2,18	1,82
	Лейкемія/SR	4,02	3,29
	Лейкемія/HOP-92	2,34	0,69
	Недрібноклітинний рак легень/NCI-H522	7,85	7,77
	Меланома/SK-MEL-5	3,20	3,43
	Меланома/UACC-62	4,36	3,15
	Рак нирок/A498	3,41	2,18
	Рак простати/PC-3	2,41	0,54
	Рак молочної залози /T-47D	2,15	1,39
	Рак молочної залози/MDA-MB-468	2,30	1,47
	<b>3.26</b>	Недрібноклітинний рак легень/HOP-92	3,86
Недрібноклітинний рак легень/NCI-H522		5,00	5,03
Меланома/SK-MEL-5		2,95	5,25
Рак нирок/A498		4,27	4,59
Рак молочної залози/T-47D		3,46	2,87

Для (4-хлорофеніл)аміду 7-(4-хлорофеніл)-2-оксо-2,3-дигідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти **3.26** також було проведено COMPARE аналіз, що дозволяє спрогнозувати механізми дії досліджуваної сполуки на основі її профілів *in vitro* активності порівнюючи з ефектом відомих протипухлинних агентів. Таким чином, COMPARE аналіз проводився на основі «стандартних агентів» NCI для параметрів GI<sub>50</sub> та TGI (табл. 3.9). Отримані коефіцієнти кореляції Пірсона (PCC) нажалі не дозволили з високою ймовірністю

прогнозувати механізм цитотоксичності досліджуваної сполуки. Сполука **3.26** продемонструвала найвищу кореляцію на рівні TGI з алкілюючим агентом Ціаноморфоліном-ADR (PCC = 0,606) та інгібітором синтезу РНК Морфоліно-ADR (PCC= 0,576). Варто відзначити, що помітну кореляцію для сполуки **3.26** було виявлено на рівні GI<sub>50</sub> з модулятором протеїнкінази С Бріостатином 1 (PCC = 0,504).

Таблиця 3.9

**Результати COMPARE аналізу сполуки 3.26 (параметри GI<sub>50</sub> та TGI)**

	PCC <sup>a</sup>	Біомішень	Вектор мішені NSC	Механізм дії <sup>b</sup>
GI <sub>50</sub>	0,504	Бріостатин 1	S339555	Модулятор протеїнкінази С
TGI	0,606	Ціаноморфоліно-ADR	S357704	Алкілюючий агент
	0,576	Морфоліно-ADR	S354646	Інгібітор синтезу РНК
	0,574	Аклациноміцин А	S208734	Інгібітор реплікації ДНК, синтезу РНК та білка
	0,555	Ехіноміцин	S526417	Інгібітор гіпоксія-індукованого фактору-1α (HIF-1α)
	0,552	Тамоксифен	S180973	Антагоніст естрогенових рецепторів
	0,534	Ангуїдин	S141537	Інгібітор ініціації білкового синтезу
	0,524	MX2НС1	S619003	Інгібітор топоізомерази II
	0,522	Мітраміцин	S24559	Інгібітор синтезу РНК
	0,521	Флуородопан	S73754	Алкілюючий агент
	0,513	ICRF-187	S169780	Інгібітор топоізомерази II
	0,508	Хромоміцин А3	S58514	Інгібітор РНК-полімерази
	0,506	Ризоксин	S332598	Інгібітор полімеризації тубуліну

<sup>a</sup>Враховано лише кореляції PCC ≥ 0.50

<sup>b</sup>Механізм дії запропоновано на основі літературних джерел

Аналіз взаємозв'язку структура-активність похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону доводить суттєвий вплив замісників у положеннях С5 та С7 у базовому ядра на прояв протипухлинної активності. Зокрема сполуки, що вміщують карбоксильну групу в положенні С5 тiazоло[4,5-*b*]піридинового ядра проявили відсутність протипухлинної активності. З іншого боку, введення

заміщених фенільних, метильного або стирильного фрагментів у положення 5 і 7 базового гетероциклу значно посилювало протипухлинну дію. Слід зазначити, що функціоналізація карбоксильної групи до амідної у положенні С5 тіазолопіридинового ядра значно посилювало протипухлинну активність та обґрунтовує залежність даного фармакологічного ефекту від природи *N*-ариламідного замісника. Так, наявність морфолініламідного фрагменту в тіазоло[4,5-*b*]піридиновому ядрі виявилось невдалий на прояв протипухлинної активності. Тоді як сполуки, що вміщують *N*-4-хлорфеніламідний фрагмент у положенні С5 базового тіазолопіридинового ядра показали найвищий рівень активності серед усіх похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

3.4.2. Поглиблене вивчення цитотоксичності похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону до нормальних клітин та клітин ряду пухлинних ліній.

Враховуючи перспективні результати досліджень протипухлинної активності за науковою програмою *DTP NCI*, ми провели вивчення рівня ефективного інгібування деяких похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону на окремі лінії нормальних та пухлинних клітин. Цитотоксичність похідних 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону та 2-оксо-7-феніл-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот досліджували на клітинах гепатоцелюлярної карциноми людини (HepG2) та клітинній лінії нормальних фібробластів миші (Balb/c 3T3 клон А31) на прикладі похідних **3.3** та **3.21**. Цитотоксичність зазначених сполук оцінювали у трьох біохімічних експериментах: мітохондріальний (МТТ) та лізосомний (NRU) тести, а також дослідженням загального вмісту білку (TPC тест) після експозиції протягом 24, 48 та 72 год. Оцінка життєздатності клітин при дії сполук **3.3** та **3.21** відзначалась залежністю від часу, концентрації та типу лінії клітин (додаток В.18). Варто відзначити, що рівень цитотоксичності сполуки **3.3** відносно лінії клітин гепатоцелюлярної карциноми (HepG2) був вищим, ніж для сполуки **3.21**. Значення цитотоксичних концентрацій (IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> та IC<sub>80</sub>) сполуки **3.3** щодо лінії клітин HepG2 були



нижчими, ніж для лінії Balb/c 3T3 у всіх використаних тестах (табл. 3.10). З іншого боку лінія клітини Balb/c 3T3 була більш чутливою до дії сполуки **3.21**. Першим етапом оцінки цитотоксичної дії сполуки **3.21** на лінію Balb/c 3T3 стало інгібування мітохондріальної активності (МТТ-тест) у досліджуваних клітинах. Тривала інкубація (>48 год) призвела до інгібування лізосомальної активності (NRU-аналіз) та зниження проліферації (TPC тест) у клітинах лінії Balb/c 3T3. Дія сполуки **3.21** обмежувалася пригніченням мітохондріальної активності (МТТ-тест) у клітинах лінії НерG2 (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Цитотоксичність сполук 3.3 та 3.21 в тестах на клітинах НерG2 та нормальних фібробластах Balb/c 3T3**

Сполука	Метод	Час (год)	НерG2			Balb/c 3T3		
			IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>
<b>3.3</b>	МТТ	24	11,5±3,4	19,7±1,4	>100	19,7±4,4	60,1±2,8	>100
		48	9,7±3,1	17,0±1,3	32,0±3,5	12,8±3,6	25,4±1,4	74,6±2,4
		72	5,5±2,4	12,5±0,5	22,9±0,7	4,7±2,2	16,0±1,7	31,8±2,7
	NRU	24	10,1±3,2	17,2±1,2	23,6±1,1	21,5±4,6	23,1±1,1	77,3±2,0
		48	9,2±3,0	16,0±1,3	22,4±1,1	13,8±3,7	20,2±1,1	34,5±3,2
		72	6,3±2,5	13,9±1,3	20,9±0,8	14,0±3,7	19,3±0,3	24,6±0,5
	TPC	24	14,9±0,4	25,4±1,5	>100	19,4±1,6	51,2±3,1	>100
		48	11,4±0,7	18,8±0,7	>100	14,8±0,9	21,6±1,3	>100
		72	7,6±0,7	11,7±0,9	>100	13,5±1,1	20,6±1,3	42,7±6,3
<b>3.21</b>	МТТ	24	27,5±5,2	>100	>100	23,4±4,8	45,6±2,1	>100
		48	15,7±4,0	30,2±2,1	>100	13,8±3,7	40,8±2,3	>100
		72	7,6±2,8	27,0±1,4	>100	7,7±2,8	25,0±2,3	>100
	NRU	24	>100	>100	>100	>100	>100	>100
		48	>100	>100	>100	28,0±5,3	47,7±1,6	>100
		72	>100	>100	>100	13,8±3,7	21,7±0,9	>100
	TPC	24	>100	>100	>100	>100	>100	>100
		48	>100	>100	>100	37,9±4,1	75,0±2,1	>100
		72	>100	>100	>100	32,3±2,8	74,5±0,8	>100
Альбендазол	МТТ	24	0,4±0,1	37,5±2,7	>100	0,2±0,02	0,5±0,1	>100
		48	0,3±0,1	26,4±2,9	>100	0,1±0,04	0,3±0,05	2,8±1,0
		72	0,2±0,1	6,4±0,9	49,5±6,0	0,1±0,05	0,2±0,1	1,1±0,1
	NRU	24	0,4±0,1	59,2±6,2	>100	0,5±0,1	0,5±0,1	>100
		48	0,2±0,1	31,9±4,8	56,0±6,0	0,4±0,1	0,4±0,05	86,8±7,6
		72	0,2±0,04	20,9±3,6	86,2±3,6	0,1±0,02	0,3±0,03	0,4±0,05
	TPC	24	83,1±4,4	>100	>100	0,1±0,05	0,5±0,2	>100
		48	35,6±5,6	73,3±1,6	94,9±2,2	0,1±0,04	0,3±0,1	34,0±6,0
		72	29,6±2,0	62,3±1,6	90,5±2,1	0,1±0,02	0,2±0,05	0,5±0,05

IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> та IC<sub>80</sub> (мкг/мл) представляють концентрації досліджуваних сполук, необхідні для інгібування 20, 50 та 80 % у МТТ, NRU та ТРС тестах. Дані були виражені як середнє значення ±СВ із дозозалежних кривих у мінімум трьох незалежних експериментах.

Наступний етап нашої роботи полягав у оцінці цитотоксичного потенціалу похідних 5-метил-7-феніл-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону, а саме сполук **3.10**, **3.13** та **3.14**. Цитотоксичність даних сполук досліджували на двох лініях клітин: лінії псевдонормальних кератоцитів людини (HaCat) та нормальних фібробластах миші (BALB/c 3T3). Лінія псевдонормальних кератоцитів людини (HaCat) виявилась більш чутливою до дії даних сполук ніж клітини нормальних фібробластів миші (BALB/c 3T3). Варто відзначити, що тестовані сполуки досягають значення IC<sub>50</sub> після 72 годин на обох тестованих клітинних лініях. Сполука **3.13** проявила найменшу токсичність щодо клітин HaCat та BALB/c 3T3 (Рис. 3.9).

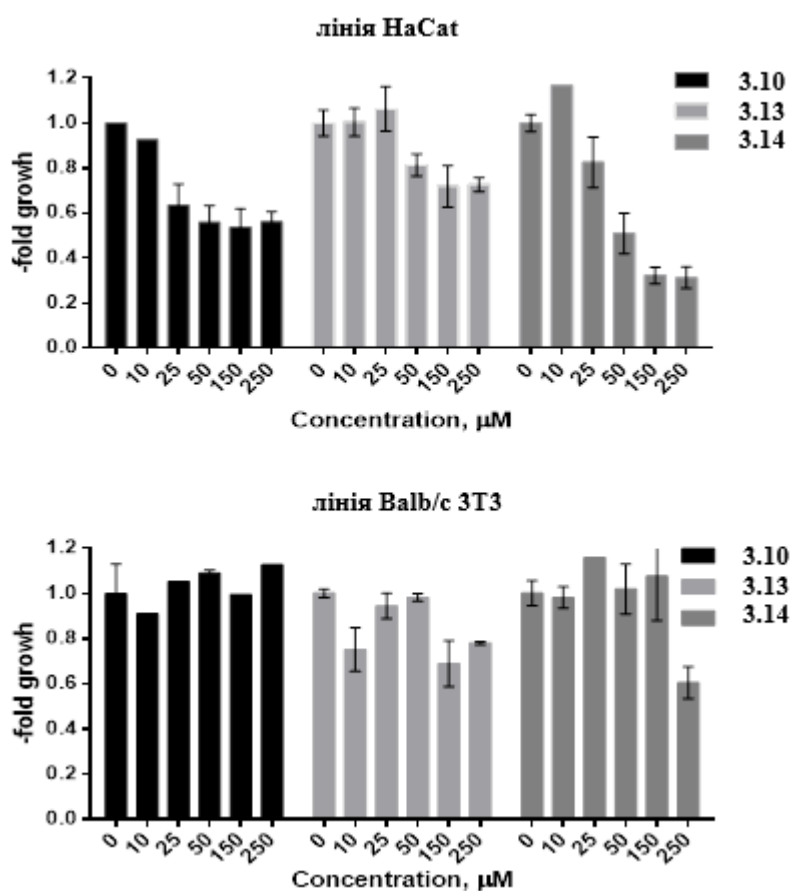


Рис. 3.9. Вплив похідних **3.10**, **3.13** та **3.14** на проліферативну активність клітин лінії HaCat і BALB/c 3T3.

Для низки 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів (сполука **3.5**), 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот (сполуки **3.19**, **3.20**, **3.21**) та їх амідів (сполука **3.26**) проведено ще одну серію досліджень цитотоксичності у МТТ тесті на лінії псевдонормальних кератоцитів людини (HaCaT) та ембріональних клітинах нирки людини (НЕК293) [343]. Встановлено, що клітини HaCaT і НЕК293 продемонстрували стійкість до впливу тестованих похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону і не досягали значень IC<sub>50</sub> в межах концентрацій 28,73 – 41,63 мкг/мл (Рис. 3.10). Так, похідне 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону (сполука **3.5**) в концентрації 36,88 мкг/мл пригнічувало ріст клітин HaCaT на 30,2%, клітин НЕК293 на 42,8%. Похідне **3.19** у концентрації 30,67 мкг/мл пригнічувало ріст клітин HaCaT на 24,1%, клітин НЕК293 на 33,0%. Сполука **3.20** знижувала життєздатність клітин HaCaT на 7,0%, а життєздатність клітин лінії НЕК293 на 15,8%. Похідне **3.21** у концентрації 28,73 мкг/мл знижувало життєздатність клітин лінії HaCaT на 14,3%, а життєздатність клітин лінії НЕК293 на 31,3%. При дії аміду 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти (сполука **3.26**) у концентрації 41,63 мкг/мл було виявлено інгібування росту клітин лінії HaCaT на 26,3% і 26,5% інгібування росту клітин лінії НЕК293.

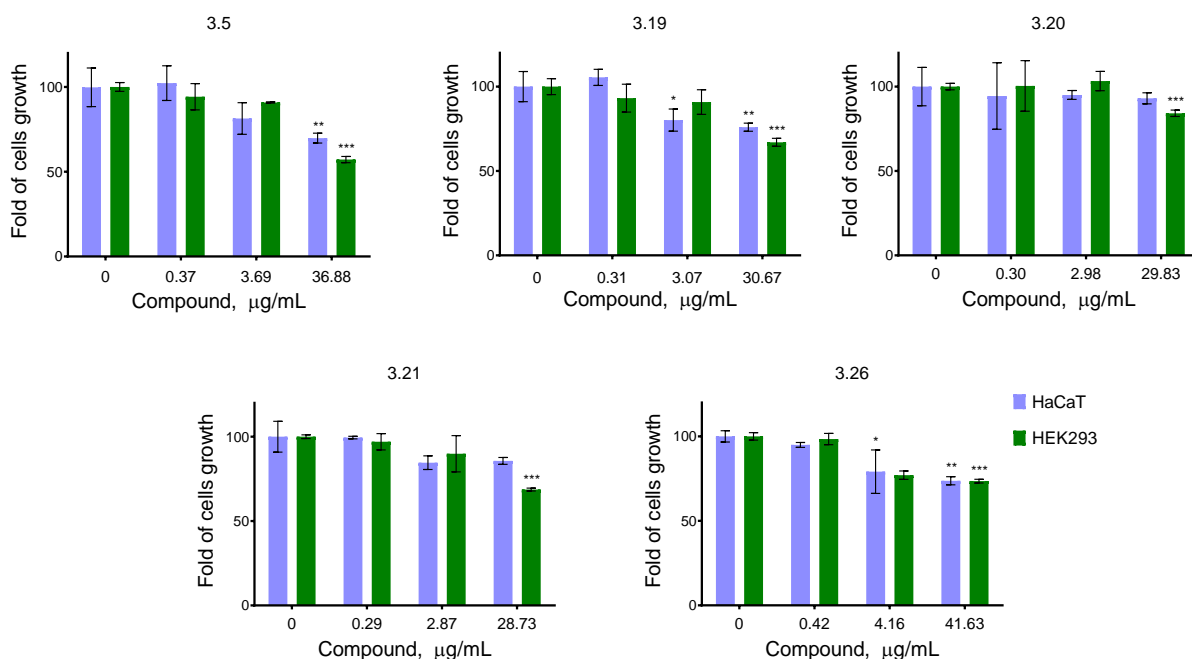


Рис. 3.10. Цитотоксична дія похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів **3.5**, **3.19-3.21**, **3.26** на лінії клітин НаСаТ та НЕК293 у МТТ-тесті після 72 год експозиції. Дані представлено як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення (СВ).

У продовження досліджуваної теми, нами було вивчено цитотоксичність амідів 2-оксо-7-феніл-2,3-дигідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти щодо клітин С6 гліоми щура та лінії гліобластоми людини U-373 на прикладі найбільш активних сполук **3.23** і **3.26** за допомогою МТТ тесту. Досліджувані сполуки додавали до культивованих клітин у різних кінцевих концентраціях (0–100 мкМ) та інкубували протягом 72 год (рис. 3.11). Аналіз цитотоксичності в умовах МТТ тесту показав, що сполуки **3.23** та **3.26** мають протипухлинну дію та знижують життєздатність клітин С6 гліоми щура та лінії гліобластоми людини U-373. Досліджувані сполуки проявили більш сильний цитотоксичний ефект, ніж препарат порівняння Темозоломід, який є стандартом хіміотерапії рецидивів злоякісних гліом. ІС<sub>50</sub> для сполук **3.23** та **3.2** протягом 72 год інкубації становив 56,2 мкМ, 22,3 мкМ для клітин С6 гліоми щура і 32,2 мкМ і 59,5 мкМ для гліобластоми людини лінії U-373. Значення ІС<sub>50</sub> для темозоломіді становило вище 190 мкМ.

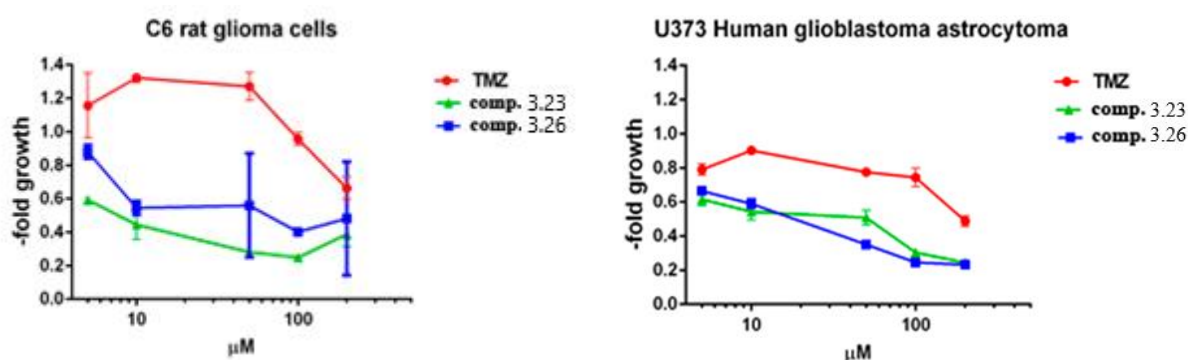


Рис. 3.11. Результат цитотоксичної дії сполук **3.23**, **3.26** та Темозоломіді на клітини С6 гліоми щура та лінії гліобластоми людини U-373 протягом 72 годин лікування в умовах МТТ-тесту.

У подальшому нами було проведено дослідження протипухлинної дії амідів 2-оксо-7-феніл-2,3-дигідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти (сполуки **3.23** та **3.26**) щодо клітинної лінії KB-3-1 (епідермальна карцинома людини), HL-60 (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) та НСТ116 (колоректальна карцинома людини). У дослідженні використовували наступні концентрації досліджуваних сполук: 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 і 10,0 мкМ. Підрахунок кількості клітин здійснювали через 24, 48 та 72 години після початку інкубації за допомогою МТТ тесту (Рис. 3.12). Одержані результати показали, що сполуки **3.23** та **3.26** пригнічують процеси росту у клітинах дослідних ліній та виявляють цитотоксичні властивості, що у певній мірі корелюють із даними досліджень протипухлинної активності за програмою DTP Національного інституту раку (США), проведених для зазначених сполук. Також продемонстровано, що досліджувані сполуки **3.23** та **3.26** проявляють залежну від часу дію.

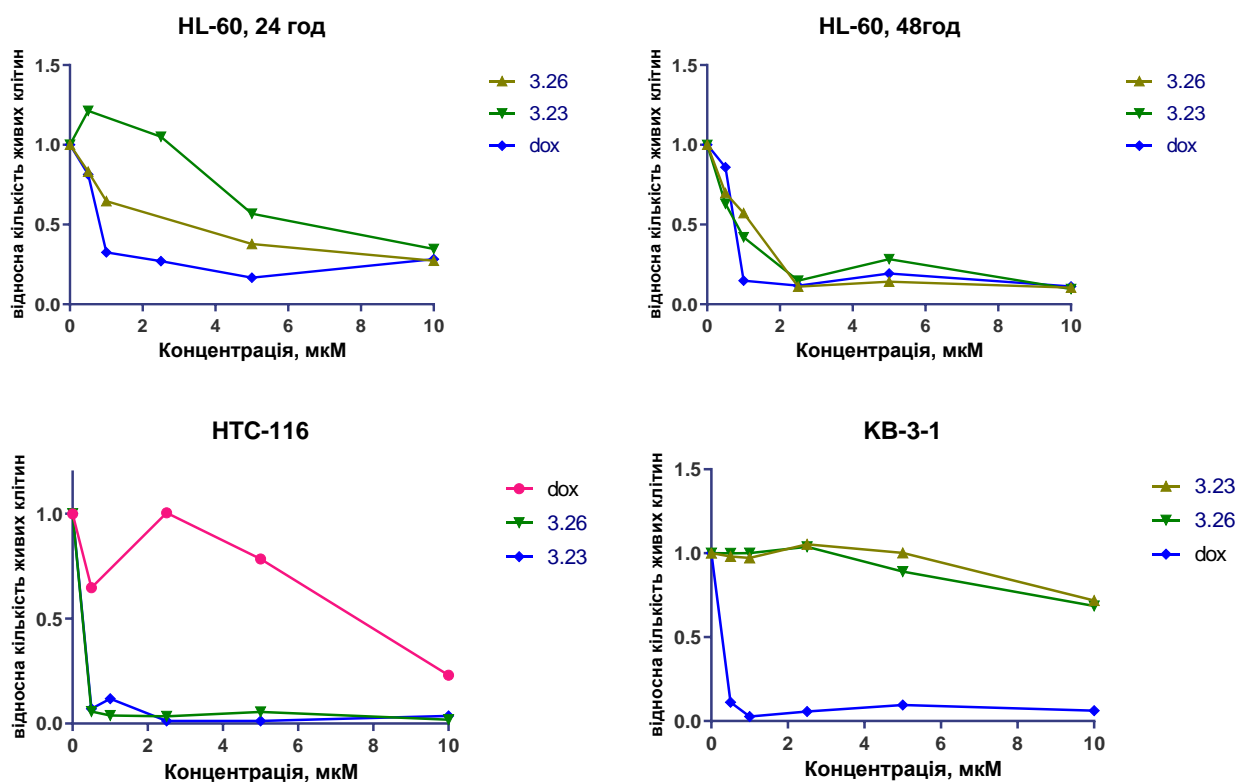


Рис. 3.12. Динаміка зміни кількості клітин ліній HL-60 (протягом 24 та 48 годин інкубації), НСТ 116 (протягом 72 годин інкубації) та KB-3-1 (протягом 72 годин інкубації) у культуральному середовищі за дії сполук **3.23** та **3.26**; позитивний контроль – доксорубіцин.

### 3.4.3. Дослідження протимікробної та протигрибкової активності похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

Протимікробну та протигрибкову активність похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону визначали методом дифузії в агар та методом серійних розведень (розщеплення резазурину в бульйоні) використовуючи референс-культури та клінічні ізоляти мікроорганізмів виділених від амбулаторних пацієнтів. Загалом на предмет протимікробної та протигрибкової активності було протестовано 14 похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону. Аргументом на користь пошуку протимікробних властивостей серед синтезованих сполук була наявність в них поліфармакологічних властивостей, зокрема протипухлинної та антитрипаносомної активності. На першому етапі було проведено дослідження прямої протимікробної дії для сполук **3.5**, **3.6**, **3.17**, **3.19-3.21**, **3.26** методом дифузії в агар [336, 343, 344]. Досліджувані сполуки проявили різний рівень прямої протимікробної дії із діаметрами зон пригнічення росту в діапазоні 00-9,42 мм щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів (табл. 3.11). Отримані результати показали, що зазначені похідні тіазолопіридину проявляють помірну протимікробну активність щодо досліджуваних мікроорганізмів у дозі 20 мкг на лунку. Так, аналіз антимікробної активності дозволив ідентифікувати 2-оксо-7-тіофен-2-іл-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонову кислоту (сполука **3.21**) та (4-хлорофеніл)амід 7-(4-хлорфеніл)-2-оксо-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти (сполука **3.26**) з високими показниками пригнічення росту деяких досліджуваних мікроорганізмів. Сполука **3.21** продемонструвала найвищу активність щодо клінічного штаму *Candida albicans* співмірну з препаратом порівняння Амфотерицином В. Сполука **3.26** проявила найвищу антибактеріальну активність щодо метацилін-чутливого (MSSA) та метацилін-резистентного (MRSA) штамів *Staphylococcus aureus*.

Таблиця 3.11

**Результати дослідження протимікробної та протигрибкової дії ряду тiazоло[4,5-*b*]пiридин-2(3*H*)-онiв  
(дiаметри зон пригнiчення росту, мм)**

Сполука	Дiаметри зон пригнiчення росту, мм*								
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923 (F-49))	<i>S. aureus</i> MSSA <sup>#</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA <sup>#</sup>	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E. coli</i> <sup>#</sup>	<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>C. albicans</i> (ATCC 885-653)	<i>C. albicans</i> <sup>#</sup>	
								Фунгiстатична	Фунгiцидна
<b>3.5</b>	4,15±0,08	4,65±0,08	7,03±0,64	0	0	0	5,43±0,21	5,91±0,22	5,58±0,14
<b>3.6</b>	5,01±0,35	4,78±0,45	4,95±0,46	0	0	0	0	0	0
<b>3.17</b>	3,71±0,21	4,76±0,29	4,47±0,41	0	0	6,74±0,45	5,12±0,22	6,21±0,36	0
<b>3.19</b>	5,71±0,22	4,75±0,29	0	4,21±0,29	4,21±0,29	5,06±0,32	4,36±0,14	5,66±0,34	4,30±0,42
<b>3.20</b>	4,35±0,22	4,20±0,27	6,18±0,83	4,74±0,29	4,74±0,29	0	6,19±0,40	6,39±0,50	5,21±0,76
<b>3.21</b>	5,88±0,81	6,28±0,80	4,59±0,38	4,22±0,31	4,22±0,31	5,14±0,36	8,47±0,42	9,42±0,45	8,11±0,24
<b>3.26</b>	6,71±0,43	7,67±0,47	8,16±0,65	5,04±0,28	5,04±0,28	0	6,16±0,33	5,16±0,39	4,25±0,33
Амоксицилин	12,78±0,41	6,37±0,45	5,60±0,41	10,05±0,36	8,20±0,35	7,97±0,42	-	-	-
Амфотерицин В	-	-	-	-	-	-	11,00±0,51	9,00±0,65	-

<sup>#</sup>Клінічні ізоляти

\* Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ).

МІК досліджуваних сполук **3.5, 3.6, 3.17, 3.19-3.21, 3.26** визначали методом серійних розведень (табл. 3.12). Сполуки виявили інгібуючу активність щодо MSSA та MRSA штамів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Candida albicans* із величинами МІК в межах 12,5->50 мкг/мл. Похідне **3.21** виявило помірну інгібуючу активність щодо *Candida albicans* з значенням МІК 12,5 мкг/мл. Значення МІС для сполуки **3.26** при аналогічному розведенні щодо MSSA та MRSA штамів *Staphylococcus aureus* становило 50 мкг/мл.

Таблиця 3.12

**Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) досліджуваних сполук, мкг/мл**

Сполука	<i>S. aureus</i> MSSA	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<b>3.5</b>	> 50	> 50	> 50	> 50
<b>3.6</b>	> 50	> 50	> 50	> 50
<b>3.17</b>	> 50	> 50	> 50	> 50
<b>3.19</b>	> 50	> 50	> 50	> 50
<b>3.20</b>	> 50	> 50	> 50	> 50
<b>3.21</b>	> 50	> 50	> 50	12,5
<b>3.26</b>	50	50	> 50	> 50

Для сполук **3.5, 3.6, 3.17, 3.19-3.21, 3.26** було досліджено синергічну взаємодію з амоксициліном проти клінічних ізолятів *ESβL* + *K. pneumoniae* та резистентного до метициліну *S. haemolyticus* (MRSН) (табл. 3.13-3.15). За результатами скринінгу встановлено, що сполука **3.20**, яка вміщує стирольний фрагмент у структурі проявляє перспективну синергічну активність з амоксициліном проти штамів *ESβL* + *K. pneumoniae* та MRSН. Варто відзначити, що у науковій літературі описано ряд похідних, що вміщують стирольний фрагмент у молекулах поєднаний із різними гетероциклічними системами, які виявляють значний синергетичний ефект з рядом бета-лактамних антибіотиків [345]. Особливо часто даний ефект спостерігається для структурно споріднених до похідних тіазолопїридинів хїнолін/хїнаксолін-стирольних гібридних молекул [345, 346].



Таблиця 3.13

**Вивчення синергізму взаємодії сполук 3.5, 3.6, 3.17, 3.19-3.21, 3.26 з амоксициліном проти ESβL<sup>+</sup> *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (зони пригнічення росту (в мм), M±S(σ), МІК амоксициліну 250 мкг/мл)**

Сполука	Контроль (середовище без амоксициліну)	Середовище з амоксициліном			
		1/8 МІК (32 мкг/мл)	1/16 МІС (16 мкг/мл)	1/32 МІС (8 мкг/мл)	1/64 МІС (4 мкг/мл)
EtOH+ DMSO	2,86±0,21	2,75±0,52	2,63±0,21	3,38±0,71	3,06±0,33
<b>3.5</b>	3,85±0,51	4,37±0,48	3,85±0,46	3,14±0,17	2,91±0,32
<b>3.6</b>	3,28±0,59	3,47±0,61	3,25±0,43	3,20±0,07	3,24±0,43
<b>3.17</b>	3,31±0,33	3,75±0,22	5,18±1,14	3,47±0,44	4,30±0,60
<b>3.19</b>	3,46±0,57	2,95±0,39	2,95±0,17	4,70±0,39	2,66±0,14
<b>3.20</b>	6,02±0,48 [12,73±0,83]	8,37±1,38 [13,20±1,05]	6,27±0,29 [11,06±1,25]	6,03±0,58 [15,47±2,16]	-
<b>3.21</b>	3,03±0,43	4,04±0,65	3,16±0,45	3,05±0,19	2,67±0,36
<b>3.26</b>	3,25±0,37	2,34±0,16	[4,04±0,81]	[8,83±1,02]	3,79±0,68

"-" – не спостерігалось пригнічення росту.

# в дужках – зони часткового пригнічення росту (бактеріостатичний ефект)

Таблиця 3.14

**Вивчення синергізму взаємодії сполук 3.5, 3.6, 3.17, 3.19-3.21, 3.26 з амоксициліном проти MRSH (зони пригнічення росту (в мм), M±S(σ), МІК амоксициліну 4000 мкг/мл)**

Сполука	Контроль (середовище без амоксициліну)	Середовище з амоксициліном			
		1/8 МІК (500 мкг/мл)	1/250 МІС (16 мкг/мл)	1/500 МІК (8 мкг/мл)	1/1000 МІК (4 мкг/мл)
EtOH+ DMSO	2,83±0,57	2,94±0,27	4,22±0,07	4,99±0,44	3,91±0,36
<b>3.5</b>	2,92±0,12	2,85±0,44	2,69±0,49	5,29±0,59	3,08±0,19
<b>3.6</b>	4,11±0,27	3,42±0,31	[11,31±0,24]	[11,03±0,29]	3,35±0,53
<b>3.17</b>	4,78±1,01	5,55±0,56	5,98±0,64	4,14±0,61	5,05±1,03
<b>3.19</b>	2,92±0,25	3,25±0,47	3,17±0,32	3,97±0,87	3,15±0,11
<b>3.20</b>	7,34±0,36 [13,66±0,72]	14,28±0,53 -	13,69±0,57 -	- [13,53±0,77]	- [13,07±0,32]
<b>3.21</b>	3,28±0,56	3,75±0,40	4,77±0,44	6,29±0,31	8,51±2,55
<b>3.26</b>	3,52±0,65	3,18±0,11	4,44±0,68	2,83±0,43	7,51±1,32

"-" – не спостерігалось пригнічення росту.

# в дужках – зони часткового пригнічення росту (бактеріостатичний ефект)

Таблиця 3.15

**Синергізм взаємодії досліджуваних сполук у дозі 50 мкг/мл з  
амоксициліном щодо бактеріальних штамів з резистентністю до  $\beta$ -  
лактамних антибіотиків**

Сполука	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603		<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> <sup>#</sup> MRSН	
	Амоксицилін МІК	Кратність скорочення	Амоксицилін МІК	Кратність скорочення
Амоксицилін	256		4096	
+Клавуланова кислота	8	32	64	64
+ <b>3.5</b>	256	1	4096	1
+ <b>3.6</b>	256	1	1024	4
+ <b>3.17</b>	256	1	2048	2
+ <b>3.19</b>	256	1	4096	1
+ <b>3.20</b>	32	8	128	32
+ <b>3.21</b>	256	1	2048	2
+ <b>3.26</b>	256	1	4096	1

# клінічний ізолят з атиповою активністю пеніцилін-зв'язуючого білка PBP2\* і  $\beta$ -лактамазою

Аналіз взаємозв'язку структура-активність досліджуваних похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону доводить відсутність суттєвої залежності протимікробного ефекту від замісників у положеннях С5 та С7 базового ядра. З іншого боку, похідне 2-оксо-7-феніл-2,3-дигідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти (сполука **3.21**), що вміщує тієнільний замісник у структурі продемонструвало найвищу активність щодо *Candida albicans* з величиною МІК 12,5 мкг/мл, а також володіло помірною протипухлинною активністю стосовно лінії А498 раку нирок (GP = 73,76%). Варто відзначити, що протимікробна активність конденсованих похідних, що вміщують тіофеновий фрагмент у структурі описана у численних літературних даних, зокрема для похідних бензотіофену [347], тієно[2,3-*d*]піримідину [348] та тієно[3,2-*c*]піразолу [349]. Результати експериментальних досліджень доводять, що наявність амідного

фрагменту у положенні С5 тiazолопіридинового ядра (сполука **3.26**) також сприятлива для прояву антимікробної активності. Наявність фенільних, 4-хлорофенільних, 4-метоксифенільних, стирильних і карбоксильних замісників у положеннях С5 та С7 базового тiazоло[4,5-*b*]піридинового ядра не призводять до чіткого прояву антимікробної активності і не корелюють з іншими типами біологічної активності, які були встановленими для даних сполук раніше [332, 339].

Наступним етапом нашої роботи стало дослідження протимікробної активності 5-метил-7-феніл-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів **3.8-3.14** методом дифузії в агар та методом серійних розведень. Так, за даними скринінгу протимікробної активності досліджуваних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів, найвищу активність продемонструвала сполука **3.14**, яка володіла протигрибковою активністю щодо грибків роду *Candida*, селективно діяла на грампозитивні мікроорганізми *Micrococcus luteus* та деякі грамнегативні мікроорганізми (табл. 3.16 і рис 3.13). На рисунку 3.13 показано, що сполуки **3.8** (блакитний колір), **3.10** (сірий колір), **3.13** (зелений колір) і **3.14** (темно-синій колір) проявили більшу зону інгібування росту щодо досліджуваних мікроорганізмів, ніж контрольний розчинник (коричневий колір). Сполуки **3.11** і **3.13** виявили найвищу протигрибкову активність щодо грибів родів *Candida* та *Saccharomyces*. Дані похідні проявили також активність проти деяких грамнегативних мікроорганізмів, зокрема клінічних штамів *Citrobacter freundii* та *Achromobacter xylosoxidans*. Чотири досліджувані сполуки (**3.8**, **3.10**, **3.13**, **3.14**) показали значну антимікробну активність як проти клінічних, так і референтних грамнегативних мікроорганізмів.

Таблиця 3.16

**Результати дослідження протимікробної та протигрибкової дії 5-метил-7-феніл-3H-тіазоло[4,5-b]піридин-2-онів 3.8-3.14 (діаметри зон пригнічення росту, мм)**

1	Характеристика		Вид	Діаметри зон пригнічення росту (мм ± СВ)									
				3.8	3.9	3.10	3.11	3.12	3.13	3.14	ДМСО	Ванкоміцин	
1	2		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Грам-	Референс штами	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853 (F-51))	00	00	00	00	00	7,0±0,3*	9,0±0,4*	00	-	
2			<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	7,0±0,25*	00	7,0±0,3*	00	7,0±0,2*	00	00	00	00	-
3			<i>Raoultella terrigena</i> (ATCC 33257)	11,0±0,4*	00	11,6±0,3*	00	00	11,2±0,4*	00	00	00	-
4		Клінічні штами	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N 7	9,2±0,2	9,2±0,2	9,2±0,3*	9,2±0,2	9,2±0,2	9,5±0,3	10,5±0,4*	9,2±0,2	-	
5			<i>Escherichia coli</i> N 37	11,6±0,25*	00	9,2±0,2*	00	00	00	9,9±0,2*	00	-	
6			<i>Raoultella terrigena</i> N1	12,0±0,5*	00	00	00	00	12,0±0,3*	00	00	-	
7			<i>Achromobacter xylosoxidans</i> N 147	10,0±0,4*	8,0±0,3	12,8±0,3**	10,0±0,4*	8,0±0,3	8,0±0,3	11,0±0,2*	8,0±0,2	-	
8			<i>Citrobacter freundii</i> N 2	7,7±0,2	7,7±0,2	9,0±0,5*	10,8±0,4*	7,7±0,2	11,8±0,4*	11,8±0,5*	7,7±0,2	-	

Закінчення табл. 3.16

1	2		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
9	Грам+	Референс штам	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923 (F-49))	00	00	11,2± 0,5	12,0± 0,3	00	11,2± 0,3	00	11,2± 0,4	32,0± 0,5	
10		Клінічні штамми	<i>Staphylococcus aureus</i> N 23	00	00	12,0± 0,3	12,2± 0,4	00	11,4± 0,3	00	11,6± 0,2	11,4± 0,3	
11			<i>Kocuria marina</i> N 133	00	00	12,2± 0,4*	00	00	00	00	00	00	25,1± 0,4
12			<i>Micrococcus luteus</i> N 136	00	00	00	00	00	00	10,2 ± 0,4*	7,0 ± 0,3	12,0 ± 0,2	
13	Гриби	Референс штам	<i>Candida. albicans</i> (ATCC 885-653)	14,4± 0,4*	14,5± 0,5*	00	9,6± 0,3	12,7± 0,4*	9,7± 0,3	12,2± 0,2	9,7±0,2*	-	
14		Клінічні штамми	<i>Candida albicans</i> N 60	00	00	9,7± 0,3	9,2± 0,4*	00	11,2± 0,5*	9,0± 0,3*	00	-	
15			<i>Candida kefir</i> N 68	13,8± 0,1*	12,3± 0,4	9,8± 0,4*	14,5± 0,4*	14,9± 0,3*	14,6± 0,2*	14,7± 0,2*	12,5± 0,2	-	
16			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N 62	00	00	12,5± 0,4*	8,0± 0,2*	00	8,0± 0,2*	00	00	00	-

\*Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ)

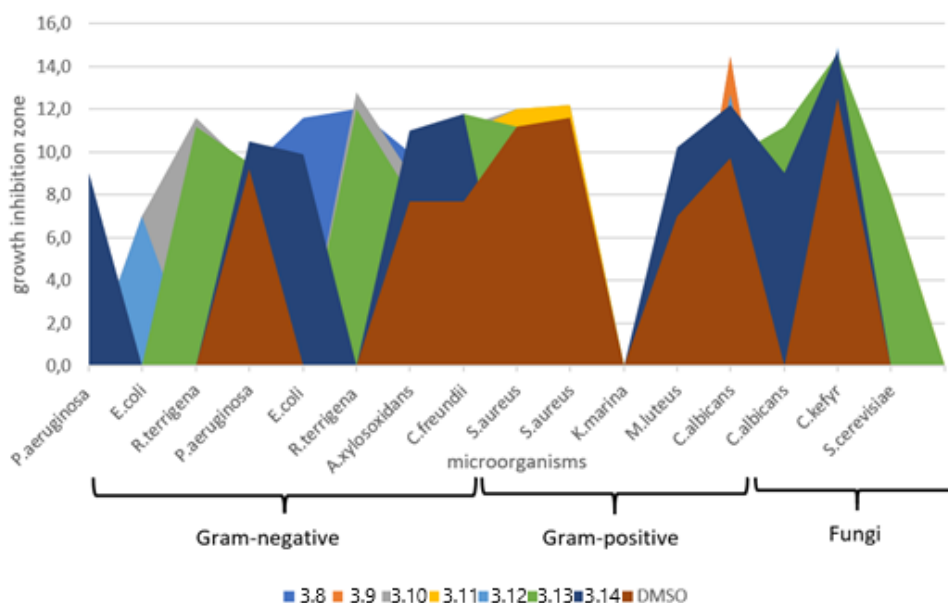


Рис. 3.13. *In vitro* антимікробна активність сполук **3.8-3.14**.

Для високоактивних сполук **3.8**, **3.10**, **3.13**, **3.14** визначено МІК (табл. 3.17). Сполука **3.14** проявила найвищу активність щодо грамнегативних мікроорганізмів (МІК 0.21 мкМ) та штаму *Candida albicans* (МІК 0.83 мкМ).

Таблиця 3.17

#### Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) досліджуваних сполук, мкМ

	мкМ						
	3.8	3.10	3.13	3.14	Ванкоміцин	Ципрофлоксацин	Клотримазол
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N 7	-	-	1,56	0,21	-	1,81	-
<i>Escherichia coli</i> N 37	1,84	0,96	-	0,21	-	1,51	-
<i>Raoultella terrigena</i> N1	1,84	0,96	0,78	-	-	2,11	-
<i>Citrobacter freundii</i> N 2	-	0,96	1,56	1,66	-	2,26	-
<i>Staphylococcus aureus</i> N 23	-	0,96	-	-	4,16	3,02	-
<i>Micrococcus luteus</i> N 136	-	-	-	1,66	2,77	4,53	-
<i>Candida. albicans</i> (ATCC 885-653)	1,84	0,96	1,56	0,83	-	-	1,16
<i>Candida albicans</i> N 60	1,84	1,92	1,56	1,66	-	-	2,9

“-” – не тестовано.

#### 3.4.4. Дослідження впливу 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону (**3.14**) на MurD-лігазу та ДНК-гіразу *in silico*.

Значний антимікробний потенціал низки тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-онів щодо ряду референс-культур та клінічних ізолятів мікроорганізмів виділених від амбулаторних пацієнтів була аргументом для поглибленого вивчення механізмів реалізації їх біологічної активності. Для цього були проведені докінгові дослідження з використанням програмного пакету *AutoDock Vina*<sup>®</sup> на прикладі найбільш активної сполуки **3.14**. Структури ферментів для *in silico* розрахунків були отримані з Protein Data Bank (PDB), а саме MurD-лігаза (код 2Y67) [350] та ДНК-гіраза (код 2XCT) [551]. Перед процедурою молекулярного докінгу було проаналізовано літературні дані для вибору найбільш оптимальних біомішеней. Так, у ряді літературних джерел було повідомлено про похідні 4-тіазолідинону, що демонструють антибактеріальну активність шляхом інгібування MurD-лігази [352]. Окрім того, лікарські засоби з групи фторхінолонів як відомі інгібітори ДНК-гірази вміщують ядро, яке структурно подібне до 3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону. Структурно споріднені сполуки на основі 4,5,6,7-тетрагідробензо[1,2-*d*]тіазолу були ідентифіковані також як інгібітори ДНК-гірази [353].

За результатами докінгових досліджень сполука **3.14** продемонструвала високу енергію зв'язування з обраними біомішенями співмірну з еталонним інгібітором N21 та ципрофлоксацином (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

#### Результати докінгового дослідження сполуки **3.14** щодо активних сайтів MurD (2Y67) і ДНК-гірази (2XCT)

Сполука	MurD (2Y67)		ДНК-гіраза (2XCT)	
	Енергія зв'язування (ккал/моль)	Константа інгібування, Кі (мкМ)	Енергія зв'язування (ккал/моль)	Константа інгібування, Кі
<b>3.14</b>	-6,31	23,63 μM	-8,28	858,77 nM
Ципрофлоксацин	-	-	-8,35	756,11 nM
N21	-6,08	34,80 μM	-	-

Сполука **3.14** зв'язується з активним центром MurD-лігази трьома водневими зв'язками з наступними амінокислотними залишками: LYS319 (1,92 Å), SER415 (1,87 Å) та ARG425 (3,09 Å). Кінцева енергія зв'язування сполуки збільшується за рахунок додаткових гідрофобних взаємодій а саме: T-подібної  $\pi$ - $\pi$ , алкільної та  $\pi$ -алкільної взаємодій з рядом ліпофільних амінокислот ALA414, LEU416, PHE422, ILE139. Крім того, амінокислотні залишки LYS115, GLU157 і ASN138 утворюють слабкі вуглець-водневі взаємодії з двома метоксильними групами сполуки **3.14**. Варто відзначити, що достатньо малий розмір сполуки **3.14** не зумовлює взаємодії з амінокислотним залишком THR36, який є ключовим для ефективного інгібування MurD-лігази (Рис. 3.14.).

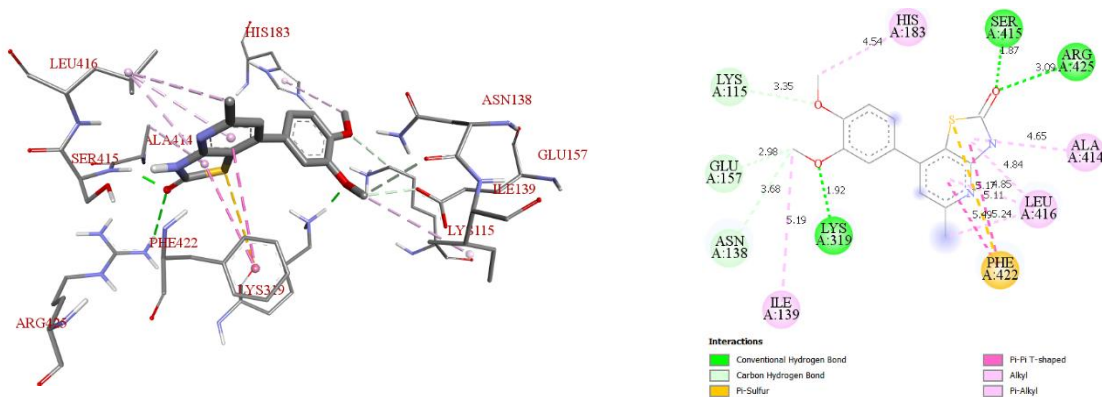


Рис. 3.14. Візуалізація зв'язування **3.14** з MurD-лігазою (PDB 2Y67).

Результати докінгового дослідження сполуки **3.14** дозволяють припустити, що дана сполука також взаємодіє з ключовими залишками активного центру ДНК-гірази (Рис. 3.15.). Сполука **3.14** утворює сильні взаємодії всередині активного центру ДНК-гірази завдяки трьом водневим зв'язкам з амінокислотними залишками SER1084 (1,81 Å), ASP437 (2,01 Å) та GLY459 (2,15 Å). Крім того, положення молекули у активному центрі стабілізується за рахунок  $\pi$ - $\pi$  взаємодій між фенільним залишком, 3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридиновим ядром та нуклеотидами DG9, DT8. Крім того, 3-метоксигрупа і тіазольний цикл утворюють  $\pi$ -алкільні взаємодії з ARG458 і DG9. Варто відзначити, що референс препарат ципрофлоксацин також утворює водневі зв'язки із амінокислотним



залишком SER1084 та  $\pi$ -алкільні взаємодії з ARG458, які мають вирішальне значення на реалізацію протимікробної активності. Енергія зв'язування та константа інгібування сполуки **3.14** яка є співмірною до ципрофлоксацину свідчить про подібний механізм біологічної активності шляхом інгібування ДНК-гірази та відповідно, суттєвий протимікробний ефект досліджуваної сполуки.

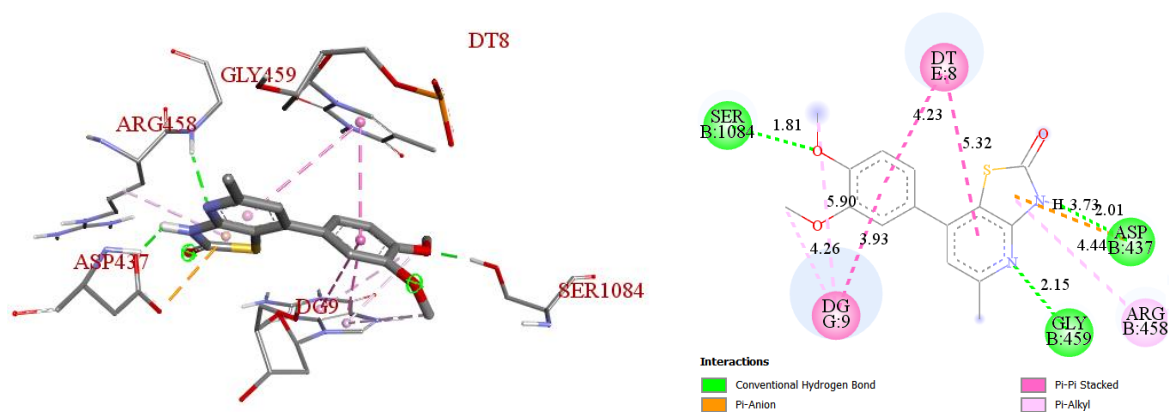


Рис. 3.15. Візуалізація зв'язування **3.14** з ДНК-гіразою (PDB 2XST).

3.4.5. Дослідження протитрипаносомної активності похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону.

Враховуючи численні літературні дані, що підтверджують перспективність похідних на основі 4-тіазолідинону та їх структурних аналогів як нових протипаразитарних агентів, тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-они було обрано об'єктами дослідження на антитрипаносому активність. Протитрипаносомна активність синтезованих тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів (сполуки **3.1**, **3.2**, **3.4**, **3.5**, **3.19**, **3.24**, **3.25**) досліджувалася в *in vitro* експерименті щодо *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*) [354]. Значення  $IC_{50}$  було визначено на підставі результатів принаймні трьох різних експериментів.

Загалом, похідні тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону пригнічували ріст паразитів у мікромольних концентраціях (табл. 3.19) і є перспективними агентами у дизайні потенційних антитрипаносомних агентів. Зокрема серед 6 досліджуваних похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону виявлено 3 «сполуки-хіти»

(**3.1**, **3.4**, **3.25**), які можуть стати об'єктами для поглибленого дослідження та подальшої структурної модифікації.

Таблиця 3.19

**Антитрипаносомна активність похідних тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону  
щодо *Trypanosoma brucei brucei***

Сполука	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> , мкМ
<b>3.1</b>	1,60 ± 0,40	4.11 ± 0.82
<b>3.2</b>	8,50 ± 0,50	22.77 ± 2.11
<b>3.4</b>	4,10 ± 0,25	9.47 ± 0.73
<b>3.5</b>	>50	-
<b>3.19</b>	>50	-
<b>3.24</b>	4,50 ± 0,70	11.49 ± 2.10
<b>3.25</b>	1,9 ± 0,50	4.16 ± 0.76
Пентамідин, нМ		1,364 ± 0,464
Ніфуртімокс		2,389 ± 0,608

Аналіз взаємозв'язку структура-активність досліджуваних сполук доводить відсутність чіткої залежності протипаразитарних властивостей від природи субституентів у тiazоло[4,5-*b*]піридиновому ядрі. З іншого боку, найактивнішими виявились похідні 5,7-діарил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-ону з нафтільним фрагментом у положенні С-5 та *n*-хлорофенільним фрагментом у положенні С-7 базового гетероциклу (сполука **3.1.**) та похідне, що вміщує *N*-4-бромфеніламідний фрагмент у положенні С5 та *n*-метоксифенільним фрагмент у положенні С-7 базового ядра (сполука **3.25**). Варто відзначити, що заміна одного з арильних радикалів чи *N*-ариламідного замісника у зазначених сполуках на інші молекулярні фрагменти призводить до суттєвого зменшення чи повної втрати антитрипаносомної активності. Сполука **3.19**, яка вміщує карбоксильну групу в положенні С5 тiazоло[4,5-*b*]піридинового ядра також не виявляє трипаноцидного ефекту та має попередньо встановлену відсутність протипухлинної та антимікробної активності, що також говорить про несприятливий вплив даного замісника на вияв біологічної активності даного класу похідних.

### 3.5. Експериментальна частина.

#### *Загальна методика синтезу 5,7-діарил-3H-тіазоло[4,5-b]піридин-2-онів (3.1-3.6)*

Суміш 0,005 моль 4-аміно-5H-тіазол-2-ону, 0,005 моль відповідного бензиліденацетофенону у середовищі оцтової кислоти нагрівають протягом 3 годин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти.

#### *Загальна методика синтезу 2-[5,7-біс-(4-хлорофеніл)-2-оксо-тіазоло[4,5-b]піридин-3-іл]-N-(4-метоксифеніл)-ацетаміду (3.7)*

До підігрітої суспензії 5,7-біс-(4-хлорофеніл)-3H-тіазоло[4,5-b]піридин-2-ону **3.2** (0,003 моль) в етанолі додають етанольний розчин калію гідроксиду (0,003 моль), N-(4-метоксифеніл)-ацетамід (0,0033 моль) та каталітичні кількості калію йодиду та нагрівають протягом 3 год. Утворений осад відфільтровують, промивають водою (для розчинення калію хлориду), етанолом та перекристалізують з суміші ДМФА-етанол (1:2).

#### *Загальна методика синтезу 5-метил-7-феніл-3H-тіазоло[4,5-b]піридин-2-онів (3.8-3.14)*

У колбу поміщають 0,005 моль 4-аміно-5H-тіазол-2-ону, 0,005 моль відповідного бензиліденацетону у 10 мл оцтової кислоти нагрівають протягом 3 годин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти або суміші ДМФА-етанол (1:2).

#### *Загальна методика синтезу 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-[2-(3,4-диметоксифеніл)-вініл]-3H-тіазоло[4,5-b]піридин-2-ону (3.15)*

Суміш 0,005 моль 4-аміно-5H-тіазол-2-ону, 0,005 моль 3,4-диметоксидибензиліденацетону у середовищі оцтової кислоти нагрівають протягом 5 годин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад

відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-оцтова кислота (1:2).

*Загальна методика синтезу 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот (3.16-3.21)*

Суміш 0,005 моль 4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону, 0,005 моль відповідної ариліденпіровиноградної кислоти та 10 мл оцтової кислоти нагрівають протягом 3-5 годин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-оцтова кислота (1:2).

*Загальна методика синтезу амідів 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот (3.22-3.27).*

У плоскодонну колбу поміщають 0,025 моль відповідного аміну та еквімолярну кількість триетиламіну, додають 50 мл діоксану і обережно нагрівають до часткового розчинення вихідного аміну (розчин А). Окремо готують розчин 0,025 моль відповідного хлорангідриду 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти в 30 мл діоксану (розчин Б), який повільно, при постійному перемішуванні, додають до розчину А. Реакційну суміш нагрівають під зворотнім холодильником до повного розчинення вихідних реагентів, після чого продовжують кип'ятити ще протягом 20 хв. Вміст колби повністю охолоджують, продукт реакції осаджують водою, відфільтровують, промивають водою, висушують і перекристалізують з суміші ДМФА-оцтова кислота (1:2) або ДМФА-етанол (1:2).

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що взаємодія 4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону з рядом бензиліденацетофенонів, бензиліденацетонів та ариліденпіровиноградних кислот в умовах реакції [3+3]-циклоконденсації дозволяє одержати нові класи неописаних в літературі похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

2. Проведено оптимізацію структури похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот шляхом введення у структуру амідного фрагменту, що

призводить до одержання сполук, які мають широкий спектр біологічної активності.

3. Структура та чистота синтезованих сполук підтверджено методами елементного аналізу,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопії та мас-спектрометрії.

4. Досліджено протипухлинну, антимікробну та протитрипаносомну, активність синтезованих сполук. Серед ряду амідів 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот виділено сполуки-хіти **3.23** та **3.26** із протипухлинними властивостями із середніми значеннями  $\text{GI}_{50}/\text{TGI}$  1,57/7,31 мкМ (**3.23**) та 2,01/15,71 мкМ (**3.26**), відповідно.

5. Поглиблене *in vitro* вивчення цитотоксичної дії сполук **3.3**, **3.5**, **3.10**, **3.13**, **3.14**, **3.19-3.21**, **3.23**, **3.26** проводилося на клітинах гепатоцелюлярної карциноми НерG2, гліоми щура С6, гліобластоми людини U-373, епідермальної карциноми людини KB-3-1, гострого промієлоцитарного лейкозу людини HL-60, колоректальної карциноми людини HCT116, нормальних фібробластах Valb/c 3Т3, псевдонормальних кератоноцитах людини HaCat та ембріональних клітинах нирки людини HEK293 у МТТ, лізосомному (NRU), LDH тестах та дослідженні загального вмісту білка. Показано, що досліджувані сполуки виявляють високу цитотоксичність щодо досліджуваних пухлинних клітинних ліній, та володіють низькими токсикометричними показниками щодо псевдонормальних клітинних ліній.

6. Пошук протимікробних агентів серед похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону дозволив ідентифікувати 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-он **3.14**, що характеризуються високим рівнем активності щодо збудників *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* та *Candida albicans* із величинами МІС в межах 0,21-0,83 мкМ. За результатами дослідження було ідентифіковано 2-оксо-7-стирил-2,3-дигідротіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонову кислоту **3.20**, що проявляє високий рівень синергізму з амоксициліном відносно клінічних ізолятів мікроорганізмів *ESβL*+ *K. pneumoniae* та метацилін-резистентного штаму *S. haemolyticus* (MRSH).

7. За результатами молекулярного докінгу високоактивного агенту 7-(3,4-диметоксифеніл)-5-метил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону **3.14** його протимікробний ефект може реалізуватися за рахунок афінітету до MurD-лігази та ДНК-гірази, що є підставою для детального вивчення зазначених біомішеней у механізмах реалізації даного виду активності для похідних тіазоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-ону.

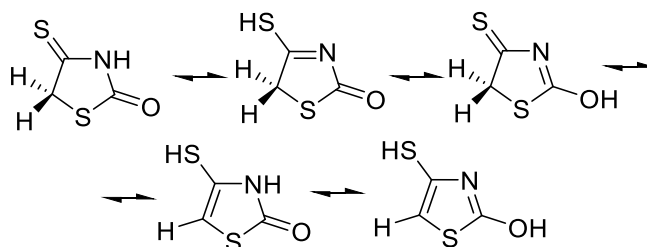
8. Ідентифіковано похідні 5,7-діарил-3*H*-тіазоло[4,5-*b*]піридин-2-ону з нафтільним фрагментом у положенні С-5 та *n*-хлорофенільним фрагментом у положенні С-7 базового гетероциклу **3.1** та похідне, що вміщує *N*-4-бромфеніламідний фрагмент у положенні С5 та *n*-метоксифенільним фрагмент у положенні С-7 базового ядра **3.25** з високим рівнем антитрипаносомної активності відносно *Trypanosoma brucei brucei*, за рівнем якої суттєво перевищують ефект ніфуртимоксу.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [332-334, 336, 339-344, 354]*

РОЗДІЛ 4  
ВИВЧЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ ПІДХОДІВ ДО ОДЕРЖАННЯ  
ФУНКЦІОНАЛЬНО-ЗАМІЩЕНИХ ІЗОРОДАНИНІВ ТА НОВИХ ПОХІДНИХ  
ТІОПІРАНО[2,3-*d*]ТІАЗОЛУ

Похідні на основі 4-тіазолідинону є широко відомим класом гетероциклічних сполук як основи багатьох лікарських засобів та біологічно активних молекул [355, 28]. Окрім того, 4-тіазолідинони мають потужний потенціал у сучасному органічному синтезі з одержанням різнопланових гетеросистем, включно з конденсованими [28]. Варто відзначити, що серед похідних 4-тіазолідинону значний науковий інтерес викликає 4-тіоксо-2-тіазолідинон (ізороданін) через його здатність до одержання ряду конденсованих і неконденсованих гетероциклів. Ізороданін є структурним ізомером та біоізостером добре відомого об'єкту у медичній хімії роданіну (2-тіоксо-4-тіазолідинону). Можливість отримання широкого спектру функціонально заміщених похідних на основі ізороданіну пов'язана з існуванням п'яти різних таутомерних форм (схема 4.1). Згідно з квантово-хімічними розрахунками, висока реакційна здатність ізороданіну пов'язана з відносно низькою енергією активації та меншою ймовірністю оборотного процесу, особливо в різних реакціях циклоконденсації [356-358]. Крім того, таутомерія та реакційна здатність ізороданіну була також детально досліджена напівемпіричними квантово-хімічними розрахунками в  $\pi$ -електронному наближенні за методом Парізера-Парра-Попла [359].

*Схема 4.1*

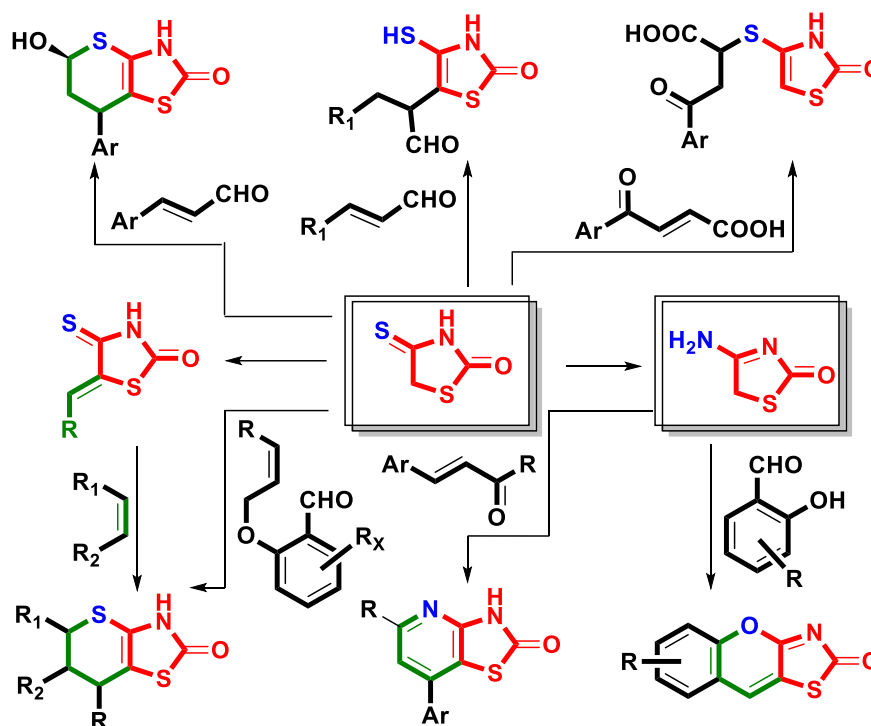


Протягом останніх десятиліть численні дослідження були присвячені синтезу різних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, зокрема шляхом взаємодії

різних дієнофілів та 5-ен-ізороданінів як гетеродієнів в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера. Зокрема було повідомлено про акрилонітрил [360], акрилову кислоту та її аналоги [361], ариліденпіровиноградну [321,322],  $\beta$ -ароїлакрилову [362], малеїнову та фумарову кислоти [363], похідні коричної кислоти [364, 365], 2(5*H*)фуранон [366], 1,4-нафтохінон [124] та похідні норборнену [367] як дієнофіли у синтезі різних тіопіранотіазолів. Крім того, відомими є «доміно» реакції Кньовенагеля-*гетеро*-Дільса-Альдера та ряд тандемних процесів за участю ненасичених ароматичних, аліфатичних альдегідів і кислот з ізороданіном чи 5-ариліден-4-тіазолідинонами з *орто*-фенольною групою в ариліденовому фрагменті у синтезі поліконденсованих тіопірано[2,3-*d*]тіазолів [322, 363, 364, 366, 368-370]. Ряд досліджень також були присвячені вивченню реакції Міхаеля та тандемних реакцій циклізації за Міхаелем в синтезі функціонально-заміщених похідних ізороданіну та конденсованих тіопіранотіазолів [371-374]. Варто відзначити, що по положенню С-4 ізороданіну легко проходять реакції нуклеофільного заміщення, а продукт даної взаємодії, зокрема 4-аміно-5*H*-тіазол-2-он є прекурсором для синтезу похідних тіазоло[4,5-*b*]піридину [324, 332, 336]. Також, реакція 4-аміно-5*H*-тіазол-2-ону з *орто*-заміщеними ароматичними альдегідами призводила до одержання серії бензо[*e*]пірано[2,3-*d*]тіазолів (Схема 4.2) [375].

Відповідно, у наведеному розділі нами опрацьовано нові підходи до одержання оригінальних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу та функціонально-заміщених ізороданінів на основі нових варіантів реакції *гетеро*-Дільса-Альдера, спряженого приєднання (реакція Міхаеля), а також конденсації Кньовенагеля з *орто*-заміщеними ароматичними альдегідами.



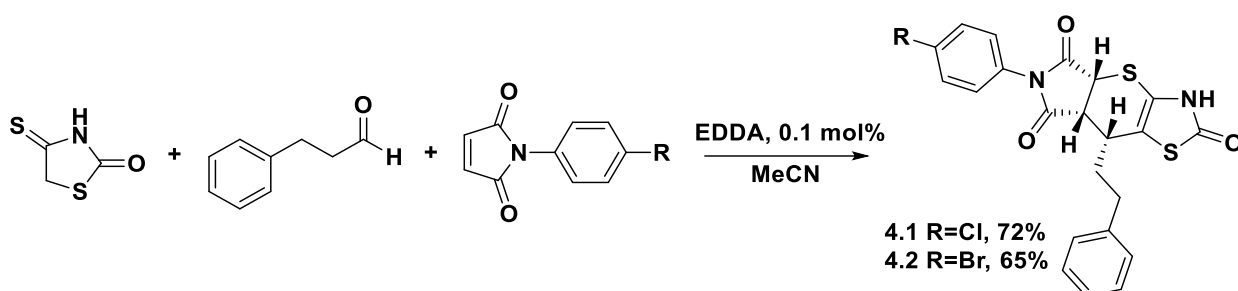


4.1. Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 3-фенілпропаналью та цитралю у заміщених ізороданінів з фрагментами *N*-фенілмалеїнімідів.

Відомо, що аліфатичні альдегіди/кетони мають набагато нижчу реакційну здатність в реакції Кньюенагеля з похідними 4-тіазолідинону ніж ароматичні чи гетероциклічні аналоги. Крім того, препаративна хімія 5-алкіліден-4-тіазолідинонів дуже часто пов'язана з їх низькими виходами і досить складним виділенням продуктів з реакційної суміші. Тому основною ідеєю даного фрагменту роботи стала розробка мультикомпонентного підходу до синтезу нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, який дозволяє уникнути виділення із суміші продукту конденсації Кневенагеля з метою подальшого його перетворення у цільові сполуки. 3-Фенілпропаналь і 3,7-диметилокта-2,6-дієналь (цитраль) рядом авторів було вже досліджено в ряді мультикомпонентних реакцій, а іншим аргументом у виборі даних альдегідів були дані про їх фармакофорні властивості в дизайні біоактивних сполук [376-378].

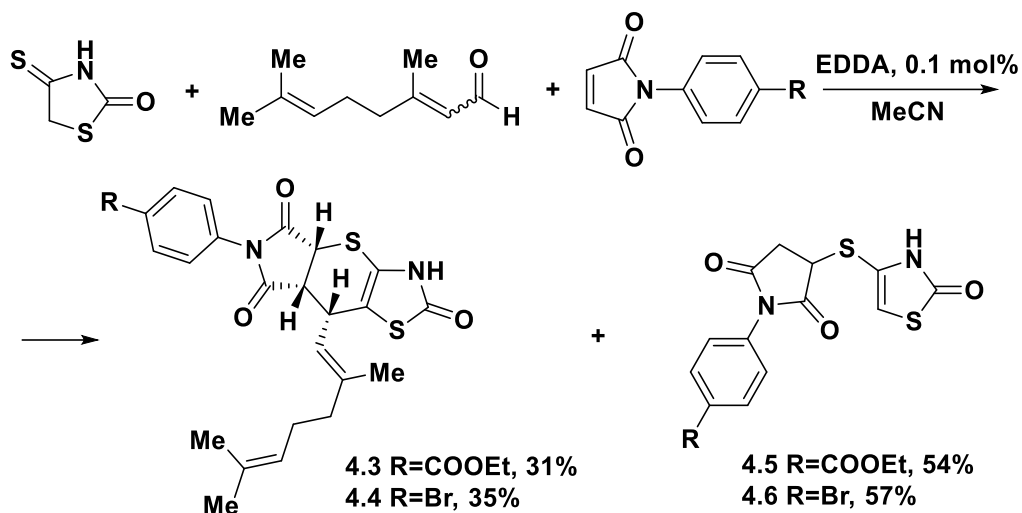
Встановлено, що трикомпонентна взаємодія 4-тіоксо-2-тіазолідинону, 3-фенілпропаналь та *N*-фенілмалеїнімідів як дієнофілів при кип'ятінні в середовищі ацетонітрилу у присутності етилендіамоній діацетату (ЕДДА) як каталізатора призводить до одержання *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-6-(4-феніл)-8-фенетил-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріонів **4.1-4.2** з високими виходами та чистотою (схема 4.3) [379].

Схема 4.3

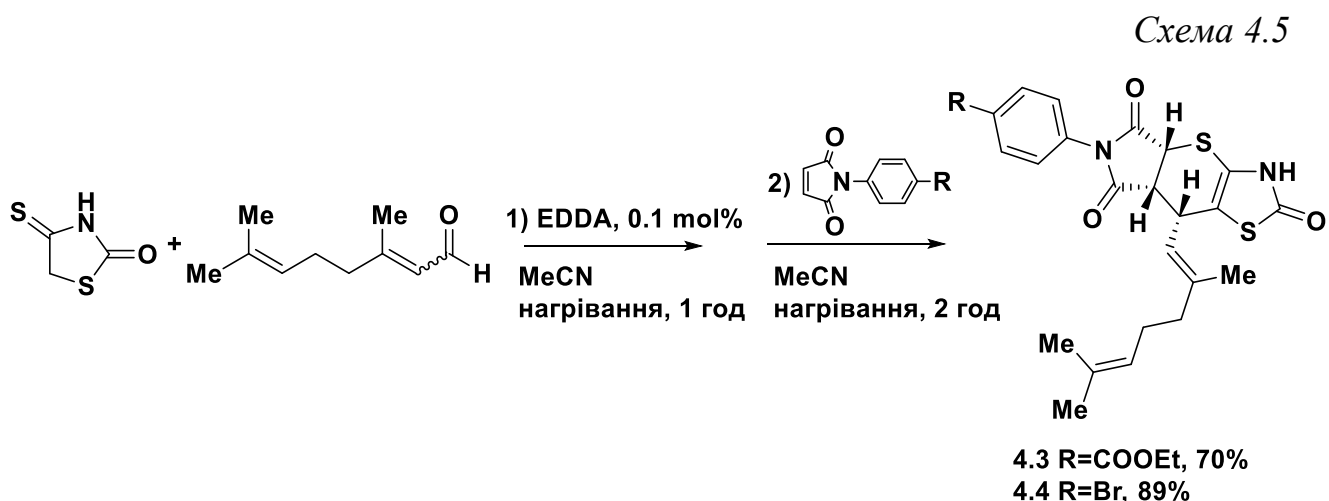


Продовжуючи наші дослідження в конструюванні різноманітних тіопіранотіазолів, нами було проведено взаємодію ізороданіну з 3,7-диметилוקта-2,6-діеналем (цитралем) як карбонільною сполукою, і *N*-фенілмалеїнімідами як дієнофілами при аналогічних умовах. Встановлено, що дане перетворення супроводжується перебігом двох конкурентних реакцій, а саме реакцією *гетеро*-Дільса-Альдера та нуклеофільним приєднанням (реакція Міхаеля) з утворенням відповідних тіопіранотіазолів **4.3-4.4**, а також адуктів Міхаеля **4.5-4.6** зі співвідношенням 31–35: 54–57 %. (Схема 4.4). Суміш сполук **4.3-4.4** та **4.5-4.6** розділяли колонковою хроматографією, а всі виділені сполуки характеризували за допомогою ЯМР та хромато-мас спектроскопії.

Схема 4.4



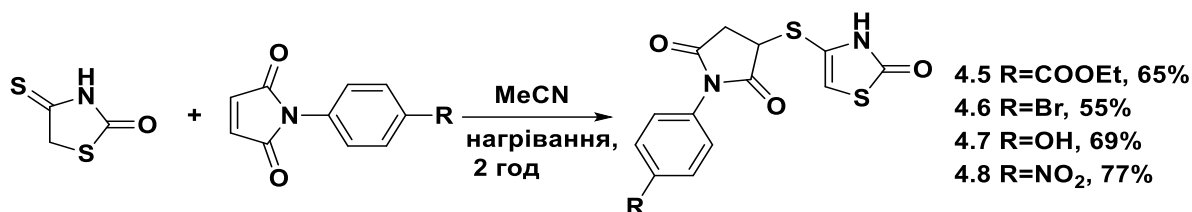
Таку особливість згаданої вище багатокомпонентної реакції можна частково пояснити меншою реакційною здатністю цитралу в реакції Кньювенагеля. Як наслідок для цільового синтезу сполук **4.3-4.4** та уникнення утворення адуктів Міхаеля ми запропонували однореакторний/двохстадійний метод, який включає в себе взаємодію ізороданіну з цитралем при нагріванні протягом 1 год у середовищі ацетонітрилу у присутності ЕДДА як каталізатора на першій стадії та з наступним додаванням *N*-фенілмалеїнімідів і кип'ятінням протягом 2 год на другій стадії (схема 4.5). Варто відзначити, що запропонований однореакторний/двохстадійний підхід має суттєві переваги у виході та чистоті цільових похідних **4.3-4.4** ніж попередній метод.



Нами також був здійснений цільовий синтез продуктів реакції приєднання за Міхаелем **4.5-4.8** шляхом взаємодії ізороданіну та *N*-фенілмалеїнімідів (середовище ацетонітрил, кип'ятіння зі зворотнім холодильником протягом 2

годин (схема 4.6). Варто відзначити, що дана реакція проходить шляхом приєднання за Міхаелем SH-таутомерної форми ізороданіну до подвійного зв'язку *N*-фенілмалеїніміду подібним чином, як було описано для β-ароїлакрилових кислот у наших попередніх роботах [362].

Схема 4.6



Синтезовані сполуки **4.1-4.8** – дрібнокристалічні порошки жовтого (**4.1-4.4**) та коричневого кольорів, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті, нерозчинні у воді, спиртах та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

### Фізико-хімічні характеристики тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі 3-фенілпропаналю та цитралю та заміщених ізороданінів з фрагментами *N*-фенілмалеїнімідів

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °C	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				C, %	H, %	N, %	C, %	H, %	N, %
<b>4.1</b>	72	218-220	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	57,83	3,75	6,13	57,61	3,63	6,24
<b>4.2</b>	65	245-247	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	52,70	3,42	5,59	52,81	3,33	5,64
<b>4.3</b>	31/70	110-112	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	60,92	5,51	5,46	61,08	5,70	5,62
<b>4.4</b>	35/85	96-98	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	53,18	4,46	5,39	53,40	4,61	5,64
<b>4.5</b>	54/65	106-108	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	50,78	3,73	7,40	50,94	3,91	7,52
<b>4.6</b>	57/55	92-94	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	40,53	2,35	7,27	40,68	2,43	7,44
<b>4.7</b>	69	126-128	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	48,44	3,13	8,69	48,68	3,30	8,55
<b>4.8</b>	77	200-202	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	44,44	2,58	11,96	44,61	2,63	12,04

Структура синтезованих сполук **4.1-4.8** підтверджена елементним аналізом, методами <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопії, 2D ЯМР, мас-спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом. Спектральні характеристики сполук наведені у таблиці 4.2.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сполук **4.1**, **4.2** спостерігається сигнал протону С-4а у вигляді дублету при 4,73–4,75 м.ч., дублет дублетів у ділянці 4,03–4,05 м.ч., що відповідає сигналу протону С-7а, триплет дублетів (**4.1**) при 2,92 м.ч. або дублет дублетів (**4.2**) при 2,89 м.ч. віднесених до протону С-8. Протони метиленової групи фенілетильного фрагменту проявляються у вигляді пари мультиплетів в діапазоні 2,09–2,37 м.ч. (**4.1-4.2**) і дублет дублет дублетів (**4.1**) при 2,82 м.ч. або дублету при 2,80 м.ч. (**4.2**). Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР-спектру сполуки **4.1** представлено на рис. 4.1.

**Спектральні характеристики тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі 3-фенілпропаналю та цитралю та заміщених ізороданінів з фрагментами *N*-фенілмалеїнімідів**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
4.1	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,09-2,19, 2,27-2,37 (2* $m$ , 2H, $\text{CH}_2$ ), 2,82 (ддд, 2H, $J = 22,2, 11,6, 7,1$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 2,92 (тд, 1H, $J = 7,6, 4,6$ Гц, 8-H), 4,05 (дд, 1H, $J = 4,6, 8,5$ Гц, 7a-H), 4,75 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц, 4a-H), 7,06 (д, 2H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,21 (т, 2H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 7,25 (д, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,31 (т, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,59 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 11,83 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 32,2, 33,6, 38,6, 47,9, 48,8, 116,1, 120,9, 126,5, 128,7, 128,8, 128,9, 129,7, 131,0, 133,7, 141,5, 170,9, 174,6, 174,7.	457/459
4.2	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,07-2,18, 2,24-2,36 (2* $m$ , 2H, $\text{CH}_2$ ), 2,80 (д, 2H, $J = 15,3$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 2,89 (дд, 1H, $J = 12,6, 6,5$ Гц, 8-H), 4,03 (дд, 1H, $J = 4,6, 8,5$ Гц, 7a-H), 4,73 (д, 1H, $J = 8,1$ Гц, 4a-H), 6,98 (д, 2H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,20-7,29 (м, 5H, аром.), 7,70 (т, 2H, $J = 6,2$ Гц, аром.), 11,80 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 32,2, 33,6, 38,6, 47,9, 48,8, 116,1, 120,9, 122,2, 126,5, 128,7, 128,9, 129,0, 131,4, 132,7, 141,5, 170,9, 174,5, 174,6.	501/503
4.3	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,32 (т, 3H, $J = 7,0$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,54 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1,62 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1,67 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,06 (шс, 4H, 2* $\text{CH}_2$ ), 3,87 (ддд, 2H, $J = 20,0, 8,9, 4,7$ Гц, 7a-H+8-H), 4,33 (кв, 2H, $J = 6,9$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,83 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц, 4a-H), 5,07 (д, 1H, $J = 7,4$ Гц, $\text{CH}=\text{}$ ), 5,74 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц, $\text{CH}=\text{}$ ), 7,25 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 8,08 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 11,74 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 14,5, 16,7, 17,9, 23,5, 25,8, 26,2, 55,8, 61,5, 113,6, 114,8, 120,0, 124,1, 127,1, 130,3, 131,5, 132,0, 132,6, 135,7, 140,5, 165,4, 171,0, 173,3, 174,5.	511/513
4.4	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,53 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1,61 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1,65 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,04 (шс, 4H, 2* $\text{CH}_2$ ), 3,82 (ддд, 2H, $J = 19,0, 9,1, 4,7$ Гц, 7a-H+8-H), 4,79 (д, 1H, $J = 8,7$ Гц, $\text{CH}$ ), 5,06 (шс, 1H, $\text{CH}=\text{}$ ), 5,71 (д, 1H, $J = 8,9$ Гц, $\text{CH}=\text{}$ ), 7,01 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,71 (д, 2H, $J = 8,3$ Гц, аром.), 11,71 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 16,6, 18,0, 25,9, 26,2, 33,6, 43,8, 46,4, 49,4, 118,6, 124,1, 125,6, 129,0, 130,9, 131,4, 132,6, 136,5, 137,4, 140,5, 164,1, 164,8, 170,6.	516/518

Продовження табл. 4.2.

1	2	3
4.5	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 1,31 (т, 3H, J = 6,9 Гц, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,96 (д, 1H, J = 18,5 Гц, CH <sub>2</sub> ), 3,39 (дд, 1H, J = 18,5, 9,3 Гц, CH <sub>2</sub> ), 4,32 (д, J = 7,2 Гц, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4,46 (д, 1H, J = 9,1 Гц, CH), 6,79 (с, 1H, CH), 7,38 (д, 2H, J = 7,8 Гц, аром.), 8,04 (д, 2H, J = 7,8 Гц, аром.), 11,75 (с, 1H, NH).	379
4.6	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,98 (дд, 1H, J = 18,5, 3,1 Гц, CH <sub>2</sub> ), 3,36 (дд, 1H, J = 18,5, 9,1 Гц, CH <sub>2</sub> ), 4,43 (дд, 1H, J = 9,1, 3,1 Гц, CH), 6,78 (с, 1H, CH), 7,17 (д, 2H, J = 8,4 Гц, аром.), 7,69 (д, 2H, J = 8,4 Гц, аром.), 11,74 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 44,0, 46,3, 112,2, 121,3, 121,9, 129,3, 132,4, 162,7, 172,2, 174,0, 176,3.	385/387
4.7	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,90 (дд, 1H, J = 18,5, 3,1 Гц, CH <sub>2</sub> ), 3,33 (дд, 1H, J = 18,5, 9,3 Гц, CH <sub>2</sub> ), 4,38 (дд, 1H, J = 9,3, 3,1 Гц, CH), 6,77 (с, 1H, CH), 6,80 (д, 2H, J = 8,0 Гц, аром.), 6,94 (д, 2H, J = 8,0 Гц, аром.), 9,73 (с, 1H, OH), 11,71 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 36,4, 43,9, 112,2, 115,8, 121,2, 123,5, 128,5, 157,8, 162,0, 172,2, 174,5.	323
4.8	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,98 (дд, 1H, J = 18,5, 3,4 Гц, CH <sub>2</sub> ), 3,42 (дд, 1H, J = 18,5, 9,2 Гц, CH <sub>2</sub> ), 4,99 (дд, 1H, J = 9,2, 3,4 Гц, CH), 6,80 (с, 1H, CH), 7,56 (д, 2H, J = 8,8 Гц, аром.), 8,36 (д, 2H, J = 8,8 Гц, аром.), 11,75 (с, 1H, NH).	352

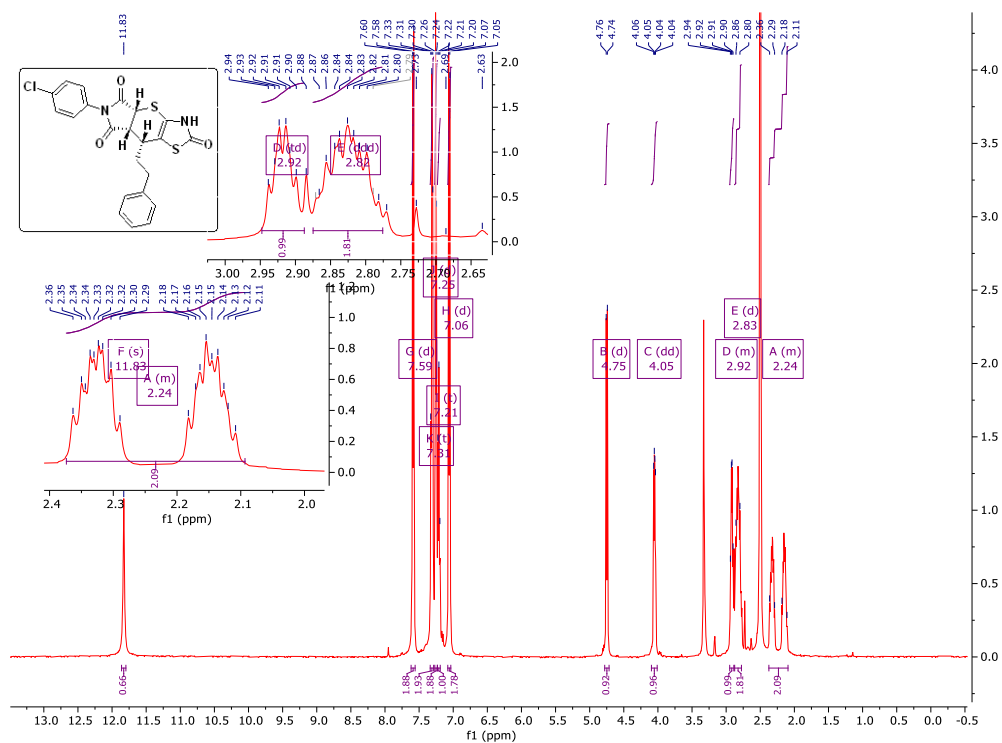


Рис 4.1. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР *rel*-(4a*R*,7a*R*,8*R*)-6-(4-хлорофеніл)-8-фенетил-3,4a,7a,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріону **4.1**.

Дослідження 2D ЯМР (HMBC, HSQC, COSY, NOESY) на прикладі сполуки **4.1**. були проведені для більш детального дослідження особливостей стереохімії синтезованих сполук. Порівняння відповідних кореляційних паттернів COSY та NOESY протона С-8 показало відсутність сигналу NOE із сусідніми протонами метиленоюї групи у фенілетильному фрагменті (рис. 4.2). Приклади 2D ЯМР сполуки **4.1** представлено на рис. 4.3.

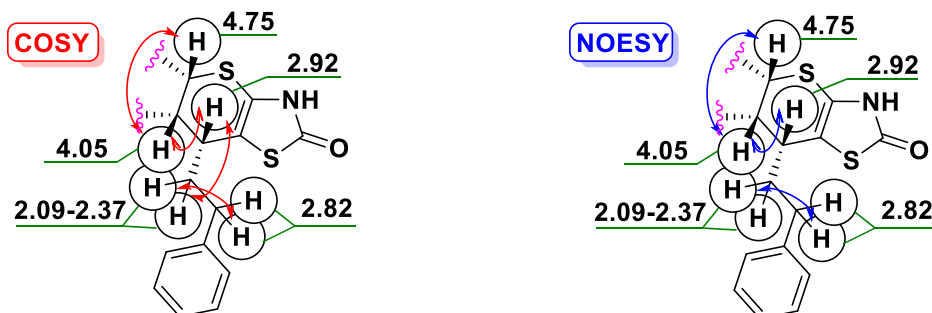


Рис 4.2. Хімічні зсуви для ключових протонів сполуки **4.1** у  $^1\text{H}$  ЯМР з відповідними взаємодіями у спектрах COSY та NOESY.



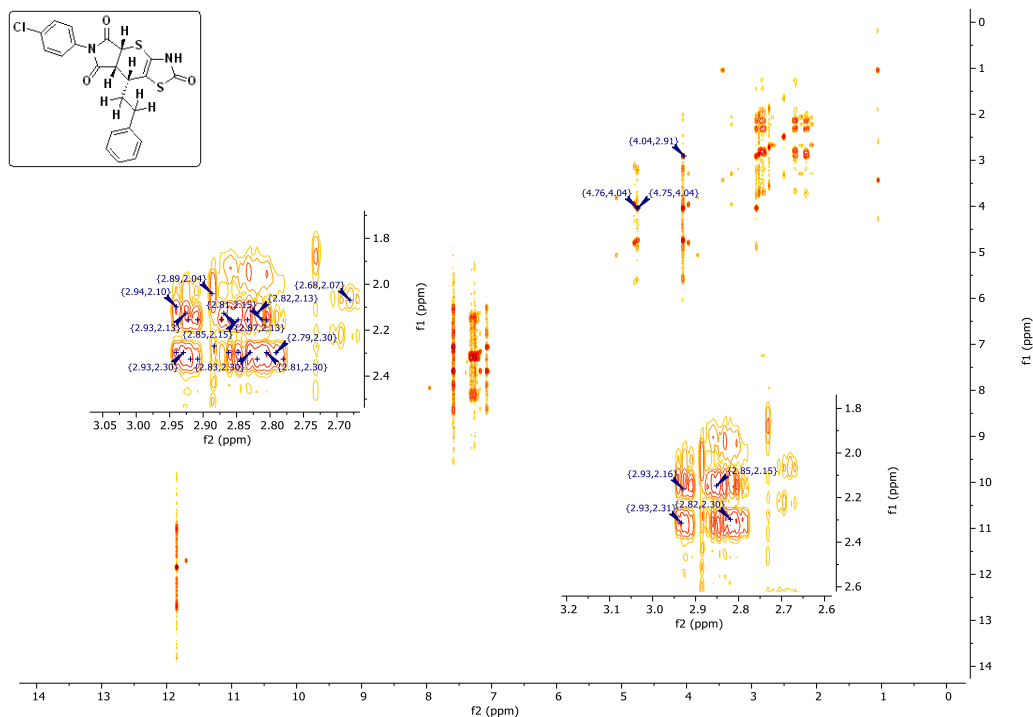


Рис 4.3. COSY спектр сполуки 4.1.

Структура синтезованих тіопіранотіазолів **4.1**, **4.2** була також підтверджена рентгеноструктурним аналізом (Рис 4.4). Дослідження показали, що сполуки відрізняються лише типом галогену в положенні С14 (**4.1**: Cl; **4.2**: Br) і виявляють високий ступінь ізоструктурності. Також варто відзначити, що в порівнюваних кристалічних структурах сполук **4.1**, **4.2** спостерігаються однакові міжмолекулярні взаємодії (таблиці 4.3, 4.4). Кількісні показники ізоструктурності  $I_a^{\max}$ ,  $I_a$ ,  $I_c$ ,  $\text{RMSD}_A$  та  $\text{RMSD}_c$  для цієї пари досліджуваних кристалічних структур становлять 100,0 %, 99,96 %, 99,72 %, 0,055 Å та 0,152 Å, відповідно. Завдяки майже ідентичній геометрії молекул (рис. 4.3) і дуже високій подібності кристалічної структури сполук **4.1** і **4.2** (рис. 4.4), обговорення отриманих структурних результатів було детально проведено для сполуки **4.1**.

У результаті досліджень встановлено, що в 3,4а,7а,8-тетрагідропіроло[3'4':5,6]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріоновій системі наявний подвійний зв'язок між вузловими атомами С-3а і С-8а, а також

одинарний зв'язок між вузловими атомами С-4а і С-7а. Це підтверджується міжатомними відстанями С3а–С8а [1,339 (3) Å] та С4а–С7а [1,534 (3) Å], які близькі довжин подвійного та одинарного С-С зв'язків представлених у літературі, які становлять 1,331(1) і 1,530 (1) Å, відповідно. У плоскій системі тіазолін-2-ону відзначається наявність вторинної амідної групи. Локація атому гідрогену була визначена на основі карт Фур'є і була вільно встановленою. Його локалізація була підтверджена водневим зв'язком N3–H3 ⋯ O9<sup>i</sup> (табл 4.3, рис. 4.5), у якому роль акцептора протону відіграє карбонільний атом кисню O9. Дослідження показали, що системи піролідин-2,5-діону і дигідротіопірану конденсовані у формі *цис*-декаліну. Двогранний кут між площинами найменших квадратів даних циклів дорівнює 82,96(7)°. Крім того, атоми гідрогену в стереогенних центрах С-4а, С-7а і С-8 знаходяться в парах H4A/H7A і H7A/H8 в *цис*-конфігурації один до одного. Знайдені торсійні кути H4A–С4а–С7а–H7A та H7A–С7а–С8–H8A близько 2 і 60° виявляють синперипланарну та синклінальну конформацію, відповідно. Дигідротіопіранове кільце має конформацію човна [параметри модифікації Кремера та Попла [380] Q = 0,789(2) Å, θ = 91,95(15)°, φ = 182,11(18)°]. У кристалічній ґратці сполуки **4.1**, молекули пов'язані 2<sub>1</sub> обертанням і *b*-трансляцією та з'єднані водневими зв'язками С12–H12⋯O17<sup>ii</sup> і С15–H15⋯O10<sup>iii</sup> (таблиця 4.3, рис. 4.5а і b) у стовпці, і вони з'єднані водневими зв'язками N3–H3⋯O9<sup>i</sup> у шари, що розташовані паралельно до площини *ab* (таблиця 4.3, рис. 4.5а). Товщина шару, що складається з молекул сполуки **4.1**, з'єднаних водневими зв'язками, становить *c*/2. Окрім водневих зв'язків у кристалі досліджуваної сполуки також спостерігаються взаємодії С7а–H7A⋯Cg2<sup>iv</sup>, С15–H15⋯Cg3<sup>v</sup>, С7 = O17⋯Cg1<sup>vi</sup> та С14–С11⋯Cg2<sup>vii</sup> [381, 382]. Перші три взаємодії з'єднують молекули всередині стовбців, тоді як остання взаємодія з'єднує молекули з сусідніх шарів (таблиця 4.3, рис. 4.6).

Варто відзначити, що на основі результатів ЯМР спектроскопії та рентгеноструктурного аналізу було встановлено, що сполуки **4.1** та **4.2** існують у вигляді рацемічної суміші, що підтверджує діастереоселективний перебіг реакції їхнього утворення.

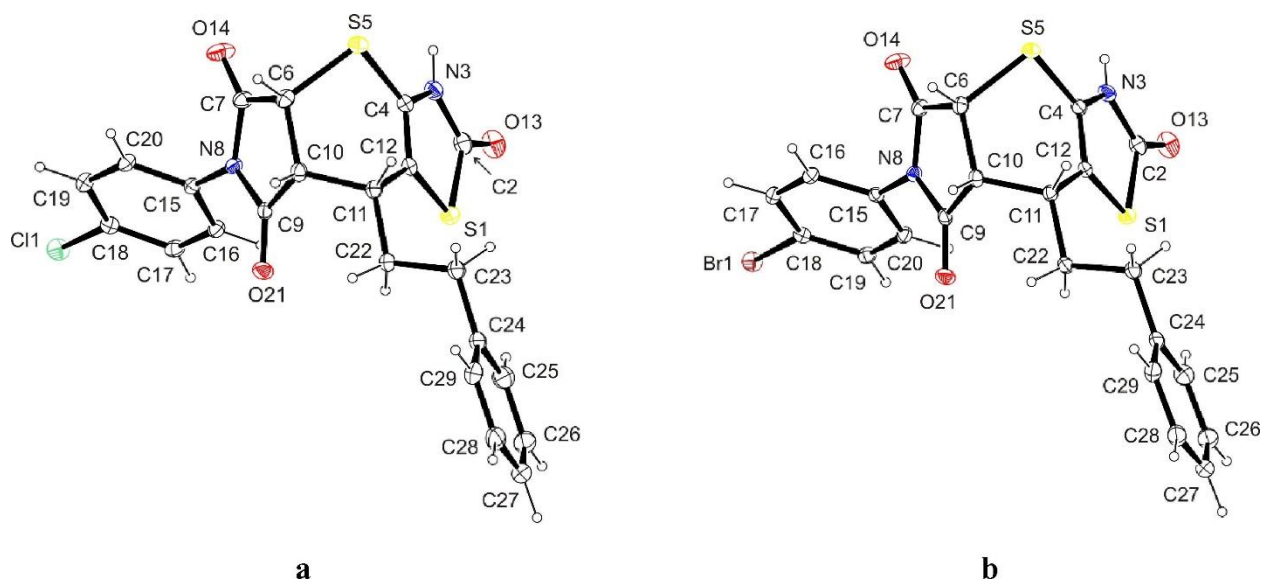


Рис 4.4. ORTEP вигляд сполук **4.1** та **4.2** зображено еліпсоїдами з 30-відсотковим відхиленням від рівноважного положення. Атоми водню показано як сфери довільного радіусу.

Таблиця 4.3

**Водневі зв'язки та  $Y-X \cdots Cg$  взаємодії у кристалічній структурі сполуки **4.1**.**

$D-H \cdots A$	$D-H$ (Å)	$H \cdots A$ (Å)	$D \cdots A$ (Å)	$D-H \cdots A$ (°)
$N3-H3 \cdots O9^i$	0,91(4)	1,88(4)	2,785(3)	177(4)
$C12-H12 \cdots O17^{ii}$	0,95	2,58	3,346(3)	138
$C15-H15 \cdots O10^{iii}$	0,95	2,54	3,084(3)	117
$Y-X \cdots Cg$	$Y-X$ (Å)	$X \cdots Cg$ (Å)	$Y \cdots Cg$ (Å)	$Y-X \cdots Cg$ (°)
$C7a-H7A \cdots Cg2^{ii}$	1,00	2,55	3,479(2)	155
$C13-H13 \cdots Cg3^{ii}$	0,95	2,75	3,675(3)	166
$C7=O17 \cdots Cg1^{iv}$	1,207(3)	3,148(2)	3,961(2)	124,67(15)
$C14-Cl1 \cdots Cg2^v$	1,735(2)	3,6649(11)	3,791(2)	80,63(8)

Коди симетрії: (i)  $3/2-x, -1/2+y, 3/2-z$ , (ii)  $1/2-x, -1/2+y, 3/2-z$ , (iii)  $x, 1+y, z$ , (iv)  $1/2-x, -3/2+y, 3/2-z$ , (v)  $-x, -y, 1-z$ ;  $Cg1$ : піролідин-2,5-діонова система,  $Cg2$ : фенільний цикл (C11 – C16),  $Cg3$ : фенільний цикл (C20 – C25)

Таблиця 4.4

**Водневі зв'язки та  $Y-X \cdots Cg$  взаємодії у кристалічній структурі сполуки **4.2**.**

$D-H \cdots A$	$D-H$ (Å)	$H \cdots A$ (Å)	$D \cdots A$ (Å)	$D-H \cdots A$ (°)
$N3-H3 \cdots O9^i$	0,77(3)	2,04(3)	2,807(2)	179(4)
$C12-H12 \cdots O17^{ii}$	0,95	2,55	3,332(2)	139

C15—H15...O10 <sup>iii</sup>	0,95	2,57	3,133(2)	118
<b>Y—X...Cg</b>	<b>Y—X (Å)</b>	<b>X...Cg (Å)</b>	<b>Y...Cg (Å)</b>	<b>Y—X...Cg (°)</b>
C7a—H7A...Cg2 <sup>ii</sup>	1,00	2,55	3,4874(17)	156
C13—H13...Cg3 <sup>ii</sup>	0,95	2,78	3,7069(19)	167
C7=O17...Cg1 <sup>iv</sup>	1,213(2)	3,1556(16)	3,9877(17)	125,74(11)
C14—Br1...Cg2 <sup>v</sup>	1,8944(16)	3,6587(7)	3,9091(17)	82,98(5)

Коди симетрії: (i)  $3/2-x, -1/2+y, 3/2-z$ , (ii)  $1/2-x, -1/2+y, 3/2-z$ , (iii)  $x, 1+y, z$ , (iv)  $1/2-x, -3/2+y, 3/2-z$ , (v)  $-x, -y, 1-z$ ; Cg1: піролідин-2,5-діонова система, Cg2: фенільний цикл (C11 – C16), Cg3: фенільний цикл (C20 – C25)

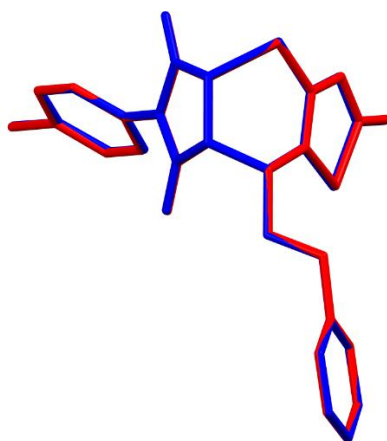


Рис 4.5. Накладені молекулярні структури сполуки **4.1** (червоний) та **4.2** (синій).

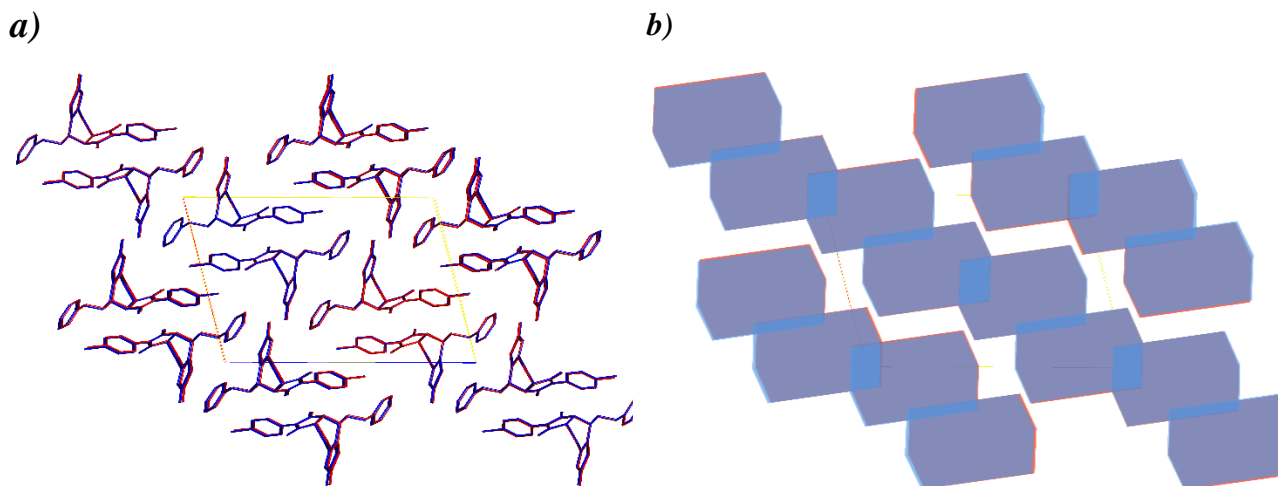


Рис 4.6. Перекриття кристалічних структур **4.1** (червоний) та **4.2** (синій); (а) вигляд розташування молекул, (б) вигляд кубоїдів, що представляють молекули. Проекція по осі *b*.

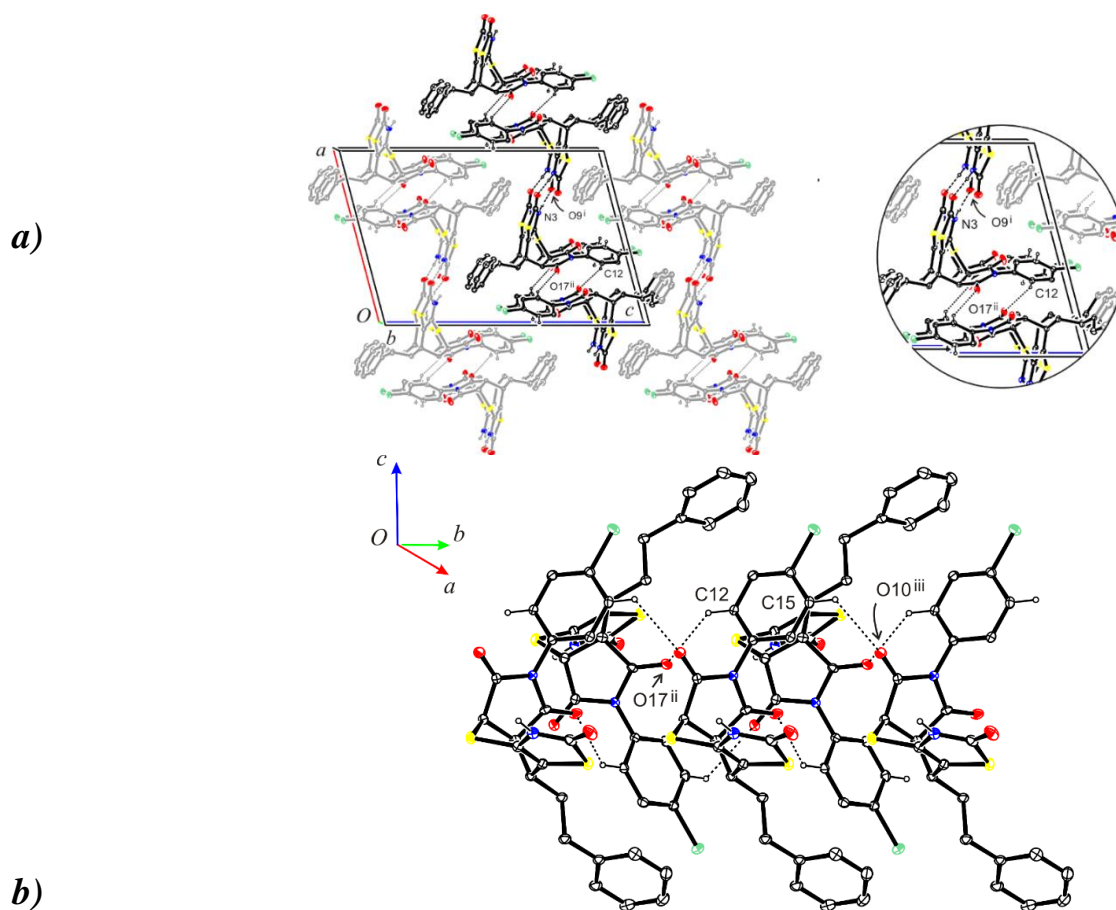


Рис 4.7. Водневі зв'язки у кристалічній структурі сполуки **4.1**.

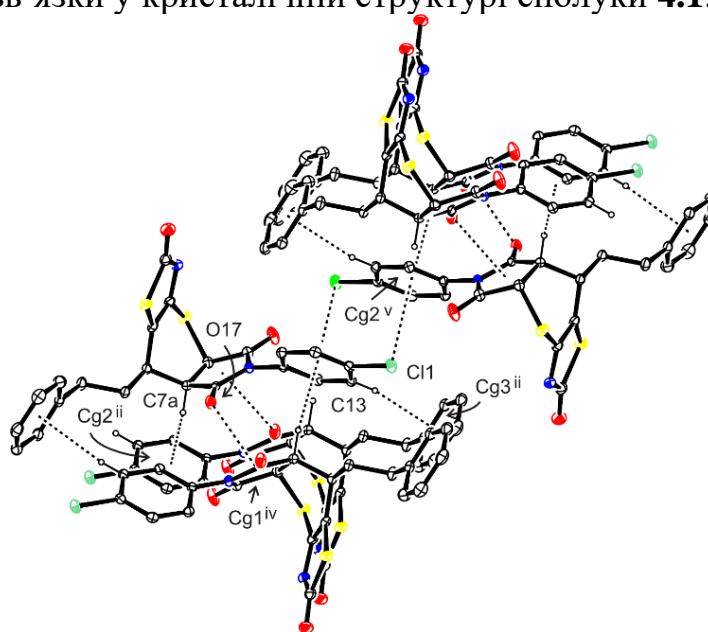


Рис 4.8. Y–X $\cdots$ Cg взаємодії у кристалічній структурі сполуки **4.1**; Cg1: піролідин-2,5-діонова система, Cg2: фенільний цикл (C11 – C16), Cg3: фенільний цикл (C20 – C25). Коди симетрії представлені у таблиці 4.3.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР синтезованих похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу **4.3**, **4.4** протони фрагмента цитралю проявляються у вигляді трьох синглетів при 1,53-1,67 м.ч. (три метильні групи), широкого синглету (дві  $\text{CH}_2$  групи) при 2,04-2,06 м.ч. і двом сигналам у ділянках 5.06–5.07 та 5.74-5.81 м.ч., що відповідають олефіновим протонам. Протони тіопіранового ядра резонують як дублет дублет дублетів при 3,82 м.ч. (**4.3**) і 3,87 м.ч. (**4.4**) (протони С-7а та С-8) та як дублет при 4.78 м.ч. (**4.3**) і 4,83 м.ч. (**4.4**) (протон С-4а). У спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР сполук **4.3**, **4.4** сигнали карбонільних груп ( $\text{C}=\text{O}$ ) спостерігаються при  $\delta$  160,4–170,6 м.ч. Сигнали карбонів метильних груп цитрального фрагмента спостерігалися при  $\delta$  16.6–25.9 м.ч. Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР-спектру сполуки **4.3** представлено на рис. 4.9.

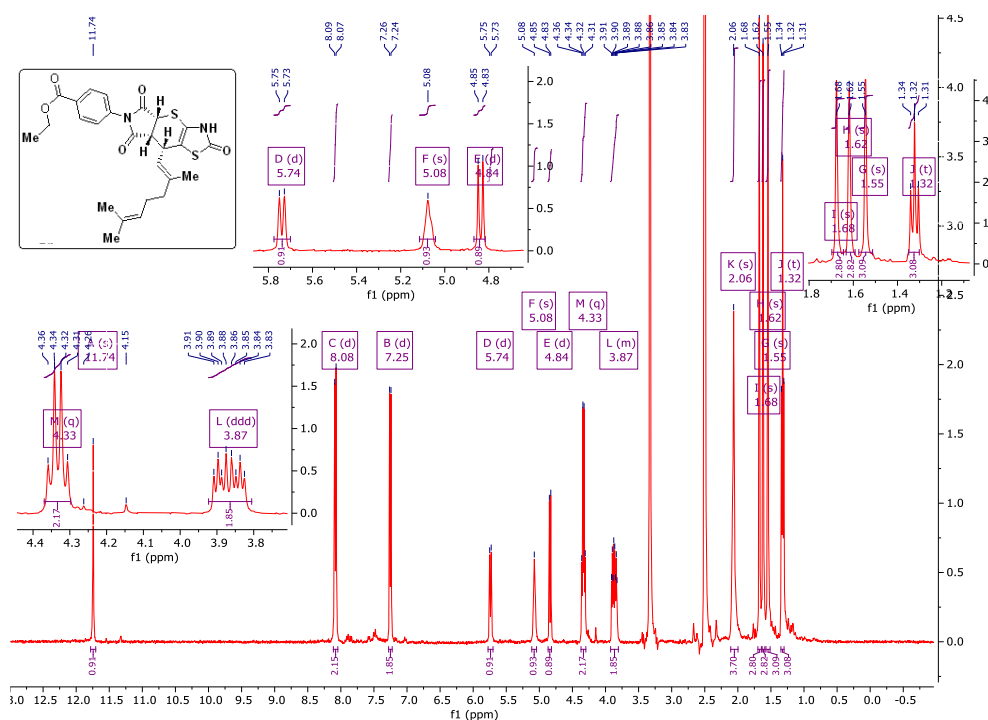


Рис 4.9. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР Етил 4-((4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-2,5,7-тріоксо-3,4*a*,5,7,7*a*,8-гексагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6(2*H*)-іл)бензоату **4.3**.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сполук **4.5-4.8** протони  $\text{CH}_2\text{-CH}$  піролідинового фрагменту демонструють характерну картину системи АМХ. Хімічні зсуви протонів  $\text{H}_\text{A}$ ,  $\text{H}_\text{M}$  і  $\text{H}_\text{X}$  були в ділянках  $\delta \approx 2,90$ , 3,3–3,4 та 4,4–4,9 м.ч, з відповідними константами спіні-спінової взаємодії (КССВ)  $J_{\text{AM}} = 18,5$ ,  $J_{\text{AX}} = 9,1$ –

9,3, та  $J_{MX} = 3,1-3,4$  Гц, відповідно. Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР-спектру сполуки **4.3** представлено на рис. 4.10.

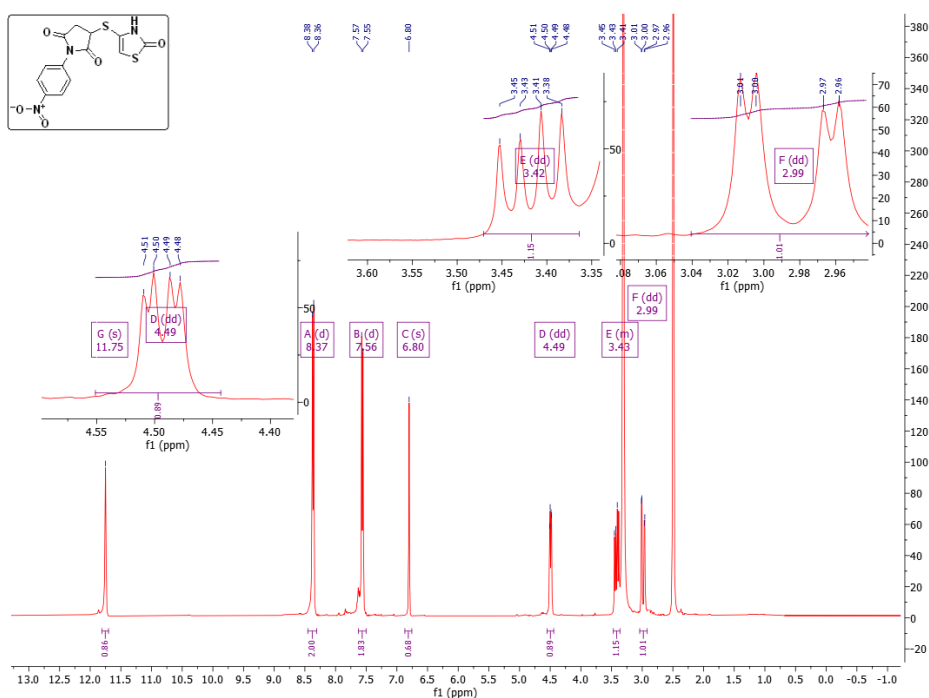


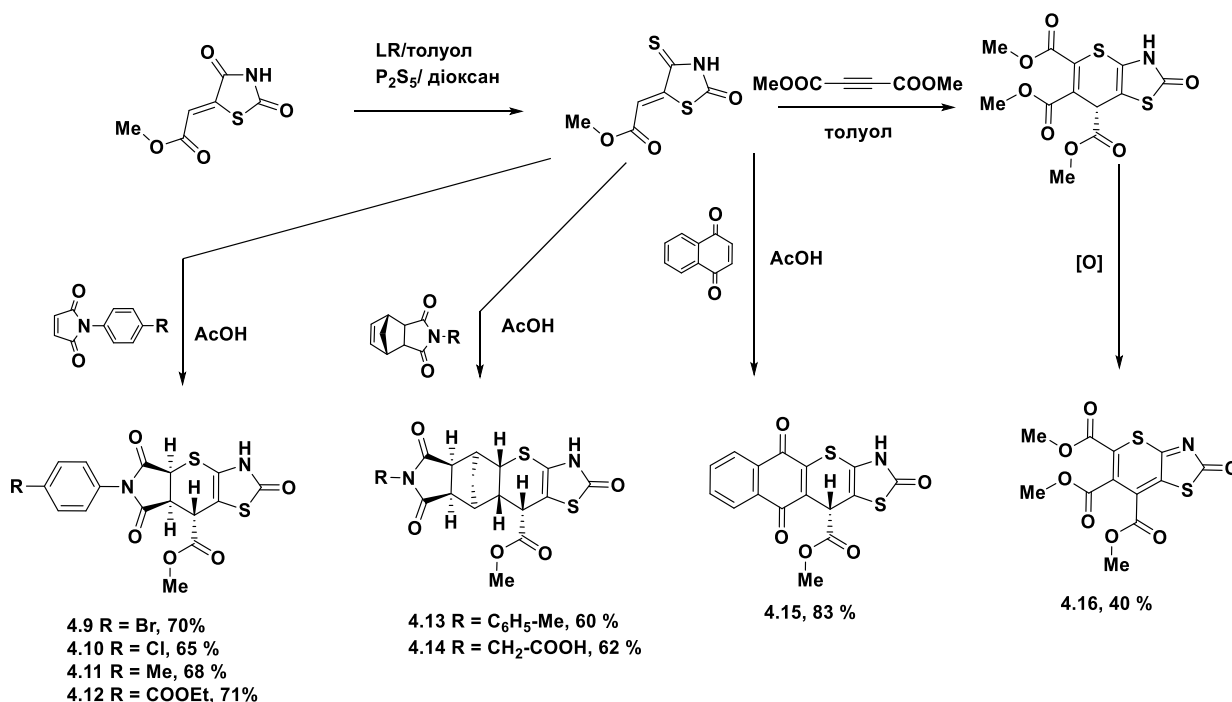
Рис 4.10. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР 1-(4-Нітрофеніл)-3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідин-2,5-діону **4.8**.

#### 4.2. Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату

Продовжуючи вивчення нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів нами було здійснено синтез зазначених сполук виходячи з метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату як гетеродієну та ряду дієнофілів в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера. Вихідний метиловий естер (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)-оцтової кислоти був одержаний в умовах реакції тіонування пентасульфідом фосфору ( $\text{P}_2\text{S}_5$ ) або реактивом Лавессона метилового естеру (2,4-діоксотіоксотіазолідин-5-іліден)-оцтової кислоти у середовищі безводного діоксану або толуолу. В подальшому зазначений продукт тіонування у якості гетеродієну був введений у реакцію *гетеро*-Дільса-Альдера із рядом

дієнофілів, зокрема *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохіноном та диметилним ефіром ацетилендикарбонової кислоти у середовищі оцтової кислоти та в присутності гідрокінону як інгібітора процесів побічної реакції полімеризації. Варто відзначити, що у випадку використання диметилцетилендикарбоксилату як дієнофілу спостерігалось не утворення очікуваного триметил (7*S*)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату, а продукту його оксидації, а саме триметил 2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату **4.16**. Варто відзначити, що процес оксидування тіопіранотіазольного ядра зустрічається у ряді наукових досліджень, зокрема присвячених використанню «доміно» реакції Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера та реакції Міхаелівського приєднання у синтезі різних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу [362, 369].

Схема 4.7



Сполуки **4.9-4.16** - дрібнокристалічні порошки білого (**4.9-4.12**), сірого (**4.13-4.15**) чи жовтого (**4.16**) кольорів, розчинні в ДМФА, при нагріванні в оцтовій кислоті, нерозчинні в спиртах, воді та ефірі. Фізико-хімічні характеристики наведено в таблиці 4.5. Структура та чистота синтезованих



сполук підтверджена елементним аналізом та методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопії (табл. 4.6).

Таблиця 4.5

**Фізико-хімічні характеристики похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату**

Сполука	Вихід %	Т.пл., °C	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				C, %	H, %	N, %	C, %	H, %	N, %
<b>4.9</b>	70	227-229	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}_2$	42,21	2,44	6,15	42,33	2,52	6,03
<b>4.10</b>	65	223-225	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}_2$	46,78	2,70	6,82	46,57	2,81	6,93
<b>4.11</b>	68	238-240	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$	52,30	3,61	7,18	52,44	3,52	7,30
<b>4.12</b>	71	143-145	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$	50,89	3,60	6,25	51,02	3,73	6,11
<b>4.13</b>	60	267-268	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$	57,88	4,42	6,14	57,99	4,31	6,22
<b>4.14</b>	62	>300	$\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$	55,19	4,03	5,60	55,29	4,15	5,41
<b>4.15</b>	83	>300	$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_5\text{S}_2$	53,48	2,52	3,90	53,62	2,71	4,03
<b>4.16</b>	40	177-178	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_7\text{S}_2$	41,98	2,64	4,08	42,09	2,78	4,15

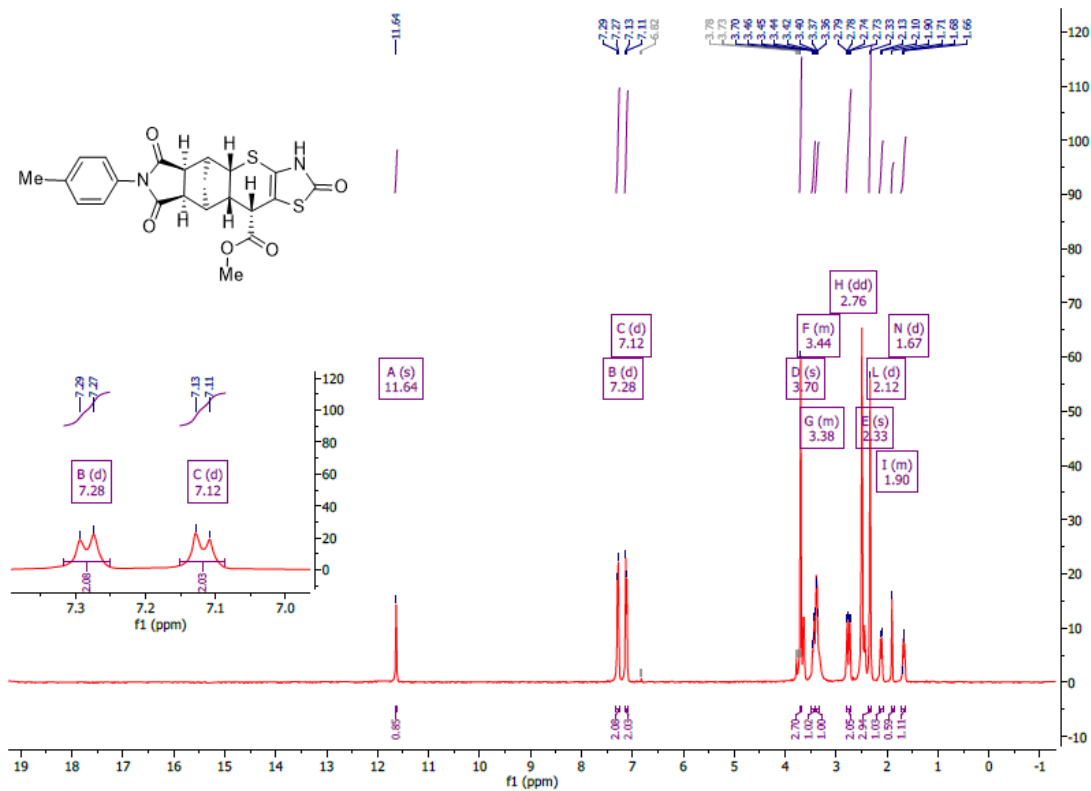
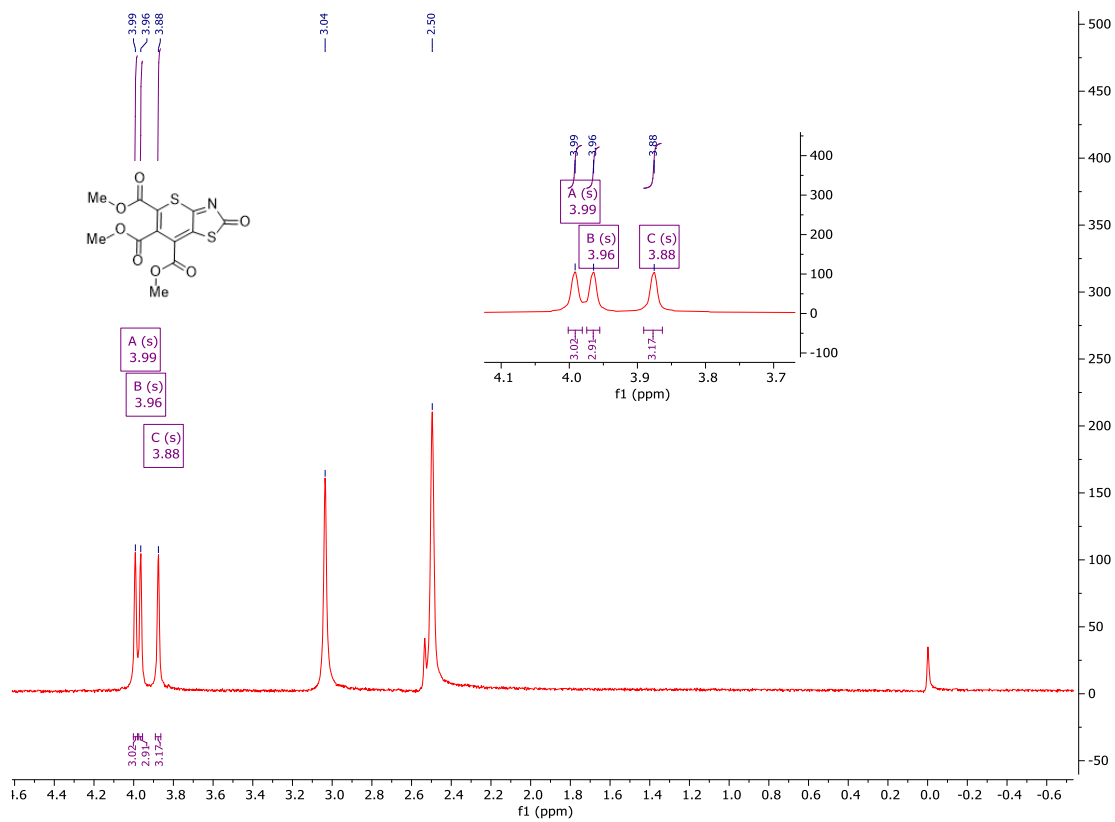
Таблиця 4.6

**Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату**

Сполука	Спектр $^1\text{H}$ -ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)
<b>4.9</b>	3,85 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,11 (д, 1H, $J = 3,6$ Гц, 7-Н), 4,42 (дд, 1H, $J = 3,8, 7,6$ Гц, 6-Н), 4,75 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, 5-Н), 7,15 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 7,61 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 11,61 (с, 1H, NH),
<b>4.10</b>	3,79 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,04 (д, 1H, $J = 3,6$ Гц, 7-Н), 4,31 (дд, 1H, $J = 4,0, 7,6$ Гц, 6-Н), 4,72 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, 5-Н), 7,12 (д, 2H, $J = 6,8$ Гц, аром.), 7,45 (д, 2H, $J = 6,8$ Гц, аром.), 11,59 (с, 1H, NH),
<b>4.11</b>	2,37 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,79 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,01 (д, 1H, $J = 3,6$ Гц, 7-Н), 4,32 (дд, 1H, $J = 3,6, 7,2$ Гц, 6-Н), 4,69 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, 5-Н), 6,95 (д, 2H, $J = 6,8$ Гц, аром.), 7,22 (д, 2H, $J = 6,8$ Гц, аром.), 11,58 (с, 1H, NH),
<b>4.12</b>	1,32 (т, 3H, $J = 7,6$ Гц, $\text{CH}_3$ ), 3,75 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,23 (д, 1H, $J = 4,0$ Гц, 7-Н), 4,32 (кв, 2H, $J = 9,0$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 4,43 (дд, 1H, $J = 4,0, 9,0$ Гц, 6-Н), 4,89 (д, 1H, $J = 9,0$ Гц, 5-Н), 7,35 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 8,08 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 11,78 (с, 1H, NH),
<b>4.13</b>	1,67 (д, 1H, $J = 5,6$ Hz, 9a-Н), 1,92 (м, 1H, 4a-Н), 2,12 (д, 1H, $J = 5,7$ Гц, 10-Н), 2,33 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,76 (дд, 2H, $J = 5,2, 10,2$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 3,41 (м, 1H, 8a-Н), 3,48 (м, 1H, 5a-Н), 3,70 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,12 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 7,28 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 11,64 (с, 1H, NH),

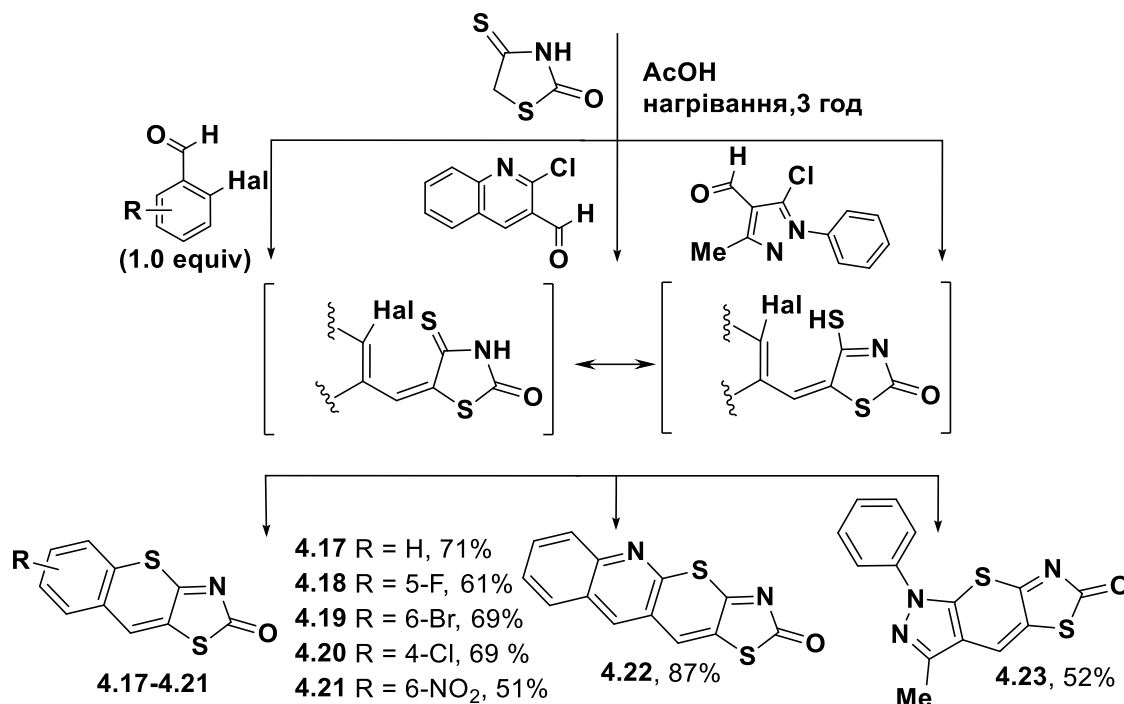
<b>4.14</b>	1,77 (д, 1H, $J = 4,0$ Гц, 9a-H), 2,32 (д, 1H, $J = 4,0$ Гц, 4a-H), 2,45 (д, 1H, $J = 4,0$ Гц, 10-H), 3,25 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, 8a-H), 3,31 (м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,51 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, 5a-H), 3,75 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,05 (м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 11,41 (с, 1H, NH),
<b>4.15</b>	2,94 (с, 1H, CH <sub>3</sub> ), 3,44 (с, 1H, 11-H), 8,11 (м, 1H, аром.), 8,33 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 8,46 (д, 1H, $J = 7,0$ Гц, аром.), 8,58 (м, 1H, аром.), 10,08 (с, 1H, NH),
<b>4.16</b>	3,88 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,96 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,99 (с, 3H, CH <sub>3</sub> )

На основі аналізу спектрів <sup>1</sup>H ЯМР похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату встановлено, що у процесі синтезу зазначених сполук в умовах реакції *гетеро*-Дільса-Альдера дієнофіли, а саме *N*-фенілмалеїніміди, іміди 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохінон та диметилцетилендикарбоксилат реагують стереоселективно з утворенням виключно однієї пари діастереомерів. Зокрема, у спектрах <sup>1</sup>H ЯМР сполук **4.9-4.14** протон СН групи зв'язаної з метилацетатним фрагментом проявляється у вигляді дублету при 4,01-4,23 м.ч. з константою спінової взаємодії в межах  $J = 3,8-4,0$  Гц, що свідчить про його відносне *транс*-розташування до протонів *N*-фенілмалеїнімідного та взаємне *цис*-розташування відносно норборненового фрагментів. У спектрах <sup>1</sup>H ЯМР сполук **4.13-4.14** для норборнанового фрагменту характерною є система сигналів в області 1,77-3,31 м.ч., а для сполуки **4.15** спостерігається характерний субспектр протонів нафтохінонового фрагменту в ділянці 8.11-8.58 м.ч. Сигнал протонів метильної групи естерного фрагменту у синтезованих сполук **4.9-4.16** проявляється у вигляді синглету в ділянці 2,94-3,88 м.ч. Проходження оксидації тіопірано[2,3-*d*]тіазольного ядра за умов використання диметилцетилендикарбоксилату як дієнофілу (сполука **4.17**) у спектрах <sup>1</sup>H ЯМР підтверджено за відсутністю сигналу амідного протону, а також сигналу СН протон у положенні С-7. Приклад <sup>1</sup>H ЯМР спектрів сполук **4.13** та **4.16** представлено на рис. 4.11, 4.12.

Рис. 4.11. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки 4.13.Рис. 4.12. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки 4.16.

### 4.3. Синтез нових поліциклічних тіопіраноїдів в умовах реакції Кньювенагеля з *орто*-галоген заміщеними альдегідами

Відповідно до попередніх досліджень присвячених синтезу конденсованих гетероциклічних систем, нами було використано *орто*-галоген заміщені альдегіди в умовах реакції Кньювенагеля у одержанні нових поліциклічних тіопіраноїдів **4.17-4.23**. Так, при взаємодії 4-тіоксо-2-тіазолідинону та *орто*-галоген заміщених альдегідів в середовищі оцтової кислоти у присутності ацетату натрію як каталізатора при нагріванні під зворотнім холодильником було одержано ряд конденсованих похідних 1,4-дитіа-3-азо-циклопента[*b*]нафтален-2-ону **4.17-4.21**, 1,4-дитіо-3,5-діазо-циклопента[*b*]антрацен-2-ону **4.22** і 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріазо-*s*-індацен-6-ону **4.23** (схема 4.8) [383, 384]. Нами було запропоновано можливий механізм утворення зазначених сполук, що ґрунтується на тому, що на першому етапі відбувається конденсація Кньювенагеля між 4-тіоксо-2-тіазолідиноном як метиленактивною сполукою та *орто*-галоген заміщеними альдегідами через реакцію нуклефільного приєднання, яке супроводжується відщепленням протону від активної метиленової групи, а утворений карбаніон взаємодіє з карбонільною групою відповідного альдегіду з відщепленням молекули води. Утворений внаслідок даної реакції ациклічний інтермедіат, як  $\alpha,\beta$ -спряжений енон зазнає подальшої внутрішньомолекулярної циклізації і таутомеризації шляхом нуклеофільного приєднання галогену до тіокарбонільної групи у положенні С-4 тіазолідинонового ядра з подальшим відщепленням гідроген галогеніду з подальшим утворенням цільових сполук **4.17-4.23**. Слід зазначити, що подібний механізм реакції був встановлений для структурно-споріднених сполук, а саме хромено[2,3-*d*]тіазол-2-онів одержаних в результаті реакції 4-амінотіазол-2(5*H*)-ону та заміщених саліцилових альдегідів [375].



Сполуки **4.17-4.23** - дрібнокристалічні порошки золотистого кольору, розчинні в ДМФА, при нагріванні в оцтовій кислоті, нерозчинні в спиртах, воді та ефірі. Структура та чистота синтезованих сполук підтверджена елементним аналізом та методом <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопії (табл. 4.7). Фізико-хімічні характеристики наведено в таблиці 4.8.

При аналізі спектрів <sup>1</sup>H ЯМР синтезованих сполук **4.17-4.23** проявляється характерний сигнал =CH протону тіопіранового ядра у вигляді синглету у ділянці δ 8,55-8,93 м.ч. Окрім того, у спектрах <sup>1</sup>H ЯМР також спостерігається відсутність сигналу амідного протону. <sup>13</sup>C ЯМР синтезованих сполук спостерігаються сигнали вуглецю карбонільної групи (C=O) у ділянці 172,4–185,5 м.ч. Приклад <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектрів 1,4-дитіа-3-аза-циклопента[*b*]нафтален-2-ону **4.17** представлено на рис. 4.13, 4.14.

Таблиця 4.7

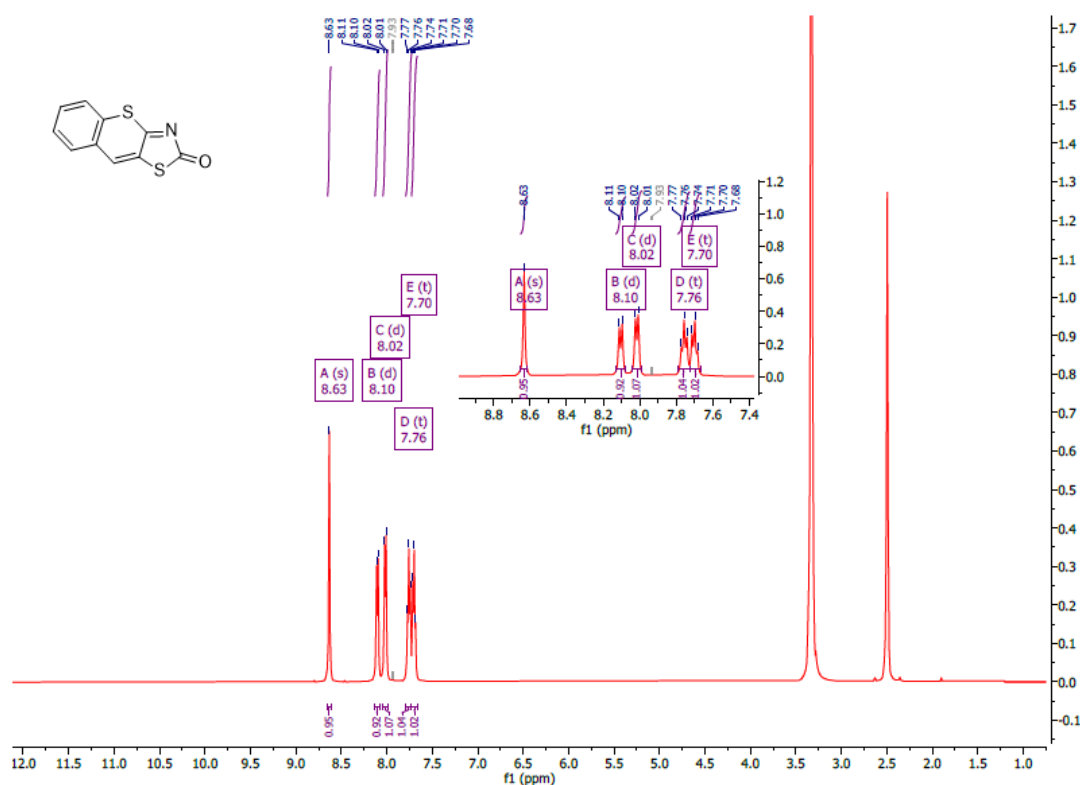
Спектральні характеристики тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі орто-галоген заміщеними альдегідів

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
1	2	3
<b>4.17</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7.68-7.77 (м, 2H, CH), 8.01 (д, 1H, $J = 7.5$ Гц, CH), 8.10 (д, 1H, $J = 7.8$ Гц, CH), 8.63 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 127.2, 127.3, 128.9, 131.2, 131.8, 132.2 (9a-C), 134.3, 134.4 (3a-C), 178.8 (2-C).	220
<b>4.18</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7.62 (т, 1H, $J = 8.5$ Гц, CH), 8.11 (дд, 1H, $J = 5.9, 8.5$ Гц, CH), 8.17 (д, 1H, $J = 7.9$ Гц, CH), 8.65 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 113.9 (д, $J = 25.0$ Гц, C-F), 116.5, 117.4 (д, $J = 25.0$ Гц, C-F), 121.2, 124.3 (9a-C), 133.6 (3a-C), 133.8 (д, $J = 10.0$ Гц, C-F), 134.9 (д, $J = 10.0$ Гц, C-F), 162.6 (д, $J = 250.0$ Гц, C-F), 178.4 (2-C).	236/238
<b>4.19</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7.93 (д, 1H, $J = 8.2$ Гц, CH), 8.09 (д, 1H, $J = 8.5$ Гц, CH), 8.28 (с, 1H, CH), 8.55 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 121.5, 128.9, 129.3, 130.9, 132.8, 133.6 (9a-C), 133.9, 135.5 (3a-C), 178.9 (2-C).	297/299
<b>4.20</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7.75 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, CH), 7.98 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, CH), 8.04 (d, 1H, $J = 7.5$ Гц, CH), 8.68 (s, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 121.4, 128.8, 129.1, 132.7, 133.6, 133.8 (9a-C), 135.5, 135.6 (3a-C), 178.9 (2-C).	252/254
<b>4.21</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 8.39 (д, 1H, $J = 8.9$ Гц, CH), 8.47 (дд, 1H, $J = 1.9, 8.9$ Гц, CH), 8.78 (с, 1H, CH), 8.93 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 124.3, 126.8, 127.6, 129.0, 133.1, 136.2 (9a-C), 137.9, 146.9 (3a-C), 179.0 (2-C).	265
<b>4.22</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7.79 (т, 1H, $J = 8.2$ Гц, CH), 8.02 (т, 1H, $J = 8.5$ Гц, CH), 8.14 (д, 1H, $J = 7.6$ Гц, CH), 8.27 (д, 1H, $J = 7.5$ Гц, CH), 8.69 (с, 1H, CH), 9.08 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 111.1, 115.2, 118.5, 122.1, 126.5, 128.3, 130.0, 144.39, 157.4 (11a-C), 162.3, 164.0 (3a-C), 189.5 (2-C).	271
<b>4.23</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2.57 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7.55 (т, 1H, $J = 7.3$ Гц, аром.), 7.67 (т, 2H, $J = 7.4$ Гц, аром.), 7.79 (д, 2H, $J = 7.6$ Гц, аром.), 8.75 (с, 1H, CH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 11.8 (CH <sub>3</sub> ), 40.4, 116.4, 122.6, 128.0, 129.4, 130.6, 135.1, 137.9 (4a-C), 149.1 (7a-C), 172.4 (2-C).	302

Таблиця 4.8

**Фізико-хімічні характеристики поліциклічних тіопіраноїдів на основі  
орто-галоген заміщеними альдегідів**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>4.17</b>	71	216-218	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> NOS <sub>2</sub>	54,77	2,30	6,39	54,82	2,24	6,32
<b>4.18</b>	61	>240	C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> FNOS <sub>2</sub>	50,62	1,70	5,90	50,51	1,84	5,82
<b>4.19</b>	69	>240	C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> BrNOS <sub>2</sub>	40,28	1,35	4,70	40,41	1,24	4,82
<b>4.20</b>	69	208-210	C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> ClNOS <sub>2</sub>	47,34	1,59	5,52	47,30	1,54	5,48
<b>4.21</b>	51	>240	C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	45,45	1,53	10,60	57,61	2,34	10,42
<b>4.22</b>	87	>240	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	57,76	2,24	10,36	57,61	2,34	10,42
<b>4.23</b>	52	>240	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> OS <sub>2</sub>	55,79	3,68	13,94	55,70	3,59	13,88

Рис. 4.13. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР сполуки 4.17.

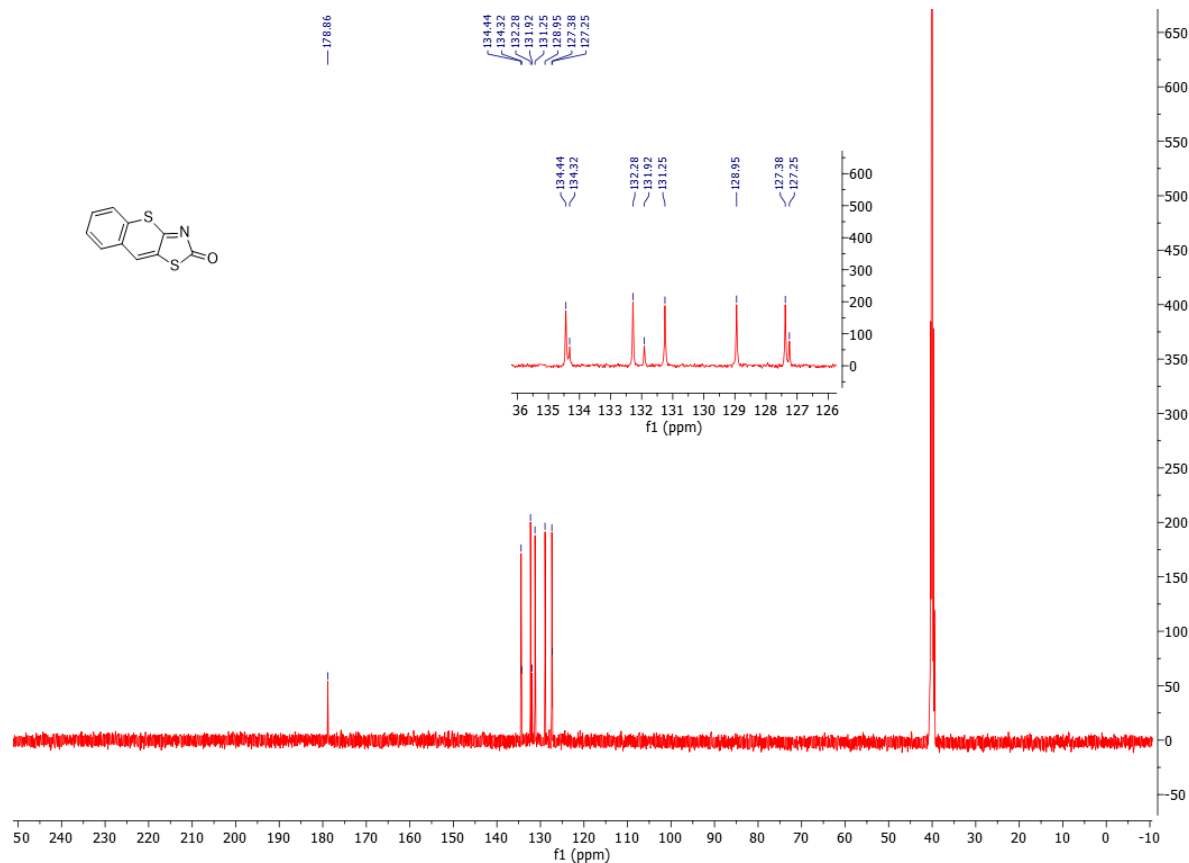


Рис. 4.14. Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР сполуки **4.17**.

Варто відзначити, що чотири похідних з даного класу синтезованих поліциклічних тіопіраноїдів (сполуки **4.17**, **4.18**, **4.22** та **4.23**) були відібрані та протестовані на протипухлинну активність в рамках програми DTP NCI (табл. 4.9, додатки Г.1-Г.4). На основі результатів зазначеного скринінгового дослідження дані сполуки проявили низький рівень біологічної активності, проте варто відзначити слабкий ефект досліджуваних сполук **4.17**, **4.18**, **4.22**, за винятком **4.23** на лінію EKVX недрібноклітинного раку легень із значенням показників пригнічення росту (GR, %) в межах 48,00-58,49 %. З іншого боку, синтезований 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріазо-*s*-індацен-6-он (сполука **4.23**) проявив слабкий рівень активності щодо лінії UO-31 раку нирок із показником пригнічення росту 64,60 %.



**Сумарні результати прескринінгу протипухлинної активності  
поліциклічних тіопіраноїдів на 60 лініях клітин (концентрація  $10^{-5}M$ )**

Сполука	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>4.17**</b>	98,88	58,49÷117,32	EKVX, недрібноклітинний рак легень / 58,49
<b>4.18</b>	98,06	49,26÷115,33	EKVX, недрібноклітинний рак легень / 49,26
<b>4.22</b>	112,15	48,00÷140,14	EKVX, недрібноклітинний рак легень / 48,00
<b>4.23**</b>	101,50	64,60÷128,91	UO-31, рак нирок / 64,60

\* Для окремих ліній наведені дані з GP%  $\leq$  50%.

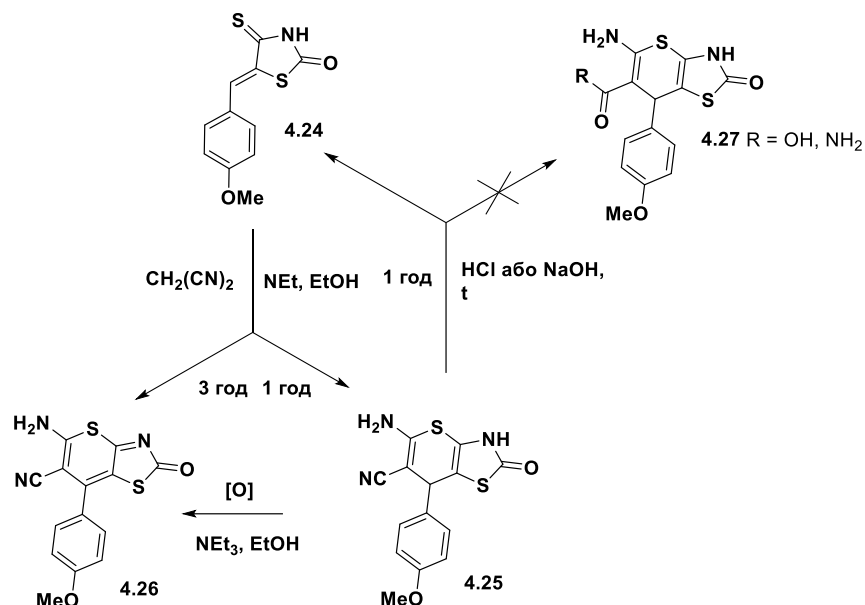
\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результат мітотичної активності однієї найбільш чутливої лінії.

#### 4.4. Синтез похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу в умовах реакції Міхаелівського приєднання та їх подальша функціоналізація

Різні варіанти реакцій приєднання за Міхаелем є також одними із ефективних підходів у одержанні похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, які проте в науковій літературі описані доволі спорадично. Так, зокрема, було повідомлено про використання активованих нітрילів, які шляхом взаємодії із ізороданіном призводили до утворення серії функціонально-заміщених тіопіранотіазолів [371, 372]. Також було розроблено новий підхід до органокаталітичного одержання тіопірано[2,3-*d*]тіазолів виходячи із ізороданіну, ненасичених альдегідів в умовах тандемної реакції приєднання за Міхаелем з подальшою гетероциклізацією [374]. У наших попередніх роботах також було повідомлено про новий метод синтезу тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, який базувався на взаємодії малондинітрилу та 5-ариліденізороданіну **4.24** в середовищі абсолютного етанолу та в присутності триетиламіну як каталізатора [362]. Варто відзначити, що при одержанні цільового 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-

дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **4.25** його більш тривале кип'ятіння в аналогічних реакційних умовах призводило до утворення його оксидованого продукту, а саме 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **4.26**.

Відомо, що сполуки, які вміщують нітрильний фрагмент у структурі мають здатність до кислотного гідролізу з утворенням відповідних карбонових кислот в умовах двохстадійного перетворення, а саме трансформації нітрилу у амід і його подальший гідроліз до відповідної карбонової кислоти [385, 386]. Як наслідок, з метою досліджень нових напрямків функціоналізації попередньо синтезованих похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, нами було здійснено кислотний гідроліз 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **4.25** концентрованою соляною кислотою при нагріванні [387]. Варто відзначити, що у результаті даної реакції нами не спостерігалось одержання очікуваного продукту, а саме 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонової кислоти **4.27**. Продуктом реакції ідентифіковано вихідний 5-(4-метоксибензиліден)-4-тіоксо-2-тіазолідинон **4.24**. Продовжуючи дослідження у цьому напрямі нами було проведено лужний гідроліз похідного **4.25** гідроксидом натрію у середовищі етанолу плануючи одержати відповідний амід **4.27**, який проте також призводив до одержання вихідного 5-ариліденізороданіну **4.24** (схема 4.9) [387]. Варто зазначити, науковий інтерес у вивченні даних типів перетворень полягає у тому, що було вперше проведено реакцію гідролізу похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, які до того вважалися сполуками стійкими до впливу на них концентрованих кислот та лугів. З іншого боку, у процесі гідролізу одержано похідні 5-ариліденізороданіну, що можна вважати зустрічним методом їхнього синтезу, хоча не варто доцільним з точки зору синтетичної доступності.



Сполуки **4.24-4.26** - дрібнокристалічні порошки червоного (**4.24**), сірого (**4.25**) та коричневого (**4.26**) кольорів, розчинні в ДМФА, при нагріванні в оцтовій кислоті, нерозчинні в толуолі, воді та ефірі. Фізико-хімічні характеристики, структура та чистота синтезованих сполук підтверджена елементним аналізом та методом ЯМР спектроскопії наведено в таблиці 4.10.

Таблиця 4.10

**Фізико-хімічні та спектральні характеристики похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу та продукту їхнього гідролізу**

Сполука	Вихід, %	T <sub>топл</sub> , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %	Знайдено, %	Спектр ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц)	LC-MS, m/z
<b>4.24</b>	55/79	172-174	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C 52,57 H 3,61 N 5,57	C 52,51 H 3,74 N 5,62	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 3,86 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,14 (д, 2H, J = 8,7 Гц, аром.), 7,68 (д, 2H, J = 8,7 Гц, аром.), 8,10 (с, 1H, CH), 13,81 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: 58,1, 115,6, 133,3, 135,8, 141,4, 148,7, 163,4, 165,6, 181,3.	252 (M+H) <sup>+</sup> , 100,0% (кислотний гідроліз); 250 (M-H) <sup>+</sup> , 100,0% (лужний гідроліз)
<b>4.25</b>	65	Фізико-хімічні та спектральні характеристики наведені у [362].					
<b>4.26</b>	55	Фізико-хімічні та спектральні характеристики наведені у [362].					

Структура 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **4.25** та його оксидованого продукту 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонітрилу **4.26** детально встановлена методами  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії, хромато-мас-спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом та була детально описана у наших попередніх дослідженнях [362]. Гідролітичне розщеплення сполуки **4.25** у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР підтверджено типовою картиною притаманною для 5-ариліден похідних ізороданіну, а саме сигналом протону метиліденової групи у вигляді широкого синглету при  $\sigma$  8.10 м.ч. та сигналу амідного протону у ділянці слабкого магнітного поля при 13.10 м.ч. Сигнали протонів притаманних вихідній сполуці **4.25**, а саме СН протон у положенні С-7 та аміно група у положенні С-5 тіопіранового ядра не спостерігалось. Окрім того, абсолютна чистота (100%) одержаного продукту **4.24** за допомогою двох типів гідролізу підтверджена хромато-мас-спектрометрією з утворенням молекулярного іону 252 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  у випадку кислотного гідролізу та 250 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^+$  у випадку лужного гідролізу (Рис. 4.15).



Рис. 4.15. Хромато-мас спектр сполуки **4.24**.

#### 4.5. Експериментальна частина.

*Загальна методика синтезу 6-заміщених rel-(4aR,7aR,8R)-8-фенетил-3,4a,7a,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-d]тіазол-2,5,7(6H)-тріонів (4.1-4.2)*

Суміш 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинону, 0,0055 моль 3-фенілпропаналю, 0,005 моль 1-(4-бромфеніл)- або 1-(4-хлорфеніл)-1*H*-пірол-2,5-діону та 0,0005 моль етилендіамоній діацетату (ЕДДА) у середовищі ацетонітрилу нагрівають протягом 2 годин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають ацетонітрилом, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Загальна методика синтезу 6-заміщених rel-(4aR,7aR,8R)-8-((E)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-3,4a,7a,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-d]тіазол-2,5,7(6H)-тріонів (4.3-4.4)*

**Метод А.** 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинону, 0,0055 моль цитралю та 0,005 моль відповідного *N*-фенілмалеїніміду у середовищі ацетонітрилу нагрівають протягом 2 годин у колбі із зворотнім холодильником у присутності 0,0005 моль ЕДДА як каталізатора. Завершення реакції фіксують шляхом відбору аліквоти та її аналізу методом ТШХ на планшетах Silufol-254 (елюент EtOAc/CHCl<sub>3</sub> 1:4). Через 2 години було встановлено завершення проходження реакції, а реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і відфільтровують через шар Celigel (суміш 50% силікагелю змішаного з 50% целітом) та випарюють розчинник до сухого залишку. Отриманий продукт в подальшому очищають хроматографічно на силікагелі використовуючи як елюент суміш EtOAc/CHCl<sub>3</sub> у співвідношеннях 1:6 або 1:3. **Метод Б.** У колбу поміщають 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинону та 0,0055 моль цитралю та нагрівають протягом 1 години у середовищі ацетонітрилу в присутності ЕДДА як каталізатора. Після цього до реакційної суміші додають 0,005 моль відповідного *N*-фенілмалеїніміду та продовжують нагрівання протягом 2 годин. Вміст колби повністю охолоджують, продукт реакції осаджують водою,

відфільтровують, промивають водою, висушують і очищають хроматографічно на силікагелі з використанням суміші EtOAc/CHCl<sub>3</sub> як елюенту в співвідношеннях 1:6 або 1:3.

*Загальна методика синтезу 1-заміщеного 3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідин-2,5-діонів (4.5-4.8)*

Суміш 0,005 моль відповідного *N*-фенілмалеїніміду та 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинонупоміщають у колбу зі зворотнім холодильником та нагрівають протягом 2 годин у середовищі ацетонітрилу. Контроль перебігу реакції постійно контролюють методом ТШХ на планшетах Silufol-254 (елюент EtOAc/C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> 1:2). Вміст колби повністю охолоджують, продукт реакції осаджують водою, відфільтровують, промивають водою, висушують і перекристалізують з суміші EtOAc-гексан (1:2) (4.5, 4.6) або оцтової кислоти (4.7, 4.8).

*Загальна методика синтезу метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату*

У тригорлу колбу з магнітною мішалкою та зворотнім холодильником поміщають 0,1 моль метилового естеру (2,4-діоксо-тіоксотіазолідин-5-іліден)-оцтової кислоти, 1 мл безводного піридину, 100 мл абсолютного діоксану. При постійному перемішуванні та нагріванні порціями додають 0,1 моль P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> або 0,05 моль реактиву Лавессона. Кип'ятять протягом 2 годин. Реакційну суміш після повного охолодження осаджують водою. Одержаний продукт використовують без попередньої кристалізації.

*Загальна методика синтезу метил (4aS,7aS,8S)-6-(4-феніл)-2,5,7-тріоксо-2,3,4a,5,6,7,7a,8-октагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-d]тіазол-8-карбоксилатів (4.9-4.12), метил (4aS,5aR,8aR,9aS,10S)-7-заміщених-2,6,8-тріоксо-2,3,4a,5,5a,6,7,8,8a,9,9a,10-додекагідро-5,9-метанотіазоло[5',4':5,6]тіопірано[2,3-f]ізоіндоло-10-карбоксилатів (4.13-4.14) та метил (S)-2,5,10-тріоксо-3,5,10,11-тетрагідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-11-карбоксилату (4.15)*

У колбу поміщають 0,005 моль метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату, 0,0055 моль відповідного дієнофілу (*N*-фенілмалеїніміду, іміду 5-

норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохінону), декілька кристалів гідрохінону нагрівають протягом 1 год у 10 мл оцтової кислоти із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Загальна методика синтезу триметил 2-оксо-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату (4.16)*

Суміш 0,005 моль метил (2-оксо-4-тіоксотіазолідин-5-іліден)ацетату, 0,0055 моль диметилцетилендикарбоксилату поміщають у колбу зі зворотнім холодильником та нагрівають протягом 2 годин у середовищі толуолу. Утворений осад відфільтровують, промивають толуолом, гексаном та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти.

*Загальна методика синтезу 1,4-дитіа-3-азо-циклопента[b]нафтален-2-ону (4.17-4.21), 1,4-дитіо-3,5-діазо-циклопента[b]антрацен-2-ону (4.22) та 3-метил-1-феніл-3H-5,8-дитіо-1,2,7-тріазо-s-індацен-6-ону (4.23)*

У колбу поміщають 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинону, 0,005 моль відповідного альдегіду та 0,005 моль ацетату натрію та нагрівають протягом 3 год у 10 мл оцтової кислоти із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти або суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Загальна методика кислотного гідролізу 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу з отриманням 5-(4-метоксибензиліден)-4-тіоксо-2-тіазолідинону (4.24)*

0,005 моль 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу нагрівають у колбі зі зворотнім холодильником протягом 1 години в 10 мл концентрованої соляної кислоти. Після охолодження утворений осад відфільтровують, промивають водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти.

*Загальна методика лужного гідролізу 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу з отриманням 5-(4-метоксибензиліден)-4-тіоксо-2-тіазолідинону (4.24)*

Суміш 0,005 моль 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу, 0,015 моль NaOH нагрівають у колбі зі зворотним холодильником протягом 1 години в 10 мл етанолу. Після охолодження утворений осад відфільтровують, промивають водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти.

*Загальна методика синтезу 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-3,7-дигідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу (4.25)*

Суміш 0,005 моль 5-(4-метоксибензиліден)-4-тіоксо-2-тіазолідинону, 0,005 моль малонодинітрилу нагрівають у колбі зі зворотним холодильником протягом 1 години в 10 мл абсолютного етанолу у присутності каталітичної кількості триетиламіну (TEA). Після охолодження утворений осад відфільтровують, промивають етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з етанолу.

*Загальна методика синтезу 5-аміно-7-(4-метоксифеніл)-2-оксо-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-6-карбонітрилу (4.26)*

У круглодонну колбу із зворотнім холодильником поміщають 0.005 моль 5-(4-метоксибензиліден)-4-тіоксо-2-тіазолідинону та 0.005 моль малонодинітрилу та каталітичну кількість TEA. Реакцію суміш кип'ятять протягом 3 годин, потім охолоджують. Утворений осад відфільтровують, промивають етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-етанол (1:2).

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що трикомпонентна реакція 4-тіоксо-2-тіазолідинону, 3-фенілпропаналью/3,7-диметилокта-2,6-діеналю (цитралю) та N-фенілмалеїнімідів як дієнофілів при кип'ятінні в середовищі ацетонітрилу у присутності етилендіамоній діацетату (ЕДДА) як каталізатора призводить до одержання *rel*-(4aR,7aR,8R)-6-(4-феніл)-8-фенетил-3,4a,7a,8-



тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріонів та *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,5,7(6*H*)-тріонів. Показано, що використання цитралю супроводжується перебігом двох конкурентних реакцій, а саме реакцією *гетеро*-Дільса-Альдера та нуклеофільним приєднанням (реакція Міхаеля) з утворенням відповідних тіопіранотіазолів, а також адуктів Міхаеля, які були розділені методом колонкової хроматографії.

2. Встановлено, що взаємодія 4-тіоксо-2-тіазолідинону з *N*-фенілмалеїнімідами відбувається шляхом SH-приєднання за Міхаелем з утворенням нових 1-(4-феніл)-3-((2-оксо-2,3-дигідротіазол-4-іл)тіо)піролідін-2,5-діонів.

3. Вперше встановлено, що реакція 4-тіоксо-2-тіазолідинону та *орто*-галоген заміщених альдегідів дозволяє одержати неописані в літературі конденсовані похідні 1,4-дитіа-3-азо-циклопента[*b*]нафтален-2-ону, 1,4-дитіо-3,5-діазо-циклопента[*b*]антрацен-2-ону і 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіо-1,2,7-тріазо-*s*-індацен-6-ону, які є перспективними об'єктами для досліджень методами медичної хімії.

4. Показано, що метиловий естер (2,4-діоксотіоксотіазолідін-5-іліден)-оцтової кислоти діастереоселективно вступає в реакцію *гетеро*-Дільса-Альдера з *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-нафтохіноном, що дозволило одержати ряд нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, причому для *N*-фенілмалеїнімідів утворюються похідні з *транс*-конфігурацією 5-Н, 6-Н та 7-Н протонів (*rel*-(4*aS*,7*aS*,8*S*) пари діастереомерів), а для імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти – з *цис*-конфігурацією хіральних центрів 4*a*-Н, 5*a*-Н, 8*a*-Н, 9*a*-Н та 10-Н (*rel*-(4*aS*,5*S*,5*aR*,8*aR*,9*R*,9*aS*,10*S*)-ізомери). У випадку використання диметилцетилендикарбоксилату як дієнофілу спостерігалось не утворення очікуваного триметил (7*S*)-2-оксо-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату, а продукту його оксидації – триметил 2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5,6,7-трикарбоксилату.

5. Показано, що реакція приєнання за Міхаелем 5-ариліденізороданінів з малонодинітрилом є ефективним підходом до синтезу 5-аміно-7-арил-2-оксо-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазоло-6-карбонітрилів, для яких вперше проведено кислотний та лужний гідроліз, що супроводжувався утворенням не очікуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазоло-6-карбонових кислот та їх амідів, а вихідного 5-ариліденізороданіну.

6. Структура синтезованих сполук та інтерпретація проведених хімічних досліджень підтверджена елементним аналізом, методами спектроскопії  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, 2D ЯМР, хромато-мас-спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [379, 383, 384, 387]*

## РОЗДІЛ 5

СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО[2,3-  
d]ТІАЗОЛУ НА ОСНОВІ 1,4-НАФТОХІНОНУ

5.1. Обґрунтування синтезу похідних тіопіранотіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону у структурі у контексті пошуку потенційних біологічно активних сполук

Похідні на основі 1,4-нафтохінону являють собою велику групу біологічно активних сполук, які зустрічаються у вищих рослинах (найчастіше у рослинах родин *Juglandaceae*, *Plumbaginaceae*, *Boraginaceae*, *Ebenaceae*, *Droseraceae*, *Lythraceae*, *Rubiaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae* і *Ulmaceae*), лишайниках, бактеріях та безхребетних (особливо у членистоногих та голкошкірих) [388]. 1,4-Нафтохінони знаходяться у природних джерелах часто у відновленій формі або у вигляді глікозидів [389]. Даний клас сполук є об'єктом багатьох наукових досліджень, зокрема деякі лікарські засоби, засоби, що використовуються в косметології та біологічно активні добавки, вміщують як активний компонент похідні нафтохінону. Відомими лікарськими засобами серед похідних нафтохінону є вітамін К<sub>1</sub> та менадїон як його синтетичний аналог, що використовуються як гемостатичні засоби зумовлюючи підвищення синтезу протромбіну та проконвертину [390, 391]. Атоваквон як синтетичний антипротозойний засіб, що використовується для профілактики та лікування пневмонії викликаной *Pneumocystis jirovecii* (PCP), та малярії [392, 393]. Менатетренон є формою вітаміну К<sub>2</sub>, який використовується при лікуванні остеопорозу як стимулятор остеогенезу.

Загалом похідні 1,4-нафтохінону у подібний спосіб як інші представники хінонів проявляють свій фармакологічний потенціал шляхом реалізації двох механізмів біологічної активності [388]. Перший, ґрунтується на тому, що 1,4-нафтохінони діють як окислювально-відновні агенти, завдяки чому вони легко зазнають відновлення і повторного окислення у фізіологічних умовах. Так,

похідні нафтохінону у присутності молекулярного кисню та відповідних відновників, каталізують перенесення електронів від НАДФН або тіолів, що відповідно призводить до генерування різних активних форм кисню (АФК), зокрема супероксид-аніону ( $O_2^-$ ), гідроксильних радикалів ( $OH^\bullet$ ) і пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) [394, 395]. Другий механізм за допомогою якого нафтохінони взаємодіють з біомішенями є їхня висока електрофільність. Дана властивість дозволяє похідним 1,4-нафтохінону утворюють ковалентні зв'язки з нуклеофільними агентами і таким чином взаємодіяти з тіольними групами білків, глутатіоном, нуклеофільними амінокислотними групами, для прикладу із термінальною аміногрупою лізину [388]. Відповідно даний комплекс властивостей дозволив ідентифікувати серед представників класу нафтохінонів ряд високоактивних протипухлинних [396-398], антибактеріальних [399], протигрибкових [400], протизапальних [401, 402] та протипаразитарних агентів [403-406] (Рис 5.1). Окрім того для даного класу сполук було ідентифіковано афінитет до ряду біомішеней. Так, нафтохінони відомі як інгібітори протеосом [407], *N*-ацетилтрансферази [397], циклін-циклін-залежної кінази [408], альдозоредуктази [402], топоізомерази I та II [409, 410], білків теплового шоку [411], ДНК-гірази [412], фосфатидилінозитол 3-кінази [413] та інгібітори каскадів Stat3 [414], а також ракових стовбурових клітин [397].

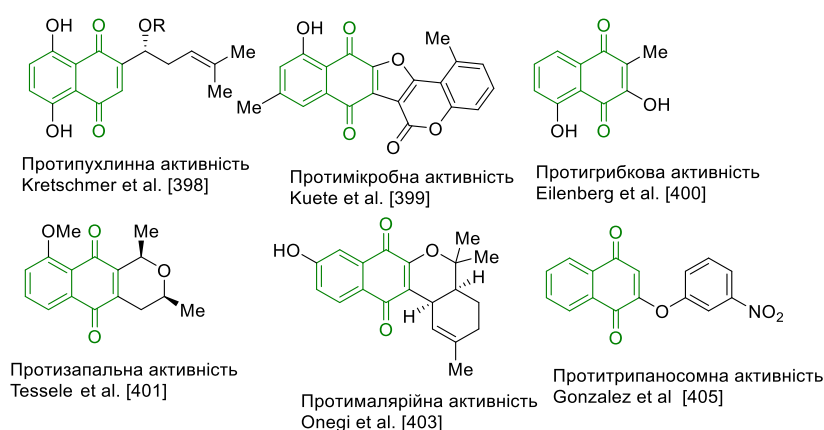


Рис 5.1. Структури біологічно активних похідних 1,4-нафтохінону.

З хімічної точки зору похідні 1,4-нафтохінону є також цікавими об'єктами для досліджень, оскільки вони мають здатність вступати у різні типи хімічних перетворень. Так, як активні дієнофіли вони вступають у реакції Дільса-Альдера, які часто супроводжується варіабельністю проходження регіо- та діастереоселективності процесів в залежності від обраних гетеродієнів та замісників у нафтохіноновому фрагменті з утворенням різних типів поліциклічних систем [415-420]. Варто також відзначити, що реакції Дільса-Альдера за участі похідних нафтохінону як дієнофілів дозволяють одержати ряд біологічно активних хінонів природнього походження, зокрема ангіциклінів та інших похідних, що вміщують фрагменти природніх сполук у структурі, які перебувають на різних стадіях клінічних випробувань [421]. Відповідно, метою даного фрагменту нашої роботи було вивчення реакції *гетеро*-Дільса-Альдера у синтезі поліциклічних систем на основі тіопіранотіазолу та подальше вивчення їх біологічної активності виходячи із похідних на основі 1,4-нафтохінону як дієнофілів та 5-арил/гетерил/алкіліден-ізороданінів як гетеродієнів (Рис 5.2).

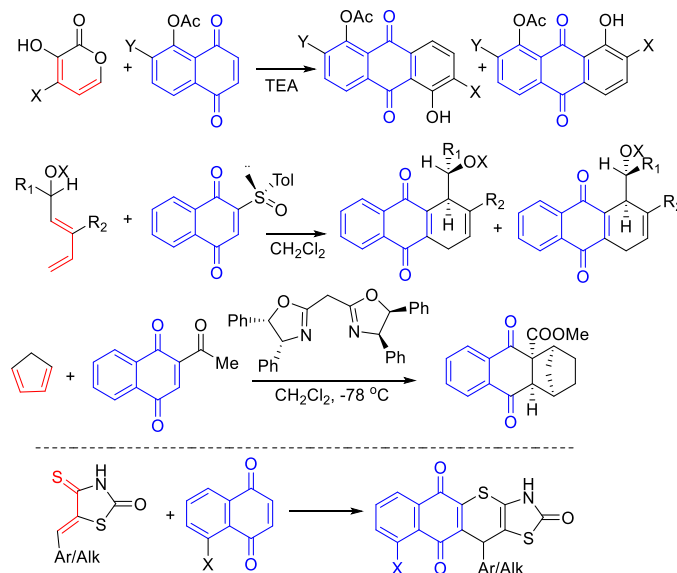


Рис 5.2. Обґрунтування дизайну цільових похідних тіопіранотіазолу.

5.2. Синтез, підтвердження структури та DFT-дослідження реакції утворення 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів.

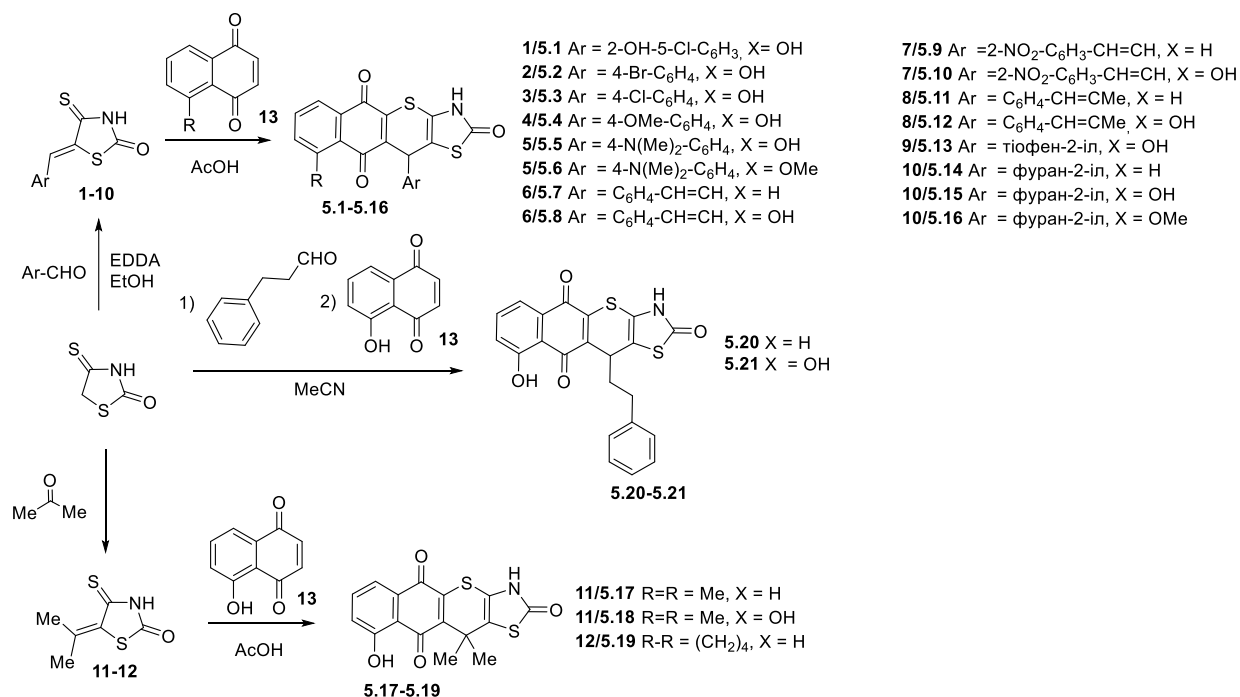
5.2.1 Синтез, 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів.

Вихідні 5-ен-4-тіоксо-2-тіазолідинони, як ключові гетеродієни у синтезі цільових похідних тіопіранотіазолу синтезовані за реакцією Кньовенагеля ізороданіну і відповідних альдегідів або кетонів (середовище - етанол, каталізатор - ЕДДА). *Гетеро*-варіант реакції Дільса-Альдера 5-ен-ізороданінів, як гетеродієнів з похідними 1,4-нафтохінону як дієнофілів проходить з утворенням 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів **5.1-5.21** [422-425]. Цікаво, що при використанні несиметричних похідних нафтохінону, а саме 5-гідроксинафтаден-1,4-діону (юглону) та 5-метоксинафтаден-1,4-діону як дієнофілів спостерігається утворення двох регіоізомерів: 9-гідрокси/метил- та 6-гідрокси/метил-11-арил/гетерил/аліл/алкіл-3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів, перший з яких значно переважає над іншим у відсотковому співвідношенні.

Слід зазначити, що аліфатичні альдегіди з ізороданіном реагують менш активно з низькими виходами кінцевих продуктів, а утворені 5-алкіліден-4-тіоксо-2-тіазолідинони досить важко виділити та очистити. Відповідно, для синтезу похідних тіопіранотіазолу **5.20-5.21** ми використали трикомпонентну реакцію ізороданіну, аліфатичного альдегіду та дієнофілу. Так, реакція 4-тіоксо-2-тіазолідинону, 3-фенілпропіональдегіду та похідних 1,4-нафтохінону як дієнофілів в середовищі ацетонітрилу в присутності ЕДДА як каталізатора призводить до утворення 11-фенетил-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів **5.20-5.21** (Схема 5.1.). Варто відзначити, що при

проходженні реакції *гетеро*-Дільса-Альдера продукти [4+2]-циклопрієднання зазнають спонтанної оксидації (дегідрогенізації) надлишком нафтохінону, що було повідомлено нами у попередніх роботах з зазначеної тематики [124].

Схема 5.1



Сполуки **5.1-5.21** - темно-коричневі порошки, розчинні при нагріванні у ДМФА, оцтовій кислоті, нерозчинні в етанолі, воді, диетиловому ефірі та толуолі. Фізико-хімічні властивості сполук **5.1-5.21** наведені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

**Фізико-хімічні характеристики синтезованих 11-фенетил-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріонів**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °C	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				C, %	H, %	N, %	C, %	H, %	N, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>5.1</b>	70	>350	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> ClNO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	54,12	2,27	3,16	54,28	2,11	3,05
<b>5.2</b>	62	240-242	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> BrNO <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	50,86	2,13	2,97	51,01	2,23	3,06
<b>5.3</b>	68	>350	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> ClNO <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	56,14	2,36	3,27	56,28	2,20	3,17
<b>5.4</b>	71	234-236	C <sub>21</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	59,56	3,09	3,31	59,41	2,92	3,49
<b>5.5</b>	67	>350	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	60,54	3,69	6,42	60,43	3,77	6,58
<b>5.6</b>	75	>350	C <sub>23</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	61,32	4,03	6,22	61,21	4,14	6,34
<b>5.7</b>	70	338-340	C <sub>22</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	65,49	3,25	3,47	65,64	3,08	3,63

<b>5.8</b>	64	>350	$C_{22}H_{13}NO_4S_2$	62,99	3,12	3,34	63,09	3,02	3,50
<b>5.9</b>	69	330-332	$C_{22}H_{12}N_2O_5S_2$	58,92	2,70	6,25	59,07	2,82	6,12
<b>5.10</b>	77	>350	$C_{22}H_{12}N_2O_6S_2$	56,89	2,60	6,03	56,70	2,41	6,14
<b>5.11</b>	80	>350	$C_{23}H_{15}NO_3S_2$	66,17	3,62	3,35	66,27	3,40	3,49
<b>5.12</b>	79	>350	$C_{23}H_{15}NO_4S_2$	63,73	3,49	3,23	63,55	3,67	3,37
<b>5.13</b>	71	244-246	$C_{18}H_9NO_4S_3$	54,12	2,27	3,51	54,23	2,11	3,67
<b>5.14</b>	73	238-240	$C_{18}H_9NO_4S_2$	58,85	2,47	3,81	58,74	2,40	3,92
<b>5.15</b>	69	>350	$C_{18}H_9NO_5S_2$	56,39	2,37	3,65	56,50	2,49	3,51
<b>5.16</b>	68	231-233	$C_{19}H_{11}NO_5S_2$	57,42	2,79	3,52	57,33	2,87	3,40
<b>5.17</b>	81	230-232	$C_{22}H_{15}NO_3S_2$	65,17	3,73	3,45	65,24	3,61	3,62
<b>5.18</b>	79	>350	$C_{22}H_{15}NO_4S_2$	62,69	3,59	3,32	62,79	3,45	3,21
<b>5.19</b>	72	231-233	$C_{16}H_{11}NO_3S_2$	58,34	3,37	4,25	58,21	3,52	4,16
<b>5.20</b>	70	>350	$C_{16}H_{11}NO_4S_2$	55,64	3,21	4,06	55,51	3,09	4,19
<b>5.21</b>	65	>350	$C_{18}H_{13}NO_3S_2$	60,83	3,69	3,94	61,00	3,76	4,04

5.2.2 Спектральні характеристики та рентгеноструктурний аналіз синтезованих сполук.

Структура синтезованих похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону підтверджена елементним аналізом, методами  $^1H$ ,  $^{13}C$  та двовимірної ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом. Спектральні характеристики сполук наведені у таблиці 5.2.



Таблиця 5.2

**Спектри  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР та LC-MS 11-заміщених 3,5,10,11-тетрагідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
<b>5.1</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,69 (с, 1H, CH), 6,82 (т, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 7,07 (д, 1H, $J = 8,9$ Гц, аром.), 7,16-7,24 (м, 1H, аром.), 7,32 (с, 1H, аром.), 7,61 (д, 1H, $J = 8,1$ Гц, аром.), 7,72 (д, 1H, $J = 9,0$ Гц, аром.), 10,31 (с, 1H, OH), 11,64 (с, 1H, OH), 11,78 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 33,5, 94,1, 116,8, 121,2, 123,0, 125,0, 127,4, 128,2, 130,9, 133,5, 136,4, 139,5, 141,4, 143,7, 153,4, 158,2, 160,4, 175,0, 184,5	443 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.2</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,52 (с, 1H, CH), 7,28-7,37 (м, 2H, аром.), 7,48 (т, 2H, $J = 6,8$ Гц, аром.), 7,58 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 7,70 (д, 1H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 11,67 (с, 1H, OH), 11,94 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 29,7, 99,1, 107,8, 115,7, 119,3, 120,8, 125,2, 129,9, 131,7, 134,7, 136,5, 141,4, 146,2, 156,1, 160,5, 170,5, 179,8	471/473 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.3</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,54 (с, 1H, CH), 7,30-7,42 (м, 4H, аром.), 7,59 (д, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,71 (м, 1H, аром.), 11,68 (с, 1H, OH), 11,94 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 28,6, 84,7, 101,0, 116,2, 119,3, 125,2, 126,0, 128,8, 129,5, 133,1, 136,5, 141,5, 150,2, 163,6, 169,6, 175,2, 179,5	426/428 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.4</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,69 (с, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 5,43 (с, 1H, CH), 6,85 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,27 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,34 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,58 (д, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,71 (т, 1H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 11,74 (с, 1H, OH), 11,90 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 35,3, 47,4, 92,7, 101,3, 109,1, 114,6, 125,9, 129,9, 133,1, 135,9, 139,4, 142,1, 144,4, 148,1, 153,9, 159,2, 170,3, 174,2, 177,6	424 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.5</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,80 (с, 6H, N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 5,29 (с, 1H, CH), 6,59 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,08 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 7,49-7,57 (м, 2H, аром.), 7,78 (т, 1H, $J = 7,9$ Гц, аром.), 11,54 (с, 1H, OH), 11,80 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 30,7, 48,0, 100,8, 112,5, 117,4, 120,0, 123,3, 128,1, 132,0, 135,7, 137,5, 138,1, 141,6, 146,2, 149,4, 159,7, 162,7, 167,2, 176,9	437 (M+H) <sup>+</sup>

## Продовження табл. 5.2

<b>5.6</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,80, 3,01 (2*с, 6H, N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3,91, 3,97 (2*с, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 5,27 (с, 1H, CH), 6,59 (д, 2H, J = 8,4 Гц, аром., 3,6), 6,76 (м, 2H, аром., 3,6*), 7,06 (д, 2H, J = 8,4 Гц, аром., 3,6), 7,20 (м, 2H, аром., 3,6*), 7,45-7,61 (м, 3H, аром.), 7,76, 7,84 (2*м, 1H, аром.), 11,79 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 36,5, 47,5, 56,5, 99,5, 112,5, 115,8, 118,7, 119,1, 127,3, 128,1, 129,7, 133,7, 136,3, 143,5, 149,7, 155,1, 164,6, 171,7, 177,2, 184,0	451 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.7</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 6,77 (с, 1H, CH), 7,53-7,63 (м, 6H, CH, аром.), 7,69 (т, 1H, J = 7,9 Гц, аром.), 7,73 (т, 1H, J = 8,2 Гц, аром.), 8,12 (д, 1H, J = 16,4 Гц, CH), 8,24 (д, 1H, J = 8,4 Гц, аром.), 8,39 (д, 1H, J = 8,4 Гц, аром.), 11,04 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 36,2, 95,8, 118,7, 119,6, 122,4, 123,5, 126,6, 127,7, 128,1, 129,1, 129,2, 129,9, 131,4, 131,8, 147,8, 156,2, 175,2, 177,2, 179,7	404 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.8</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 6,37 (с, 1H, CH), 7,06-7,39 (м, 5H, CH, аром.), 7,40-7,52 (м, 3H, CH, аром.), 7,76 (д, 1H, J = 7,4 Гц, аром.), 7,93 (т, 1H, J = 7,8 Гц, аром.), 11,02 (с, 1H, OH), 11,12 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 36,0, 98,6, 117,1, 118,8, 122,2, 122,5, 125,8, 128,3, 130,1, 132,3, 136,3, 137,8, 139,4, 141,3, 161,3, 163,4, 169,3, 171,4, 174,5	420 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.9</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 6,02-6,08 (м, 1H, CH), 7,66 (т, 2H, J = 8,4 Гц, аром.), 7,74-7,77 (м, 2H, аром.), 7,89-7,93 (м, 1H, аром.), 8,10 (дд, 2H, J = 8,2, 16,0 Гц, 2CH), 8,18 (д, 1H, J = 8,4 Гц, аром.), 8,29 (д, 2H, J = 8,2 Гц, аром.), 11,83 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 31,6, 98,1, 114,4, 118,8, 122,6, 125,1, 130,3, 132,6, 134,4, 134,9, 137,1, 139,1, 141,9, 144,2, 146,6, 149,7, 173,5, 174,9, 178,5	449 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.10</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 5,21 (с, 1H, CH), 6,31 (м, 1H, CH), 6,81 (д, 1H, J = 13,8 Гц, CH), 7,36-7,39 (м, 1H, аром.), 7,45-7,49 (м, 1H, аром.), 7,58-7,61 (м, 2H, аром.), 7,67-7,70 (м, 1H, аром.), 7,88-7,92 (м, 2H, аром.), 11,87 (с, 1H, OH), 11,97 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 35,8, 87,1, 110,0, 115,1, 123,0, 124,3, 126,2, 126,7, 128,5, 133,1, 136,7, 137,6, 139,7, 141,3, 148,5, 148,7, 162,7, 176,5, 177,0, 177,7	465 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.11</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 0,96 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 5,77 (с, 1H, CH), 7,41-7,44 (м, 1H, аром.), 7,50-7,56 (м, 2H, CH, аром.), 7,60-7,65 (м, 1H, аром.), 7,69-7,73 (м, 3H, аром.), 7,79-7,82 (м, 1H, аром.), 8,28-8,32 (м, 1H, аром.), 8,46-8,49 (м, 1H, аром.), 10,80 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 17,1, 29,2, 86,1, 108,6, 122,4, 122,6, 125,4, 125,7, 126,2, 126,3, 126,4, 127,4, 128,0, 128,5, 144,4, 146,7, 164,2, 166,9, 177,6	418 (M+H) <sup>+</sup>

## Продовження табл. 5.2

<b>5.12</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 0,96 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 5,48 (с, 1H, CH), 7,26-7,33(м, 4H, CH, аром.), 7,52 (м, 3H, аром.), 7,76 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,99 (т, 1H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 11,06 (с, 1H, OH), 11,22 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 17,1, 31,4, 84,6, 106,9, 116,4, 118,6, 120,3, 124,4, 126,4, 130,9, 134,1, 134,3, 136,3, 136,8, 143,7, 150,4, 150,7, 162,8, 176,2, 178,8, 182,1	434 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.13</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,89 (с, 1H, CH), 6,92 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 6,96-7,02 (м, 1H, тіоф.), 7,33-7,41 (м, 2H, аром., тіоф.), 7,54-7,62 (м, 1H, тіоф.), 7,72 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 11,76 (с, 1H, OH), 12,01 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 33,6, 102,2, 114,2, 117,4, 119,4, 125,4, 125,8, 127,3, 129,7, 134,7, 136,7, 140,5, 143,9, 147,0, 160,6, 162,0, 169,7, 176,6	400 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.14</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,90 (с, 1H, CH), 6,90 (д, 1H, $J = 4,4$ Гц, фур.), 6,93-6,98 (м, 1H, фур.), 7,35-7,40 (м, 1H, фур.), 7,83-7,91 (м, 2H, аром.), 7,97-8,04 (м, 2H, аром.), 12,00 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 34,1, 106,4, 112,5, 119,3, 125,7, 127,2, 136,8, 136,8, 139,7, 141,4, 144,1, 149,8, 157,4, 168,5, 177,4, 181,7	368 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.15</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 5,67 (с, 1H, CH), 6,30-6,36 (м, 2H, аром.), 7,36 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,53-7,56 (м, 1H, аром.) 7,59 (д, 1H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,73 (т, 1H, $J = 7,9$ Гц, аром.), 11,73 (с, 1H, OH), 11,98 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 33,3, 105,5, 107,6, 111,3, 114,6, 117,3, 119,8, 125,7, 131,5, 132,9, 137,0, 143,3, 144,5, 152,7, 161,0, 180,9, 180,2, 184,6	384 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.16</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,88, 3,93 (2*с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 5,27, 5,62 (2*с, 1H, CH), 6,23-6,26, 6,30-6,36 (2*м, 1H, аром.), 7,50-7,61 (м, 3H, аром.), 7,65 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,75-7,84 (м, 2H, аром.), 7,45-7,61 (м, 3H, аром.), 11,91, 11,92 (2*с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 33,3, 56,4, 107,0, 110,8, 117,0, 118,9, 120,1, 134,5, 135,4, 142,8, 143,7, 145,6, 148,5, 149,6, 152,6, 159,7, 170,5, 177,7, 180,7	398 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.17</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,73 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1,89 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,82 (т, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,88 (д, 1H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,94-8,02 (м, 2H, аром.), 11,65 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 21,0, 29,7, 106,3, 114,6, 125,8, 126,9, 135,1, 142,8, 146,2, 170,0, 172,0, 180,7	330 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.18</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,72 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,88 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,51 (д, 1H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,75 (м, 1H, аром.), 7,93 (м, 1H, аром.), 11,60 (с, 1H, OH), 12,58 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 20,8, 24,2, 96,4, 114,4, 118,8, 123,8, 127,3, 134,1, 137,0, 151,5, 157,4, 163,9, 173,3, 175,1, 179,1	346 (M+H) <sup>+</sup>

## Закінчення табл. 5.2

<b>5.19</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,14 (шс, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,39 (шс, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,81 (м, 4H, 2*CH <sub>2</sub> ), 7,84 (м, 2H, аром.), 8,05 (м, 2H, аром.), 11,70 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 21,7, 31,2, 45,5, 106,5, 122,3, 127,8, 134,6, 136,3, 138,3, 143,3, 150,3, 176,0, 177,7, 185,3	356 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.20</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 1,94 (м, 1H, CH <sub>2</sub> ), 2,62 (м, 1H, CH <sub>2</sub> ), 4,42 (м, 1H, CH), 7,02 (м, 1H, аром.), 7,07-7,14 (м, 4H, аром.), 7,78-7,93 (м, 2H, аром.), 7,94-8,06 (м, 2H, аром.), 11,89 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 31,6, 34,3, 36,5, 107,0, 117,1, 126,2, 126,5, 127,1, 128,5, 128,6, 131,4, 131,9, 134,3, 135,3, 137,0, 141,5, 143,7, 171,3, 180,3, 180,8	406 (M+H) <sup>+</sup>
<b>5.21</b>	<sup>1</sup> H ЯМР: δ 2,37 (м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,62 (м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5,22 (с, 1H, CH), 7,38 (м, 2H, аром.), 7,48 (м, 2H, аром.), 7,60 (м, 1H, аром.), 7,68 (м, 1H, аром.), 7,90 (м, 1H, аром.), 8,08 (м, 1H, аром.), 11,87 (с, 1H, OH), 11,99 (с, 1H, NH). <sup>13</sup> C ЯМР: δ 21,5, 28,2, 32,8, 95,3, 110,7, 122,0, 122,6, 123,9, 125,8, 126,6, 128,2, 129,7, 132,0, 137,5, 139,7, 145,5, 165,6, 171,0, 186,9, 188,8	422 (M+H) <sup>+</sup>

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР синтезованих тіопіранотіазолів спостерігається характерний субспектр протонів нафтохінонового фрагменту та ароматичного/гетероциклічного субституентів у положенні С-11 в ділянці 6,23-8,49 м.ч. та сигнал амідного протону у вигляді синглету при 10,80-12,58 м.ч. Сигнал СН протону у положенні С-11 проявляється у вигляді синглету або мультиплету при 4,42-6,77 м.ч. Сигнал протону гідроксильної групи нафтохінонового фрагменту у положенні С-9 утворює синглет в області 10,31-11,76 м.ч. Протони, віднесені до фенілпропіонового фрагменту сполук **5.20-5.21** утворюють два мультиплети при  $\delta$  1,94–2,62 м.ч. У спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР синтезованих 11-фенетил-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріонів спостерігаються характерні сигнали вуглецю карбонільних груп (C=O) нафтохінонового фрагменту у ділянці 166,9-188,8 м.ч. Цікаво, що при аналізі  $^1\text{H}$  ЯМР спектрів похідних тіопіранотіазолу на основі 5-метоксинафтален-1,4-діону (сполуки **5.6** та **5.16**) спостерігається чітке дублювання сигналів протонів, що свідчить про наявність двох регіоізомерів (6- та 9-метоксипохідних) у співвідношенні 1:5. У випадку тіопіранотіазолів з фрагментом юглону у структурі у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР не спостерігається дублювання сигналів, що свідчить про надзвичайно велику перевагу у формуванні одного регіоізомеру, а саме 6-метоксипохідного.

Для детального дослідження структури сполук **5.4** та **5.16** були також застосовані двомірні (2D) методики ЯМР (HSQC, HMBC, COSY). Так, ключова ідея у з'ясуванні структури сполуки **5.4** полягала в тому, щоб знайти кореляцію HMBC СН протону третинного атома карбону (5.42 м.ч.) та одного з дублетів ароматичної системи ABC (7,31 та 7,56 м.ч, фрагменту «Ph-OH») до характерних вуглеців кето-груп зі сигналами у ділянках слабого магнітного поля (180,4 і 185,2 м.ч.). Як ми бачимо в цьому випадку, обидва протони у ділянках 5.42 та 7,56 м.ч. мають HMBC кореляцію до різних карбонів карбонільних груп у ділянках 185,2 і 180,4 м.ч, відповідно (форма А). У випадку існування альтернативної структури спостерігалась б кореляція HMBC вищенаведених

протонів до карбону карбонільної групи (форма В), яка проте була відсутньою (Рис. 5.3.).

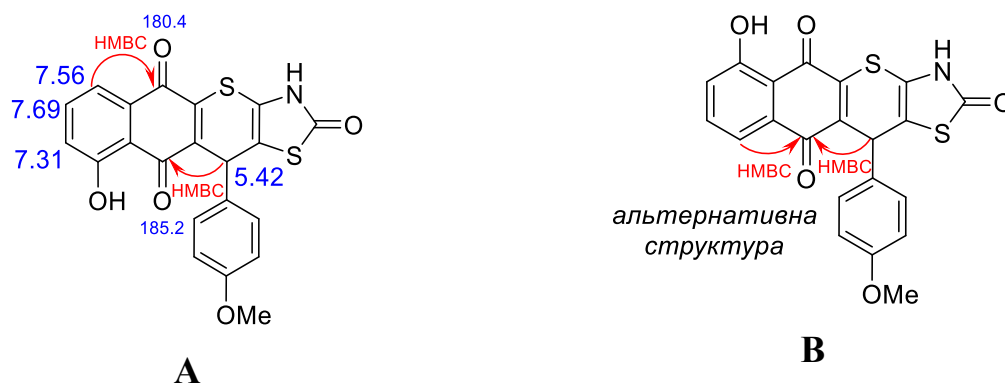


Рис. 5.3. Віднесення сигналів атомів водню та карбону (у молекулі сполуки **5.4** отримані на основі релевантних НМВС спектрів.

По аналогії зі сполукою **5.4**, проводилось вивчення наявності крос-пиків в НМВС спектрі для сполуки **5.16** між сигналом протону третинного атома карбону (5.61 м.ч.), одного з дублетів ароматичного ядра (7,58 м.ч.) до одного з атомів карбону карбонільної групи нафтохінонового фрагменту (179,6 м.ч.), що підтвердило існування двох регіоізомерів із суттєвим переважанням 6-метоксипохідного (форма А) над 9-метоксипохідним (форма В) (Рис. 5.4.).



Рис. 5.4. Віднесення сигналів атомів водню та карбону (у молекулі сполуки **5.16** отримані на основі релевантних НМВС спектрів.

При аналізі хромато-мас спектрів похідних тіопіранотіазолу з фрагментом 5-метокси-1,4-нафтохінону та 5-гідрокси-1,4-нафтохінону також підтверджується також наявність двох регіоізомерів. З іншого боку, у хромато-

мас спектрах похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі незаміщеного 1,4-нафтохінону спостерігається утворення цільового продукту із можливою незначною домішкою неоксидованого продукту [4+2]-циклопрієднання. Приклади 2D ЯМР сполуки **5.16** та  $^1\text{H}$  ЯМР та хромато-мас спектрів для сполук **5.15** та **5.20** представлено на рис. 5.5-5.11.

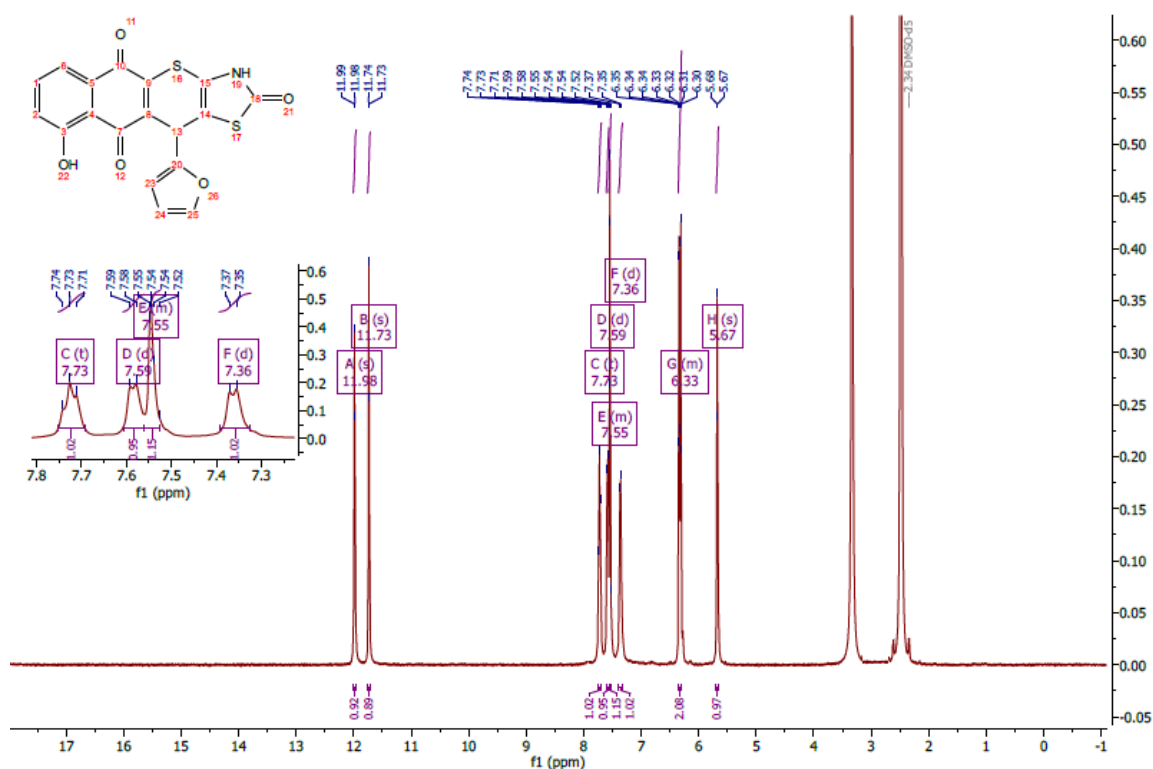


Рис. 5.5. Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки **5.15**.

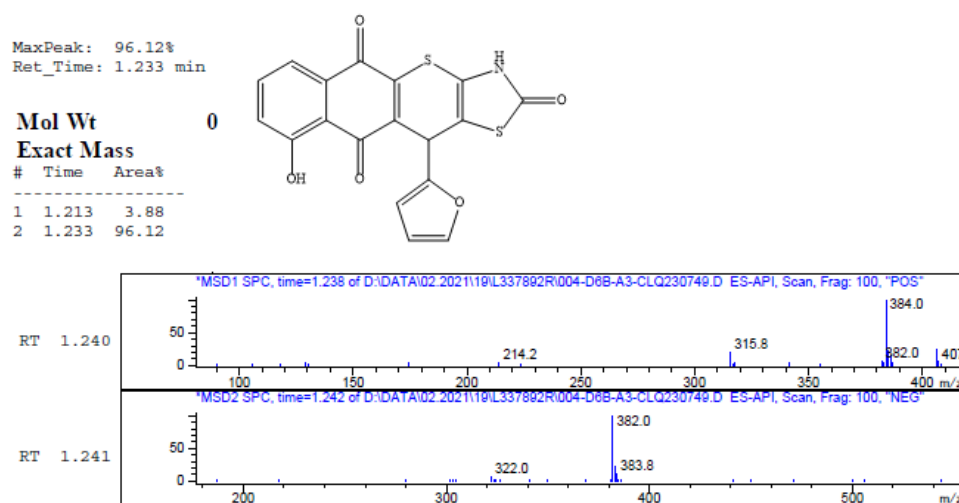


Рис. 5.6. Хромато-мас спектр сполуки **5.15**.

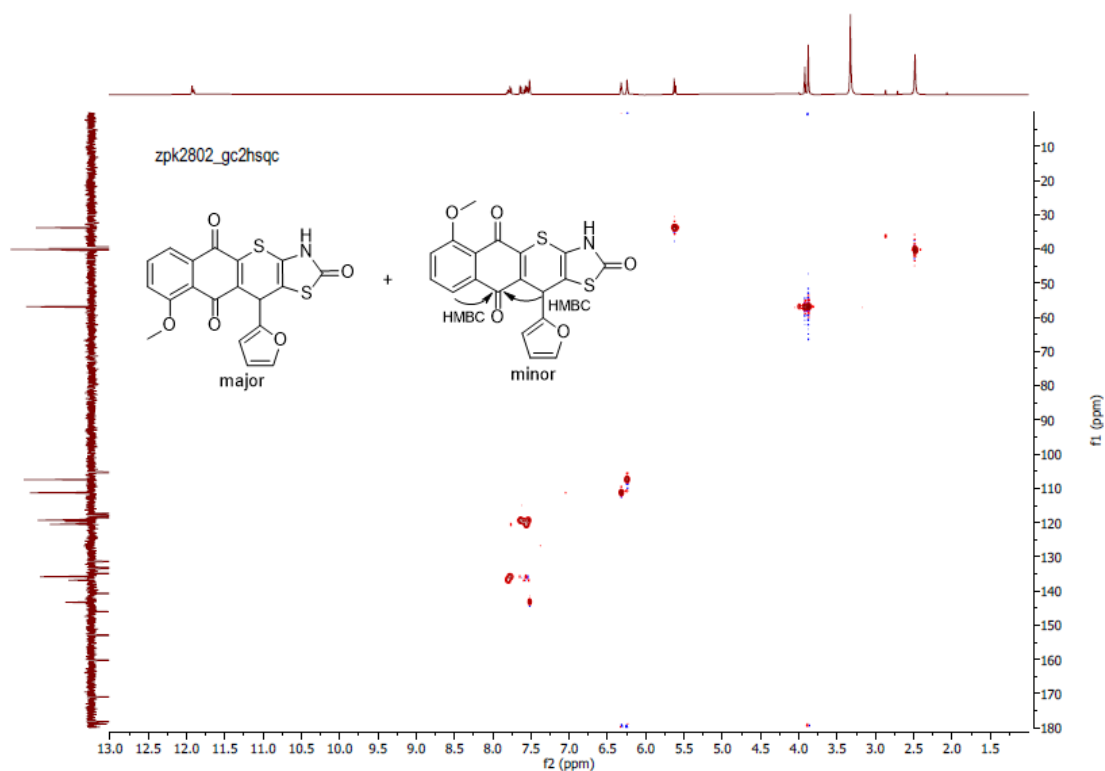


Рис. 5.7. HSQC спектр сполуки **5.16**.

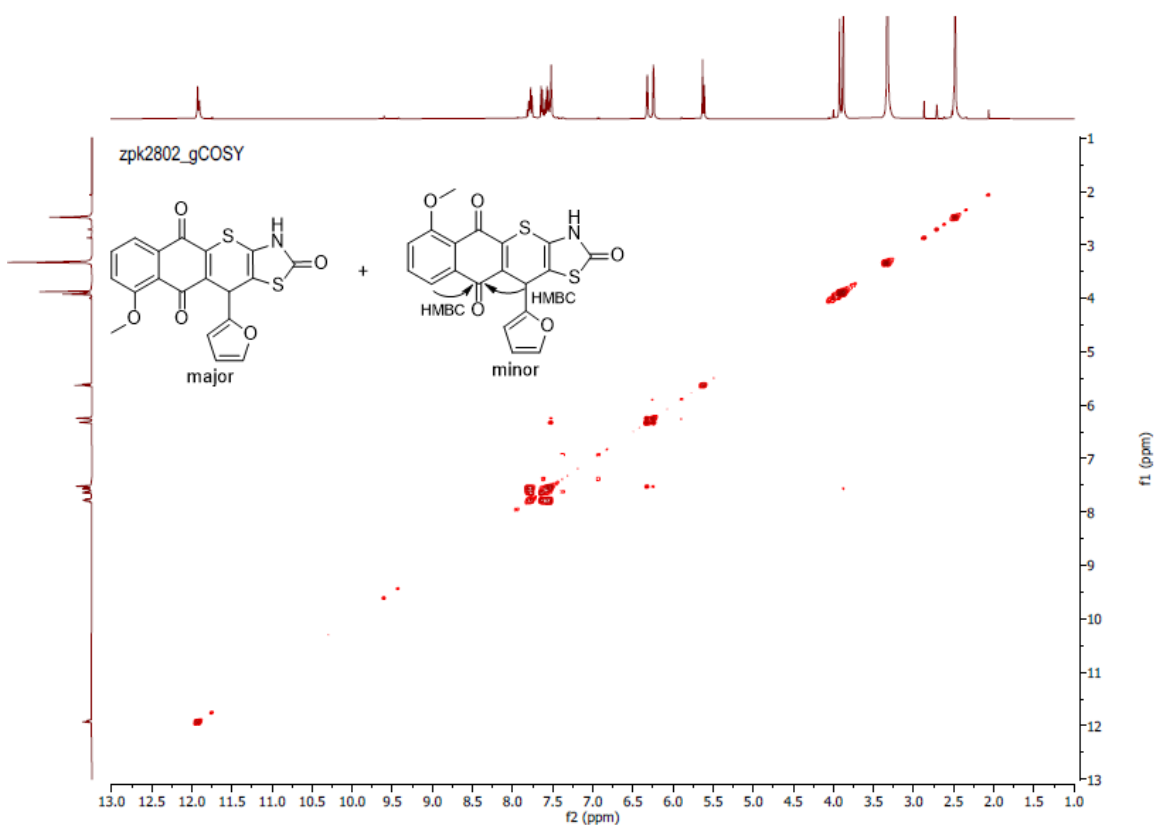


Рис. 5.8. COSY спектр сполуки **5.16**.



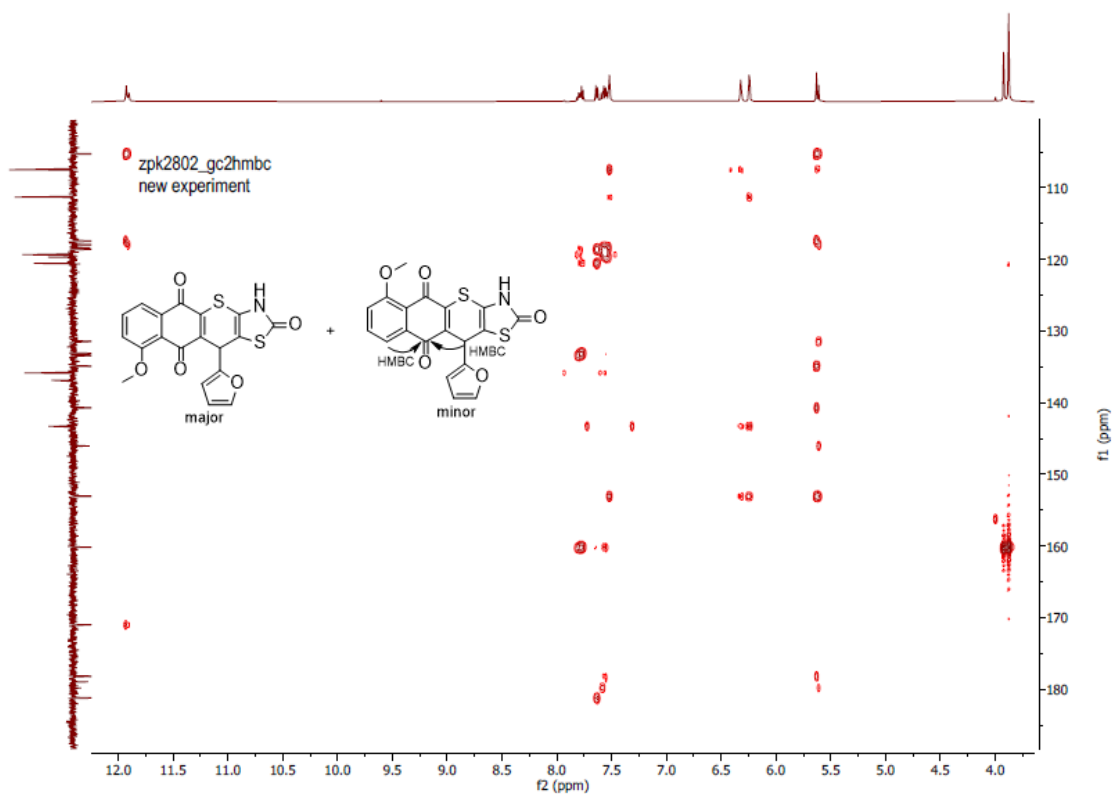
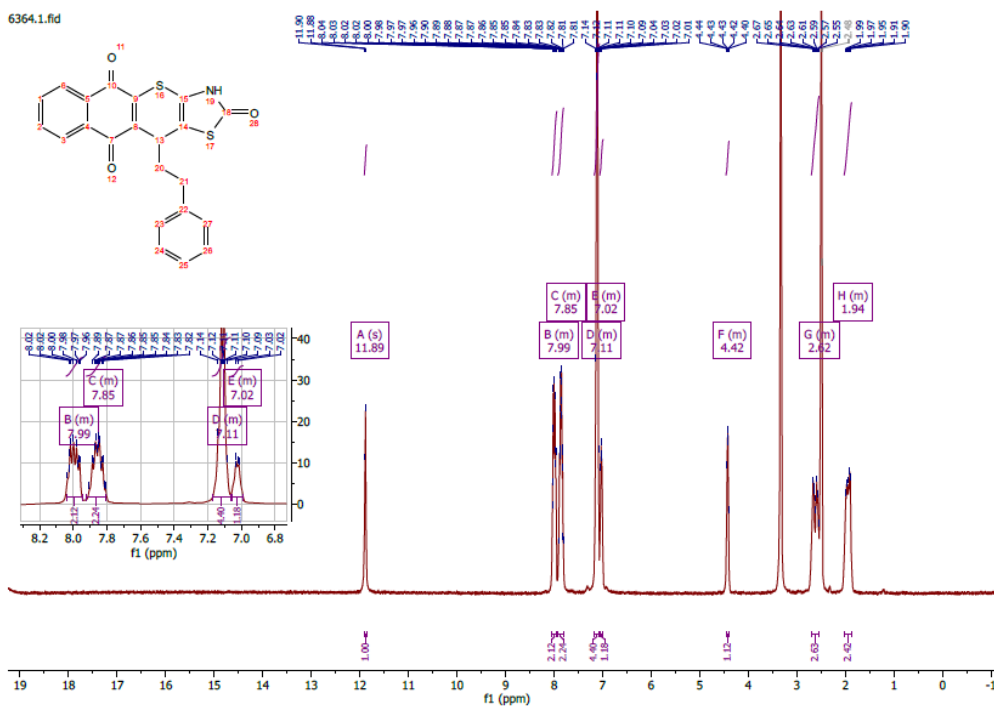


Рис. 5.9. НМВС спектр сполуки 5.16.

Рис. 5.10. Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки 5.20.

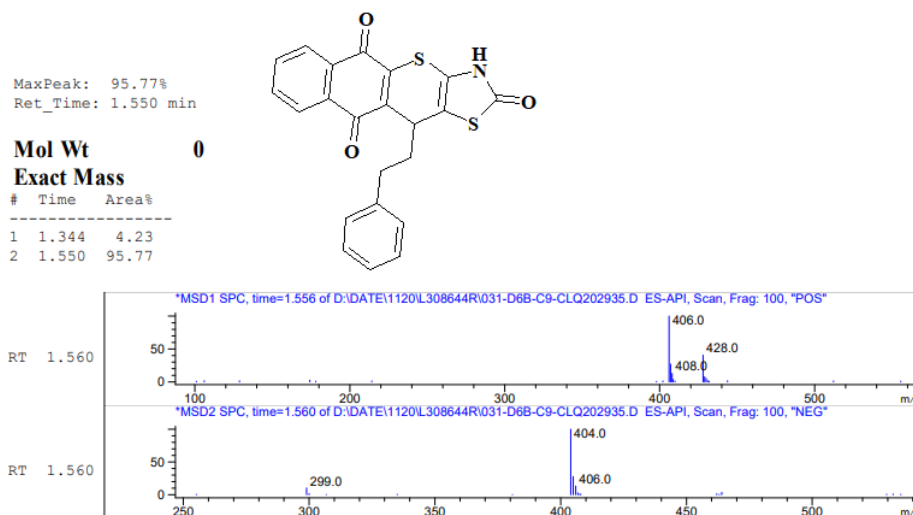


Рис. 5.11. Хромато-мас спектр сполуки **5.20**.

Структурні особливості сполуки **5.4** були також підтверджені рентгеноструктурним аналізом (рис. 5.12). Цікаво, що при рентгеноструктурному аналізі сполуки **5.4** вдалось ідентифікувати не тільки утворення цільового 11-(4-метоксифеніл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-1,4-дитіа-3-аза-циклопента[*b*]антрацен-2,5,10-тріону (92% у кристалі), а й також мінорного регіоізомеру 11-(4-метоксифеніл)-6-гідрокси-3,11-дигідро-1,4-дитіа-3-аза-циклопента[*b*]антрацен-2,5,10-тріону (8% сполуки у кристалі), що свідчить про не повністю абсолютний регіоселективний перебіг реакції *гетеро*-Дільса-Альдера 5-іліден-4-тіоксо-тіазолідин-2-онів як гетеродієнів з 5-гідрокси-1,4-нафтохіноном.

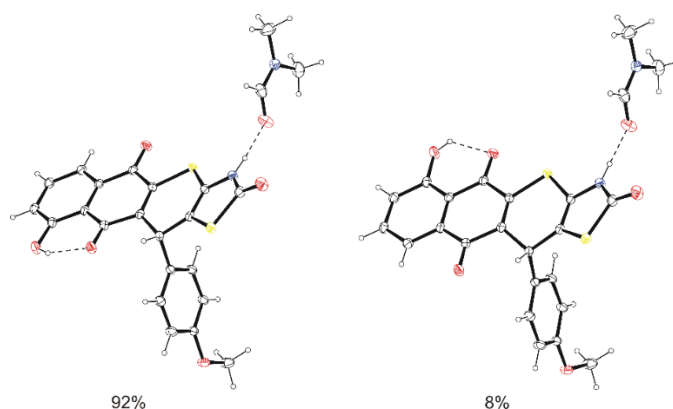


Рис. 5.12. ORTEP вигляд сполуки **5.4**. Атоми водню показано як сфери довільного радіусу.

Детальні структурні дослідження були проведені для 9-гідрокси-11-(4-метоксифеніл)-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону, що кристалізований у вигляді сольвату диметилформаміду в молярному співвідношенні 1:1 (рис. 5.13).

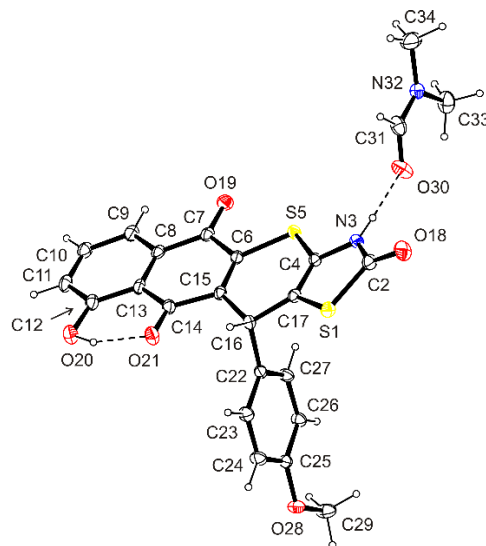


Рис. 5.13. ORTEP вигляд сполуки **5.4**\*DMF. Атоми водню показано як сфери довільного радіусу. Не-гідрогенні атоми зображені у вигляді еліпсоїдів із 30-відсотковим відхиленням від рівноважного положення. Атоми водню показано як сфери довільного радіусу.

Кристали сполуки **5.4** орторомбічні, їх склад:  $C_{21}H_{13}NO_5S_2$ ,  $C_3H_7NO$ ,  $M_r = 496,54$ , просторова група  $Pbca$ ,  $a = 13,1978(3)$ ,  $b = 13,9935(3)$ ,  $c = 23,9945(5)$  Å,  $V = 4431,39(17)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$  ( $Z' = 1$ ),  $D_{calc} = 1,489$  g/cm<sup>3</sup>,  $\mu = 2,578$  mm<sup>-1</sup>,  $T = 130,0(1)$  К. Для визначення структури було використано 4603 незалежних відображень,  $R = 0,0428$  (4068 відображень  $F^2 > 4\sigma(F^2)$ ),  $wR = 0,1189$  ( $F^2$  для усіх відображень),  $S = 1,147$  ( $F^2$  для усіх відображень).

У сполукці **5.4** група ОН присутня в атомі у положенні С-12 жорсткого тетрациклічного 3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріонного фрагменту, утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок O20-H20...O21 (рис. 5.13, табл. 5.3), в якому атом оксигену карбонільної групи в положенні 14 діє як акцептор протону.

*Пара*-метоксифенільний фрагмент при стереогенному атомі С-16 займає псевдоаксіальне положення, як видно з кута  $22.95(12)^\circ$  між вектором зв'язку С16-С22 і нормаллю кільцевої площини Кремера-Попла 4*H*-тіопіранового ядра [232]. Крім того, фенільне кільце даного фрагменту утворює двогранний кут  $89,87(6)^\circ$  із основною площиною 4*H*-тіопіранової системи злегка складеної форми (середньоквадратичне відхилення = 0,0967 Å).

Структурні дослідження показали, що тіазолонова система має характер  $\gamma$ -лактаму. Положення атома Гідрогену, зв'язаного з атомом N-3, було визначено з різницевої карти Фур'є та вільно уточнено. Його присутність у зазначеному положенні підтверджується водневим зв'язком N3-N3 $\cdots$ O30 (рис. 5.14, табл. 5.3), в якому акцептором протона виступає карбонільний атом O-30 молекули розчинника. Встановлено, що міжатомна відстань між С2-N3, становить 1.360(3) Å та у системі тіазолону подовжена приблизно на  $8\sigma$  по відношенню до літературної довжини зв'язку (O=C)-NH, 1,331(2) Å, відповідно [426] для вторинної амідної групи  $\gamma$ -лактамної системи.

Міжатомна відстань між С4-С17 становить 1,333(3) Å, що підтверджує існування подвійного зв'язку між згаданими атомами {еталонна довжина подвійного зв'язку С-С становить 1,331(1) Å [426]}.

У кристалічній решітці молекули розчиненої речовини, пов'язані трансляцією вздовж осі *b* та з'єднуються одна з одною водневими зв'язками С10-N10 $\cdots$ O18<sup>ii</sup> утворюючи ланцюги. Останні далі з'єднані через молекули розчинника (DMФА) водневими зв'язками N3-N3 $\cdots$ O30, С31-N31 $\cdots$ O19<sup>iii</sup> та С33-N33В $\cdots$ O20<sup>i</sup> у шари, що розташовані паралельно площині *bc*. Усередині шару молекули розчинника з'єднуються водневими зв'язками N3-N3 $\cdots$ O30 та С31-N31 $\cdots$ O19<sup>iii</sup> суміжними ланцюгами, пов'язаними площиною ковзання *b*, і далі водневими зв'язками С33-N33В $\cdots$ O20<sup>iv</sup> в антипаралельні пари ланцюгів (рис. 5.14 а і в, табл. 5.3). Взаємнопроникаючі шари молекул та розчинника далі з'єднані водневими зв'язками O20-N20 $\cdots$ O28<sup>i</sup> в тривимірну мережу водневих зв'язків (рис. 5.15, табл. 5.3). Варто зазначити, що між тіазолоновим і бензольним циклами жорсткої четвертинного 3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-

*d*]тіазол-2,5,10-тріонного фрагменту також спостерігаються  $\pi \cdots \pi$  взаємодії пов'язані площиною ковзання *b* (рис. 5.16). Перпендикулярні відстані  $\text{Thi} \cdots \text{Vz}^{\text{iii}}$  та  $\text{Vz} \cdots \text{Thi}^{\text{vi}}$  ( $\text{Thi}$  = тіазол-2-он і  $\text{Vz}$  = бензольні системи) становлять 3,4434(7) і 3,4345(8) Å, відповідно.

Таблиця 5.3

Водневі зв'язки та взаємодії Y-X $\cdots$ Cg у кристалічній структурі сполуки

#### 5.4\* ДМФА

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H (Å)	H $\cdots$ <i>A</i> (Å)	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i> (Å)	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i> (°)
N3—H3 $\cdots$ O30	0,85(3)	1,91(3)	2,736(3)	167(3)
O20—H20 $\cdots$ O21	1,00(4)	1,74(4)	2,625(2)	145(3)
O20—H20 $\cdots$ O28 <sup>i</sup>	1,00(4)	2,39(4)	2,948(2)	114(3)
C10—H10 $\cdots$ O18 <sup>ii</sup>	0,95	2,38	3,082(3)	130
C31—H31 $\cdots$ O19 <sup>iii</sup>	0,95	2,47	3,325(3)	149
C33—H33В $\cdots$ O20 <sup>iv</sup>	0,98	2,54	3,510(3)	172

Коди симетрії: (i)  $-1/2+x, 1/2-y, 1-z$ ; (ii)  $x, -1+y, z$ ; (iii)  $1/2-x, 1/2+y, z$ ; (iv)  $x, 1/2-y, -1/2+z$ ;

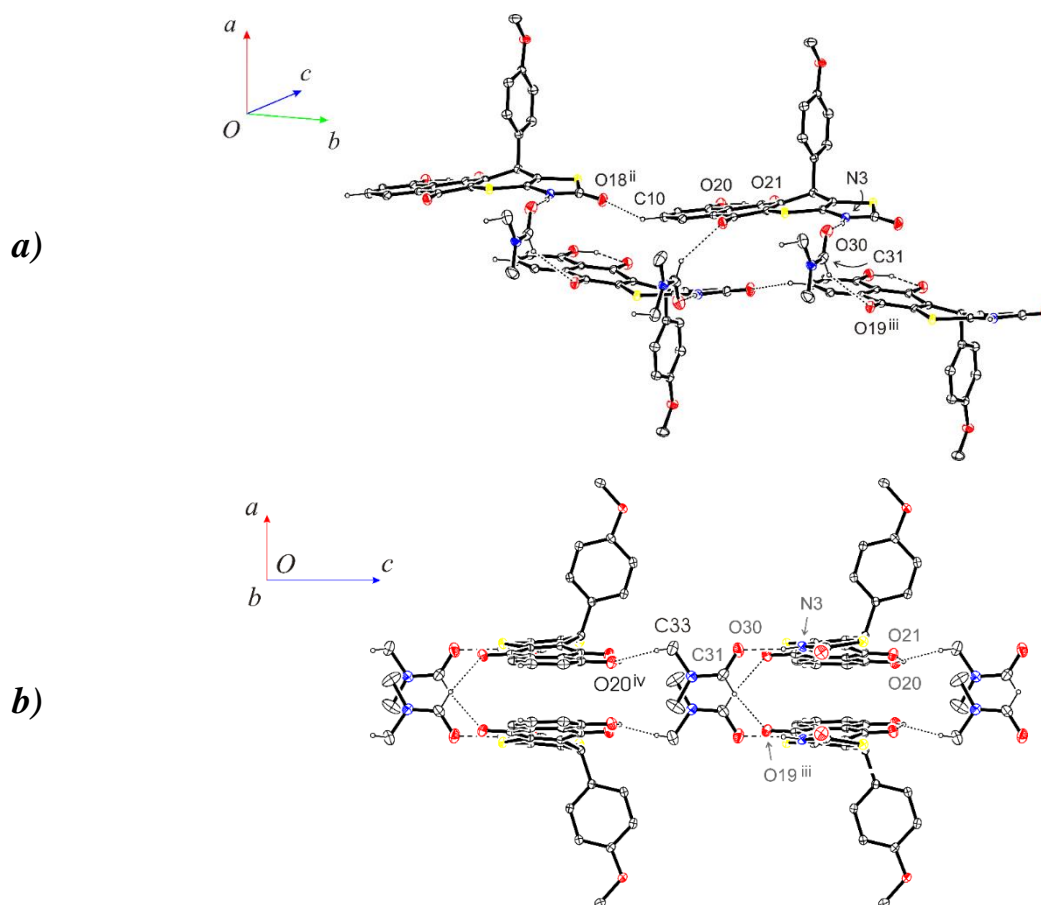


Рис. 5.14. Водневі зв'язки у кристалічній решітці сполуки **5.4\***ДМФА: (а) водневі зв'язки  $N3-H3 \cdots O30$ ,  $C10-H19 \cdots O18^{ii}$  та  $C31-H31 \cdots O19^{iii}$ , що зв'язують молекули розчинника та ланцюгів, утворених молекулами розчиненої речовини пов'язаних площиною ковзання  $b$ , (b) водневі зв'язки  $C33-H33B \cdots O20^{iv}$ , що зв'язують сусідні антипаралельні подвійні ланцюги в шари, розташовані паралельно площині  $bc$ . Атоми водню, які не беруть участь у водневих зв'язках, були опущені для ясності.

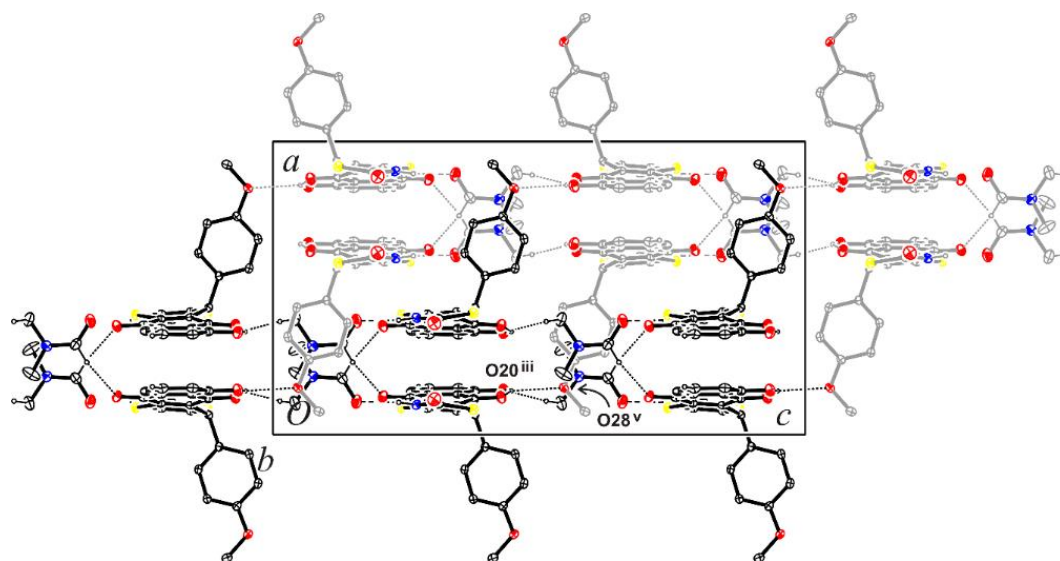
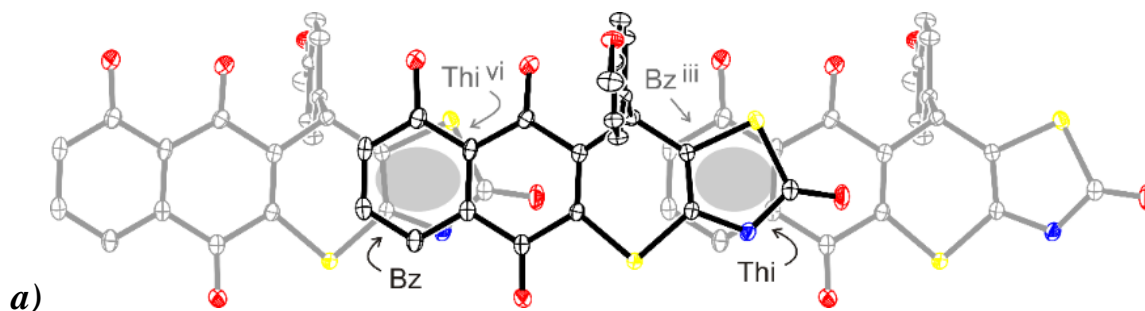


Рис. 5.15. Водневі зв'язки у кристалічній решітці сполуки **5.4\***ДМФА: взаємопроникні шари молекул, з'єднані водневими зв'язками  $O20^{iii}-H20^{iii} \cdots O28^v$ . Атоми Н, які не беруть участь у водневих зв'язках, були опущені для ясності. Коди симетрії: (iii)  $1/2-x, 1/2+y, z$ , (v)  $1-x, 1-y, 1-z$ .



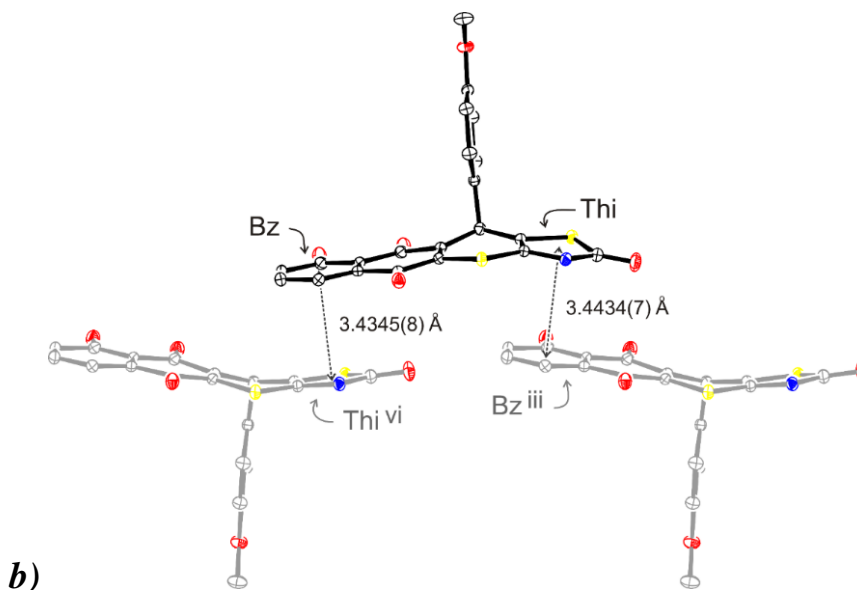


Рис. 5.16.  $\pi \cdots \pi$  взаємодія між системами тiazол-2-ону і бензолу. Дві проєкції молекул, що показують (а) ступінь перекриття  $\pi$ -кілець і (в) міжплощинні відстані. Атоми Гідрогену були опущені для ясності. Коди симетрії: (iii)  $\frac{1}{2}-x, \frac{1}{2}+y, z$ , (vi)  $\frac{1}{2}-x, -\frac{1}{2}+y, z$ .

Структура синтезованого 11-фенетил-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону (сполука **5.20**) також підтверджена рентгеноструктурним аналізом (рис. 5.17). Кристали сполуки **5.20** моноклінні, їх склад:  $C_{22}H_{15}NO_3S_2$ ,  $0,5(C_3H_7NO)$ ,  $M_r = 442,02$ , просторова група  $C2/c$ ,  $a = 19,9599(5)$ ,  $b = 8,08330(10)$ ,  $c = 26,8363(6)$  Å,  $\beta = 111,649(3)^\circ$ ,  $V = 4024,40(16)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$  ( $Z' = 1$ ),  $D_{calc} = 1,459$  g/cm<sup>3</sup>,  $\mu = 2,661$  mm<sup>-1</sup>,  $T = 130.0(1)$  К. Для визначення структури було використано 4126 незалежних відображень,  $R = 0,0584$  (4079 відображень  $F^2 > 4\sigma(F^2)$ ),  $wR = 0,1319$  ( $F^2$  для усіх відображень),  $S = 1,144$  ( $F^2$  для усіх відображень).

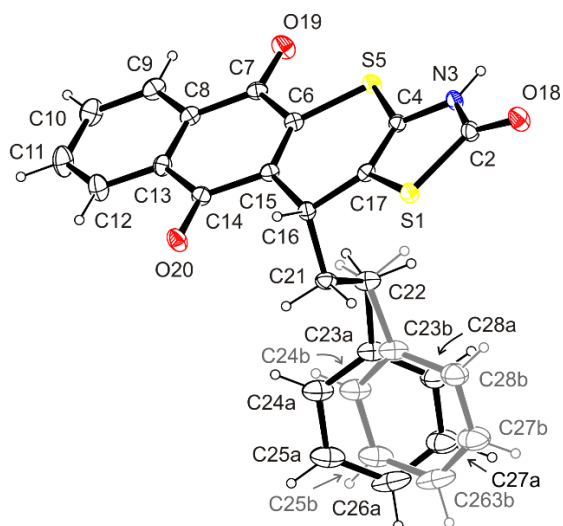


Рис. 5.17. ORTEP вигляд сполуки **5.20**. Не-гідрогенні атоми зображені у вигляді еліпсоїдів із 30-відсотковим відхиленням від рівноважного положення. Атоми Гідрогену показано як сфери довільного радіусу.

Сполука має жорстку тетрациклічну систему 3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону з плоским або практично плоским тіазолін-2-оновим і нафталін-1,4-діоновим циклічними фрагментами (r.m.s. середньоквадратичне відхилення = 0,0041 і 0,0209 Å, відповідно), і злегка складчасте 4*H*-тіопіранове кільце (середньоквадратичне відхилення 0,0846 Å).

У системі тіазолін-2-ону відзначається наявність вторинної амідної групи. Локація атому Гідрогену зв'язаного з атомом N-3 була визначена на основі карт Фур'є і була вільно встановленою. Його розташування у згаданій позиції підтверджено водневим зв'язком N3–H3 $\cdots$ O18<sup>i</sup> [Донор–Н: 0,89(4) Å, Н $\cdots$ Акцептор: 1,89(4) Å, Донор $\cdots$ Акцептор: 2,744(4) Å, Донор–Н $\cdots$ Акцептор: 160(4)°], у якому роль акцептора протону відіграє атом кисню карбонільної групи.

Наші дослідження показали, що в циклічній системі 3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]-тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону існують подвійні зв'язки між вузловими C-4/C-17 і C-6/C-15 атомами. Знайдені міжатомні відстані C4–C17 [1,339(4) Å] і C6–C15 [1,349(4) Å] близькі до літературної довжини подвійного C–C зв'язку [1,331(1) Å] [426].



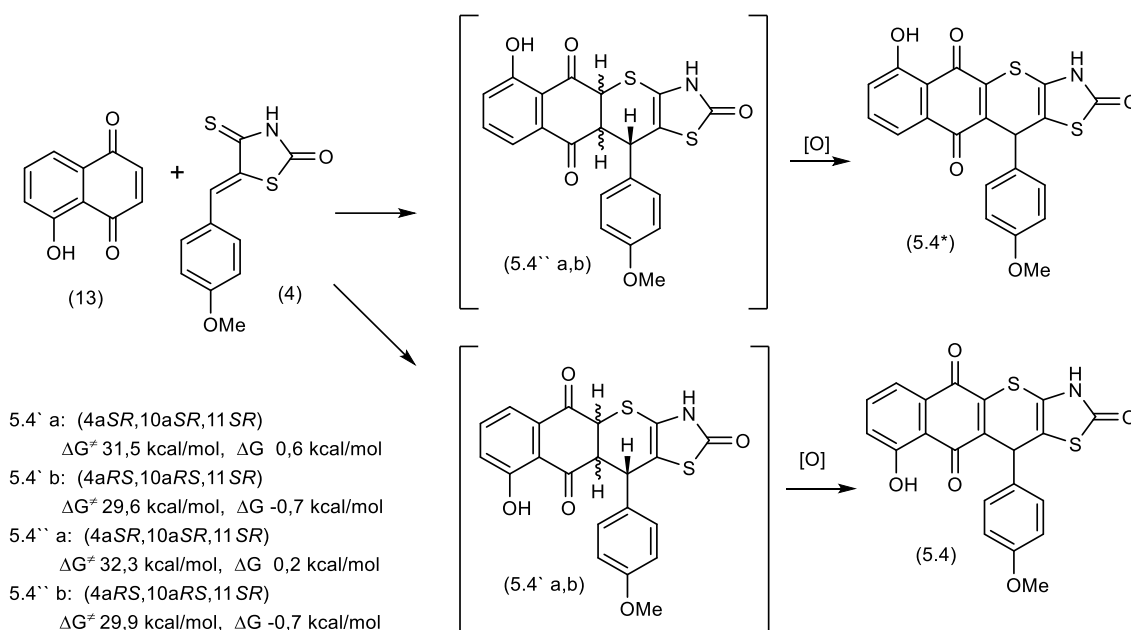
Структурні дослідження показали, що в кристалі фенільний цикл фенетильного фрагменту при стереогенному атомі C-16 займає дві альтернативні позиції, позначені *a* і *b*, в результаті коливального руху та одночасного обертання циклу навколо осі C23—C26. Знайдені кути C23*a*-C22-C23*b* і двогранний кут Ph\_*a*-Ph\_*b* дорівнюють 17.2(4) і 26.9(3)°, відповідно. Коефіцієнти заповнення альтернативних положень *a* і *b* фенільного циклу становлять 0.5. Розташування фенетильного залишку описується торсійними кутами C4—C17—C16—C21, C17—C16—C21—C22 та C16—C21—C22—C23*a*/23*b*, які виявляють значення 104,1(3), -67,7(3), -170,3(4) / 171,9(4)°. Крім того, альтернативні фенільні цикли *a* і *b*, що належать до фенетильного фрагменту, утворюють із середньою площиною 4*H*-тіопіранового кільця двогранні кути 68,8(2) і 60,8(2)°, відповідно.

5.2.3 Дослідження регіоспрямування реакції *гетеро*-Дільса-Альдера за допомогою DFT-аналізу на прикладі сполуки **5.4**.

Варто відзначити, що для розуміння перебігу проходження реакції *гетеро*-Дільса-Альдера 5-ен-ізороданінів з похідними нафтохінону як дієнофілами було проведено квантово-хімічні розрахунки на прикладі сполуки **5.4**. Так, термодинамічні параметри реакції ( $\Delta G$  активації та  $\Delta G$  реакції утворення чотирьох можливих ізомерів циклоприєднання – двох пар діастереомерів, що відповідають кожному регіоізомеру, а також  $\Delta G$  окислення продуктів надлишком юглону) були модельовані за допомогою програми Gaussian 09, Rev. D.01 [427] на DFT рівні з використанням гібридного функціоналу M06-2X [428], одного з найбільш поширених для термохімічних розрахунків, який показує хороші результати моделювання як основних станів молекул, так і перехідних станів реакцій [429]. Напрямки моделювання зображені на схемі 5.2. Використовувалась D3 корекція дисперсії [430], що дозволяє покращити точність розрахунків через врахування дисперсійної

взаємодії. Розрахунки проводились з використанням моделі розчинника РСМ [431] (оцтова кислота), при температурі проведення реакції (391 К).

Схема 5.2.



Моделювання показує, що утворення обох регіоізомерів очікувано відбувається через *ендо*-перехідні стани. Утворення продуктів *екзо*-приєднання не вигідне ні кінетично, через на 2-3 ккал/моль вищі перехідні стани, ні термодинамічно, через додатню  $\Delta G$  реакції цієї пари регіоізомерів (Табл 5.4).

Таблиця 5.4

**M06-2X-D3/6-31G(d,p) модельовані термодинамічні параметри можливих шляхів взаємодії при утворенні сполуки 5.4, ккал/моль**

ізомер та перехідний стан	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta G_{\text{rxn}}$	$\Delta G_{\text{ox}}$
<b>5.4`a</b> ( <i>exo</i> )	31,5 (+2,0)	0,6 (+1,3)	-3,6
<b>5.4`b</b> ( <i>endo</i> )	29,6 (0,0)	-0,7 (0)	-2,3
<b>5.4``a</b> ( <i>exo</i> )	32,3 (+2,7)	0,2 (+0,9)	-3,2
<b>5.4``b</b> ( <i>endo</i> )	29,9 (+0,3)	-0,7 (0)	-2,4

Результати моделювання показали, що регіоселективність реакції є кінетично контрольованою. Відносно невелика різниця величин розрахункових енергій активації (0,3 ккал/моль) утворення двох регіоізомерів пояснює можливість утворення менш вигідного ізомеру. Моделювана на M06-2X-D3/6-

31G(d,p) рівні геометрія перехідного стану утворення ізомеру **5.4`b** зображена на рисунку 5.18.  $\Delta G$  утворення обох регіоізомерів (**5.4`b** та **5.4``b**), що ведуть до двох зареєстрованих продуктів реакції **5.4** та **5.4\*** практично однакові. Не дивлячись на невелику розраховану різницю енергії Гіббса реагентів та продуктів (-0,7 ккал/моль) реакція перебігає повно через швидке вилучення продуктів циклоприєднання у реакції окислення вихідним 5-гідрокси-1,4-нафтохіноном **13**. Останнє також вказує на кінетичний контроль регіоселективності даної взаємодії.

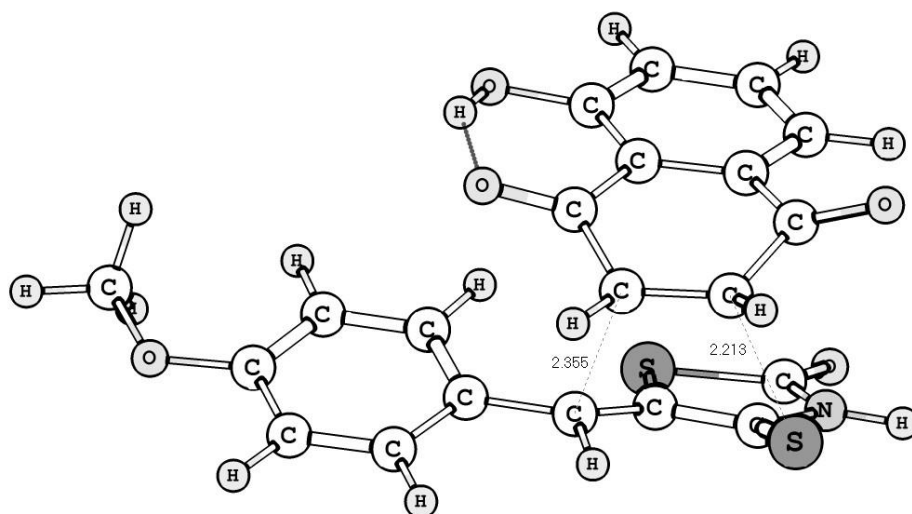


Рис. 5.18. M06-2X-D3/6-31G(d,p) модельована будова перехідного стану утворення продукту **5.4`b**.

Остання реакція можлива, оскільки вихідний 5-гідрокси-1,4-нафтохінон має більший окисний потенціал, ніж продукти реакції, через більш електронodefіцитний хіноідний цикл. Модельовані енергетичні профілі реакцій зображені на рисунку 5.19.

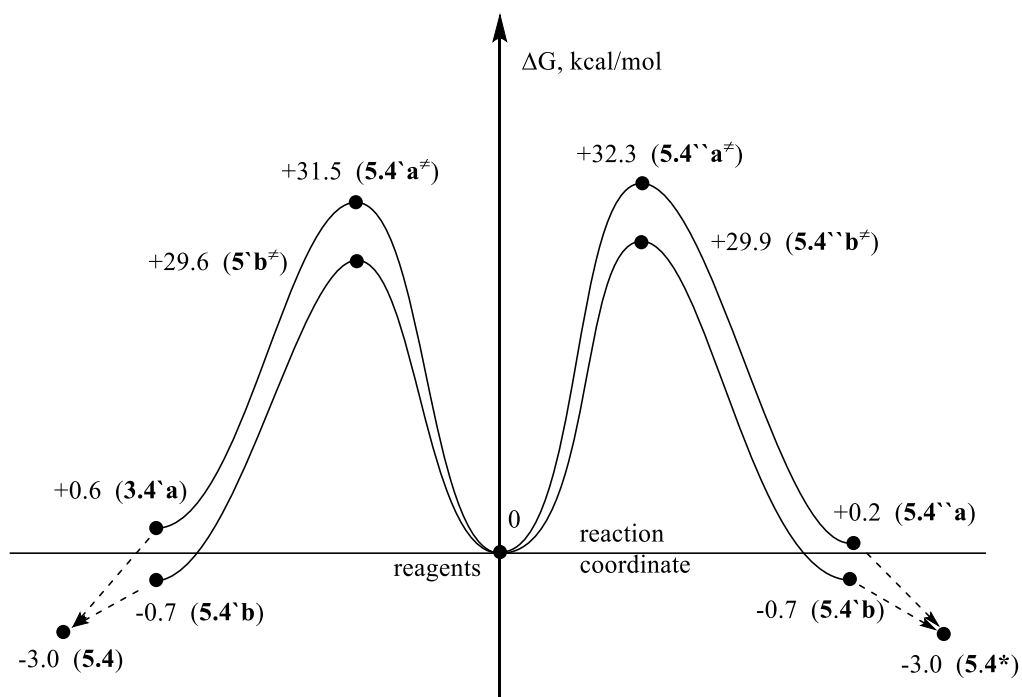


Рис 5.19. Розраховані на M06-2X-D3/6-31G(d,p) рівні енергетичні профілі шляхів взаємодії **4** та **13**.

### 5.3. Біологічна активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону.

#### 5.3.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI.

Враховуючи встановлений значний рівень протипухлинної активності деяких похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолу [365, 367], а також сполук, що вміщують фрагмент 1,4-нафтохінону у структурі [124, 396-398], для похідних **5.1-5.3**, **5.8-5.10**, **5.13**, **5.15**, **5.18-5.20** було проведено первинний скринінг у Національному Інституті раку у рамках Developmental Therapeutic Program (DTP) на панелі 60 ліній клітин раку в концентрації  $10^{-5}$  М [233-236]. Так, сполука **5.3** продемонструвала помірну цитотоксичну дію до деяких клітинних ліній із середнім значенням мітотичної активності ( $GP_{\text{mean}}$ ) в межах 68,86 %. З іншого боку, згідно з результатами скринінгу,

сполуки **5.1, 5.2, 5.8-5.10, 5.13, 5.15** та **5.18** проявили високий рівень протипухлинної активності зі значеннями  $GP_{mean}$  – -65,45% (**5.1**), -54,97% (**5.2**), 57,34% (**5.8**), 60,65% (**5.9**), 6,83% (**5.10**), -61,06% (**5.13**), -2,68% (**5.15**), та -38,57% (**5.18**), відповідно; діапазон мітотичної активності для сполуки **5.1** був в межах -100,00÷17,10; **5.2** – -99,98 ÷22,23; **5.8** – -38,52 ÷175,34; **5.9** – -89,07 ÷185,18; **5.10** – -99,22 ÷218,33; **5.13** – -99,55-18,52; **5.15** – -97,70÷145,55% та -95,81-139,14% для сполуки **5.15**. Крім того, зазначені сполуки пригнічували ріст 59 (**5.13**), 56 (**5.1, 5.2**), 50 (**5.15**), 48 (**5.10**), 28 (**5.18**), 23 (**5.8**), та відповідно, 21 (**5.9**) зі 60 досліджуваних ліній ракових клітин з діапазоном мітотичної активності більш ніж на 50%, і проявили не тільки цитостатичний ефект але також високу цитотоксичність (Таблиця 5.5, додатки Г.1-Г.11). Сполуки **5.18-5.20** проявили низький рівень протипухлинної активності щодо досліджуваних ліній клітин раку.

Таблиця 5.5

**Сумарні результати прескринінгу протипухлинної активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону на 60 лініях клітин (концентрація  $10^{-5}M$ )**

Сполука	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>5.1</b>	-65,45	-100,00÷17,10	CCRF-CEM, лейкемія / 15,80 HL-60(TB), лейкемія / -10,57 K-562, лейкемія / -3,84 MOLT-4, лейкемія / -20,61 RPMI-8226, лейкемія / 17,10 SR, лейкемія / 8,27 A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / -21,09 EKVX, недрібноклітинний рак легень / -96,20 HOP-62, недрібноклітинний рак легень / -76,11 HOP-92, недрібноклітинний рак легень / -18,87 NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / -76,19

			NCI-H23, недрібноклітинний рак легень/ -79,42 NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / -99,57 NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / -73,57 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -77,46 HCC-2998, рак прямої кишки / -98,03 HCT-116, рак прямої кишки / -82,48 HCT-15, рак прямої кишки / -80,55 HT29, рак прямої кишки / 1,21 KM12, рак прямої кишки / -55,79 SW-620, рак прямої кишки/ -84,21 SF-268, рак ЦНС / -43,09 SF-295, рак ЦНС / -96,80 SF-539, рак ЦНС / -100,00 SNB-19, рак ЦНС / -99,41 U251, рак ЦНС / -79,07 LOX IMVI, меланома / -90,85 MALME-3M, меланома / -100,00 M14, меланома / -92,48 MDA-MB-435, меланома / -57,28 SK-MEL-28, меланома / -98,08 SK-MEL-5, меланома / -99,71 UACC-257, меланома / -88,15 UACC-62, меланома / -82,93 IGROV1, рак яйників / -77,37 OVCAR-4, рак яйників / -92,24 OVCAR-5, рак яйників / -89,92 OVCAR-8, рак яйників / -39,42 NCI/ADR-RES, рак яйників / -9,35 SK-OV-3, рак яйників / -37,25 786-0, рак нирок / -86,01 A498, рак нирок / -94,26 ACHN, рак нирок / -100,00 CAKI-1, рак нирок / -39,97 RXF 393, рак нирок / -94,14 SN12C, рак нирок / -98,28 TK-10, рак нирок / -57,25 UO-31, рак нирок / -96,57 PC-3, рак простати / -26,28 DU-145, рак простати / -94,10 MCF7, рак молочної залози / -65,90
--	--	--	--

			<p>MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -64,88          HS 578T, рак молочної залози / -78,21          BT-549, рак молочної залози / -88,66          T-47D, рак молочної залози / -35,26          MDA-MB-468, рак молочної залози / -59,86</p>
5.2	-54,97	-99,98 ÷ 22,23	<p>CCRF-CEM, лейкемія / 19,04          HL-60(TB), лейкемія / -0,40          K-562, лейкемія / 3,06          MOLT-4, лейкемія / -8,45          RPMI-8226, лейкемія / 22,23          SR, лейкемія / 6,15          A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / -25,78          EKVX, недрібноклітинний рак легень / -79,18          HOP-62, недрібноклітинний рак легень / -64,96          HOP-92, недрібноклітинний рак легень / 15,99          NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / -62,42          NCI-H23, недрібноклітинний рак легень / -78,09          NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / -92,97          NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / -71,77          NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -55,65          HCC-2998, рак прямої кишки / -96,63          HCT-116, рак прямої кишки / -42,58          HCT-15, рак прямої кишки / -84,36          HT29, рак прямої кишки / -3,09          KM12, рак прямої кишки / -63,04          SW-620, рак прямої кишки / -86,29          SF-268, рак ЦНС / -12,01          SF-295, рак ЦНС / -96,82          SF-539, рак ЦНС / -99,49          SNB-19, рак ЦНС / -99,98          U251, рак ЦНС / -75,31          LOX IMVI, меланома / -88,90          MALME-3M, меланома / -99,83</p>

			<p>M14, меланома / -93,81  MDA-MB-435, меланома / -73,44  SK-MEL-28, меланома / -95,93  SK-MEL-5, меланома / -98,90  UACC-257, меланома / -83,50  UACC-62, меланома / -72,77  IGROV1, рак яйників / -33,54  OVCAR-4, рак яйників / -63,58  OVCAR-5, рак яйників / -76,62  OVCAR-8, рак яйників / -23,41  NCI/ADR-RES, рак яйників / -12,28  SK-OV-3, рак яйників / -1,84  786-0, рак нирок / -79,45  A498, рак нирок / -95,73  ACHN, рак нирок / -65,86  SAKI-1, рак нирок / -26,52  RXF 393, рак нирок / -83,60  SN12C, рак нирок / -98,21  TK-10, рак нирок / 19,95  UO-31, рак нирок / -45,30  PC-3, рак простати / -21,11  DU-145, рак простати / -95,93  MCF7, рак молочної залози / -69,64  MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -38,66  HS 578T, рак молочної залози / -84,76  BT-549, рак молочної залози / -84,32  T-47D, рак молочної залози / -0,10  MDA-MB-468, рак молочної залози / -57,72</p>
<b>5.3</b>	68,86	35,06÷95,20	<p>SR, лейкемія / 38,59  SF-539, рак ЦНС / 35,06  SAKI-1, рак нирок / 36,73  UO-31, рак нирок / 39,78  BT-549, рак молочної залози / 39,47</p>
<b>5.8</b>	57,34	-38,52÷175,34	<p>CCRF-CEM, лейкемія / -15,13  HL-60(TB), лейкемія / 9,91  K-562, лейкемія / 29,76  MOLT-4, лейкемія / 8,96  SR, лейкемія / 19,60  NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -24,43  COLO 205, рак прямої кишки / 47,71  HCT-116, рак прямої кишки / 10,97</p>



			<p> HCT-15, рак прямої кишки / 11,58  HT29, рак прямої кишки / 43,70  SW-620, рак прямої кишки / 32,55  LOX IMVI, меланома / -38,52  MALME-3M, меланома / -15,45  M14, меланома / 40,05  IGROV1, рак яйників / 29,91  OVCAR-3, рак яйників / 7,01  OVCAR-8, рак яйників / 45,32  NCI/ADR-RES, рак яйників / -20,28  RXF 393, рак нирок / 16,81  SN12C, рак нирок / 18,41  MCF7, рак молочної залози / 27,69  MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -6,96  MDA-MB-468, рак молочної залози / -33,69 </p>
<b>5.9</b>	60,65	-89,07 ÷ 185,18	<p> A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / 48,86  NCI-H23, недрібноклітинний рак легень / -42,18  NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / 26,71  NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / 47,69  COLO 205, рак прямої кишки / 12,33  HCT-15, рак прямої кишки / 35,06  HT29, рак прямої кишки / 33,87  SF-295, рак ЦНС / 48,60  LOX IMVI, меланома / -30,65  MALME-3M, меланома / -51,73  M14, меланома / 2,03  MDA-MB-435, меланома / -66,77  SK-MEL-5, меланома / -89,07  UACC-62, меланома / 45,44  OVCAR-3, рак яйників / 10,09  RXF 393, рак нирок / 49,55  SN12C, рак нирок / -98,21  PC-3, рак простати / 11,27  DU-145, рак простати / -87,65  MCF7, рак молочної залози / 1,86  MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / 44,28 </p>
<b>5.10</b>	6,83	-99,22 ÷ 218,33	CCRF-CEM, лейкемія / -30,40

			HL-60(TB), лейкемія / -0,66 K-562, лейкемія / 9,49 MOLT-4, лейкемія / 16,67 RPMI-8226, лейкемія / 15,48 SR, лейкемія / 10,15 A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / -18,01 EKVX, недрібноклітинний рак легень / 38,52 NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / 27,10 NCI-H23, недрібноклітинний рак легень / -54,45 NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / -20,49 NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / 7,83 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -50,98 COLO 205, рак прямої кишки / -81,08 HCC-2998, рак прямої кишки / -4,36 HCT-116, рак прямої кишки / 19,46 HCT-15, рак прямої кишки / -35,67 HT29, рак прямої кишки / 7,29 KM12, рак прямої кишки / 40,67 SW-620, рак прямої кишки / 7,84 SF-268, рак ЦНС / 15,58 SF-295, рак ЦНС / 14,04 SF-539, рак ЦНС / -18,89 SNB-19, рак ЦНС / 35,08 U251, рак ЦНС / 15,64 LOX IMVI, меланома / -66,73 MALME-3M, меланома / -79,50 M14, меланома / -36,62 MDA-MB-435, меланома / -76,17 SK-MEL-2, меланома / 7,11 SK-MEL-28, меланома / 33,99 SK-MEL-5, меланома / -99,22 UACC-257, меланома / 21,05 UACC-62, меланома / -56,78 IGROV1, рак яйників / -7,31 OVCAR-3, рак яйників / 12,42 OVCAR-8, рак яйників / 7,35 NCI/ADR-RES, рак яйників / -0,49
--	--	--	---

			<p>786-0, рак нирок / 49,14  САКІ-1, рак нирок / 42,70  RXF 393, рак нирок / -71,73  SN12С, рак нирок / -56,72  UO-31, рак нирок / 41,61  DU-145, рак простати / -96,87  MCF7, рак молочної залози / -48,38  MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -22,15  Т-47D, рак молочної залози / 14,07  MDA-MB-468, рак молочної залози / -58,92</p>
5.13	-61,06	-99,55÷18,52	<p>CCRF-CEM, лейкемія / 4,56  HL-60(TB), лейкемія / 2,03  K-562, лейкемія / 6,75  MOLT-4, лейкемія / 2,23  RPMI-8226, лейкемія / 12,29  SR, лейкемія / 18,52  A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / -59,21  EKVX, недрібноклітинний рак легень / -73,62  HOP-62, недрібноклітинний рак легень / -94,27  NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / -71,95  NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / -96,80  NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / -65,48  NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -75,87  COLO 205, рак прямої кишки / -75,56  HCC-2998, рак прямої кишки / -96,84  HCT-116, рак прямої кишки / -37,51  HCT-15, рак прямої кишки / -91,39  HT29, рак прямої кишки / -48,54  KM12, рак прямої кишки / -56,21  SW-620, рак прямої кишки / -77,46  SF-268, рак ЦНС / 5,02  SF-295, рак ЦНС / -93,51  SF-539, рак ЦНС / -99,51  SNB-19, рак ЦНС / -99,55  U251, рак ЦНС / -74,39</p>

			LOX IMVI, меланома / -52,29 MALME-3M, меланома / -99,39 M14, меланома / -96,71 MDA-MB-435, меланома / -90,20 SK-MEL-2, меланома / -82,70 SK-MEL-28, меланома / -97,15 SK-MEL-5, меланома / -96,94 UACC-257, меланома / -93,10 UACC-62, меланома / -83,08 IGROV1, рак яйників / -70,15 OVCAR-3, рак яйників / -5,68 OVCAR-4, рак яйників / -64,14 OVCAR-5, рак яйників / -92,95 OVCAR-8, рак яйників / -94,62 SK-OV-3, рак яйників / 1,09 786-0, рак нирок / -80,60 A498, рак нирок / -98,68 ACHN, рак нирок / -54,50 RXF 393, рак нирок / -97,36 SN12C, рак нирок / -92,79 UO-31, рак нирок / -92,90 PC-3, рак простати / 2,11 DU-145, рак простати / -88,03 MCF7, рак молочної залози / -82,31 MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -15,13 HS 578T, рак молочної залози / -16,46 BT-549, рак молочної залози / -99,86 T-47D, рак молочної залози / -30,63 MDA-MB-468, рак молочної залози / -75,22
5.15	-2,68	-97,70÷145,55	CCRF-CEM, лейкемія / 13,01 HL-60(TB), лейкемія / -17,57 K-562, лейкемія / 22,02 MOLT-4, лейкемія / 0,85 RPMI-8226, лейкемія / 18,69 SR, лейкемія / 15,82 A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / -47,70 HOP-62, недрібноклітинний рак легень / -72,16 NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / -20,66

		<p>NCI-H322M, недрібноклітинний рак легень / -97,70</p> <p>NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / -4,00</p> <p>NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -5,29</p> <p>COLO 205, рак прямої кишки / -89,41</p> <p>HCC-2998, рак прямої кишки / 4,16</p> <p>HCT-116, рак прямої кишки / -2,88</p> <p>HCT-15, рак прямої кишки / 10,77</p> <p>HT29, рак прямої кишки / 12,47</p> <p>SW-620, рак прямої кишки 12,96</p> <p>SF-295, рак ЦНС / -15,65</p> <p>SF-539, рак ЦНС / -24,05</p> <p>SNB-19, рак ЦНС / 13,57</p> <p>SNB-75, рак ЦНС / 32,43</p> <p>U251, рак ЦНС / 11,51</p> <p>LOX IMVI, меланома / -2,86</p> <p>MALME-3M, меланома / -92,30</p> <p>M14, меланома / -97,57</p> <p>MDA-MB-435, меланома / -45,28</p> <p>SK-MEL-2, меланома / -7,37</p> <p>SK-MEL-28, меланома / -28,79</p> <p>SK-MEL-5, меланома / -93,38</p> <p>UACC-257, меланома / -28,20</p> <p>UACC-62, меланома / -74,93</p> <p>IGROV1, рак яйників / 28,06</p> <p>OVCAR-4, рак яйників / 24,34</p> <p>OVCAR-5, рак яйників / 11,71</p> <p>OVCAR-8, рак яйників / 2,50</p> <p>NCI/ADR-RES, рак яйників / 9,22</p> <p>A498, рак нирок / 17,09</p> <p>ACHN, рак нирок / 39,60</p> <p>RXF 393, рак нирок / 32,48</p> <p>SN12C, рак нирок / -73,61</p> <p>UO-31, рак нирок / 25,15</p> <p>PC-3, рак простати / 8,77</p> <p>DU-145, рак простати / -93,91</p> <p>MCF7, рак молочної залози / -14,16</p> <p>MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / 8,88</p> <p>HS 578T, рак молочної залози / -10,35</p> <p>BT-549, рак молочної залози / -96,84</p> <p>T-47D, рак молочної залози / 23,64</p>
--	--	---

			MDA-MB-468, рак молочної залози / 7,85
<b>5.18</b>	38,57	-95,81÷139,14	CCRF-CEM, лейкемія / 6,61 HL-60(TB), лейкемія / 0,78 K-562, лейкемія / 11,12 MOLT-4, лейкемія / 17,60 RPMI-8226, лейкемія / 8,60 SR, лейкемія / 16,59 NCI-H23, недрібноклітинний рак легень / 4,03 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 43,37 HCT-116, рак прямої кишки / 12,49 HCT-15, рак прямої кишки / 7,20 SW-620, рак прямої кишки / 30,21 U251, рак ЦНС / 28,43 LOX IMVI, меланома / -13,49 MALME-3M, меланома / -80,48 M14, меланома / -56,76 MDA-MB-435, меланома / -85,98 SK-MEL-2, меланома / 33,80 SK-MEL-28, меланома / 21,40 SK-MEL-5, меланома / -95,81 UACC-62, меланома / 0,60 OVCAR-3, рак яйників / 3,26 RXF 393, рак нирок / 31,82 UO-31, рак нирок / 34,61 DU-145, рак простати / -92,98 MCF7, рак молочної залози / 23,05 MDA-MB-231/ATCC, рак молочної залози / -58,05 T-47D, рак молочної залози / 35,67 MDA-MB-468, рак молочної залози / -43,23
<b>5.19**</b>	88,33	51,21÷126,93	T-47D, рак молочної залози / 51,21
<b>5.20*</b>	90,58	45,25÷130,11	MALME-3M, меланома / 45,25

\* Для окремих ліній наведені дані з GP% ≤ 50%.

\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результат мітотичної активності однієї найбільш чутливої лінії.

На основі результатів прескринінгу сполуку-хіт **5.15** було відібрано для поглибленого вивчення в градієнті п'яти концентрацій (100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0.1 мкМ and 0.01 мкМ) згідно стандартної процедури DTP NCI. Сполука **5.15**

продемонструвала широкий спектр пригнічення росту практично всіх тестованих клітинних ліній із значеннями  $GI_{50}/TGI$  на рівні 2,91 і 14,70 мкМ, відповідно. Варто відзначити, що досліджувана молекула показала найвищий рівень активності відносно лінії клітин MALME-3М меланоми з цитотоксичністю на субмікромолярному рівні (0,75 мкМ). При розрахунку індексу селективності (SI), сполука **5.15** проявила низький рівень селективності як на рівні  $GI_{50}$ , так і на TGI (індекси селективності 0,18-3,88 і 0,21-7,35, відповідно) (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

**Протипухлинна активність 11-(фуран-2-іл)-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону 5.15 у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні**

Лінія клітин раку		$GI_{50}$ , мкМ	SI ( $GI_{50}$ )	TGI, мкМ	SI (TGI)	$LC_{50}$ , мкМ	SI ( $LC_{50}$ )
Лейкемія	CCRF-CEM	3,29	0,88	>100,0	-	>100,0	-
	HL-60(TB)	1,82	1,59	6,09	2,41	>100,0	-
	K-562	2,84	1,02	>100,0	-	>100,0	-
	MOLT-4	2,71	1,07	9,88	1,48	>100,0	-
	RPMI-8226	2,62	1,11	9,83	1,49	>100,0	-
	SR	3,05	0,95	69,5	0,21	>100,0	-
	<b>MG MID</b>	<b>2,72</b>	<b>1,06</b>	<b>49,21</b>	<b>0,29</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Недрібноклітинний рак легень	A549/ATCC	1,78	1,63	3,63	4,04	7,38	6,17
	EKVX	6,75	0,43	19,4	0,75	44,3	1,02
	HOP-62	2,04	1,42	3,74	3,93	6,86	6,63
	HOP-92	3,15	0,92	8,08	1,81	32,5	1,40
	NCI-H266	2,18	1,33	5,46	2,69	27,3	1,66
	NCI-H322M	1,71	1,70	3,13	4,69	5,74	7,93
	NCI-H460	1,54	1,31	3,48	4,22	7,84	5,80
	NCI-H522	2,31	1,25	6,99	2,10	26,4	1,74
	<b>MG MID</b>	<b>2,68</b>	<b>1,08</b>	<b>6,73</b>	<b>2,18</b>	<b>19,79</b>	<b>2,30</b>
Епітеліальний рак	COLO 205	1,89	1,53	3,61	4,07	6,93	6,57
	HCC-2998	2,50	1,16	5,51	2,66	18,4	2,47
	HCT-116	2,37	1,22	>100,0	-	>100,0	-
	HCT-15	1,75	1,66	3,88	3,78	8,59	5,30
	HT29	3,30	0,88	9,25	1,58	>100,0	-
	KM12	3,71	0,78	31,3	0,46	>100,0	-
	SW-620	3,28	0,88	10,5	1,4	52,7	0,86
	<b>MG MID</b>	<b>2,68</b>	<b>1,08</b>	<b>23,43</b>	<b>0,62</b>	<b>55,23</b>	<b>0,82</b>
Рак ЦНС	SF-268	3,48	0,83	19,2	0,76	>100,0	-
	SF-295	1,98	1,46	3,59	4,09	6,50	7,00

	SF-539	1,93	1,50	3,69	3,98	7,05	6,46
	SNB-19	2,60	1,11	7,33	2,00	26,1	1,74
	SNB-75	3,17	0,91	7,61	1,93	25,8	1,76
	U251	3,07	0,94	10,1	1,45	35,7	1,27
	<b>MG_MID</b>	<b>2,70</b>	<b>1,07</b>	<b>8,58</b>	<b>1,71</b>	<b>33,52</b>	<b>1,35</b>
Меланома	LOX IMVI	2,21	1,31	7,55	1,94	84,0	0,54
	MALME-3M	0,75	3,88	2,00	7,35	4,75	9,58
	M14	1,06	2,74	2,37	6,20	5,26	8,65
	MDA-MB-435	1,16	2,50	2,47	5,95	5,26	8,65
	SK-MEL-2	3,51	0,82	16,4	0,89	52,9	0,86
	SK-MEL-28	1,87	1,55	3,72	3,95	7,42	5,90
	SK-MEL-5	1,59	1,83	3,00	4,90	5,68	8,01
	UACC-257	1,57	1,85	3,26	4,50	6,75	6,78
	UACC-62	1,76	1,65	3,43	4,28	-	-
	<b>MG_MID</b>	<b>1,72</b>	<b>1,69</b>	<b>4,91</b>	<b>2,99</b>	<b>19,11</b>	<b>2,38</b>
Рак яєчників	IGROV1	2,51	1,15	6,14	2,39	38,0	1,19
	OVCAR-3	2,86	1,01	14,0	1,05	>100,0	-
	OVCAR-4	1,79	1,62	3,95	3,72	8,71	5,22
	OVCAR-5	2,13	1,36	4,58	3,20	9,85	4,62
	OVCAR-8	2,46	1,18	8,97	1,63	36,2	1,25
	NCI/ADR-RES	3,02	0,96	12,3	1,19	>100,0	-
	SK-OV-3	15,5	0,18	29,6	0,49	56,5	0,80
		<b>MG_MID</b>	<b>4,32</b>	<b>0,67</b>	<b>11,36</b>	<b>1,29</b>	<b>49,89</b>
Рак нирок	786-0	7,09	0,41	24,2	0,60	71,2	0,63
	A498	3,48	0,83	9,69	1,51	31,6	1,44
	ACHN	4,08	0,71	16,1	0,91	40,1	1,13
	CAKI-1	3,29	0,88	13,9	1,05	37,3	1,22
	RXF 393	2,02	1,44	5,57	2,63	20,1	2,26
	SN12C	1,74	1,67	3,49	4,21	6,99	6,51
	TK-10	12,3	0,23	26,4	0,55	56,4	0,80
	UO-31	2,56	1,13	13,5	1,08	36,7	1,24
		<b>MG_MID</b>	<b>4,57</b>	<b>0,63</b>	<b>14,10</b>	<b>1,04</b>	<b>37,54</b>
Рак простати	PC-3	2,75	1,05	21,6	0,68	>100,0	-
	DU-145	1,55	1,87	3,01	4,88	5,81	7,83
		<b>MG_MID</b>	<b>2,15</b>	<b>1,35</b>	<b>12,30</b>	<b>1,19</b>	<b>52,90</b>
Рак молочної залози	MCF7	1,39	2,09	3,34	4,40	8,04	5,66
	MDA-MB-231/ATCC	2,73	1,06	9,08	1,61	>100,0	-
	HS 578T	2,20	1,32	6,56	2,24	>100,0	-
	BT-549	1,64	1,77	3,19	4,60	6,22	7,32
	T-47D	2,87	1,01	13,0	1,13	>100,0	-
	MDA-MB-468	2,01	1,44	6,59	2,23	>100,0	-
		<b>MG_MID</b>	<b>2,14</b>	<b>1,35</b>	<b>6,96</b>	<b>2,11</b>	<b>69,04</b>
<b>MG_MID</b>		<b>2,91</b>		<b>14,70</b>		<b>45,55</b>	

Аналіз взаємозв'язку структура-активність синтезованих поліциклічних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу доводить критичний вплив нафтохінонового



фрагменту на прояв протипухлинної активності. Цікаво, що тіопірано[2,3-*d*]тіазоли з фрагментом юглоу у структурі у більшості випадків проявлять вищий рівень протипухлинної активності у порівнянні зі сполуками на основі незаміщеного 1,4-нафтохінону. Варто також відзначити, що у ряді зазначених активних сполук не спостерігається чіткої кореляції між рівнем протиракової активності та природою замісника у положенні С-11 базового тіопіранотіазольного ядра.

5.3.2. Поглиблене вивчення цитотоксичності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону щодо нормальних та ряду пухлинних клітинних ліній методом МТТ аналізу.

У зв'язку з перспективними результатами скринінгу в межах програми DTP NCI синтезовані тіопірано[2,3-*d*]тіазоли на основі юглоу (сполуки **5.1-5.5**, **5.8**, **5.10**, **5.12-5.15**, **5.18** та **5.21**) були протестовані на їх потенційну протипухлинну активність щодо додаткових ліній ракових клітин, а саме раку товстої кишки НСТ-116 та НСТ-116 p53(-/-), раку молочної залози MCF-7, лейкемії лінії K562 та раку шийки матки лінії KB3-1. Як препарат порівняння у даному дослідженні було використано доксорубіцин. Так, сполуки **5.1-5.4**, **5.10** та **5.15** продемонстрували найвищий цитотоксичний ефект щодо всіх досліджуваних пухлинних ліній із значеннями IC<sub>50</sub> в межах 0,6-31,16 мкМ. В цей же час висока активність сполук **5.1**, **5.10** та **5.15** спостерігалась щодо клітин раку товстої кишки (значення IC<sub>50</sub> 0,75, 0,94 та 0,6 мкМ, відповідно, таблиця 5.7), яка суттєво залежала від рівня протеїну p53 в клітині, зокрема клітинна лінія НСТ-116 дикого типу була більш чутливою до дії зазначених сполук порівняно з лінією з дефіцитом протеїну p53. Похідні **5.4** і **5.15** діяли набагато більш специфічно на клітинну лінію KB3-1 із значенням IC<sub>50</sub> 0,87 та 0,75 мкМ, відповідно. Клітини лейкемії лінії K562 виявили чутливість до дії сполук **5.1**, **5.2**,

**5.4** та **5.15**. Лінія клітин раку молочної залози MCF-7 була найбільш сприятлива до впливу сполуки **5.10** ( $IC_{50} = 0,95$  мкМ). Цікаву селективність щодо раку молочної залози лінії MCF-7 показала сполука **5.8**, яка виявила активність тільки для зазначеної клітинної лінії. Сполуки **5.5**, **5.13** та **5.14** показали помірну цитотоксичну активність зі значеннями  $IC_{50}$  від 4,53 до 30,86 мкМ, тоді як клітини лінії MCF-7 були найменш чутливими до цих похідних порівняно з іншими пухлинними клітинами. Сполуки **5.12**, **5.18** та **5.21** проявили низьку цитотоксичну активність зі значеннями  $IC_{50}$  в межах  $9,48 > 50$  мкМ). У якості сполуки порівняння у даному дослідженні було використано також 5-гідрокси-1,4-нафтохінон (юглон), який виявив помітно меншу активність порівняно з більшістю активних сполук **5.1**, **5.4**, **5.10** та **5.15**.

Для синтезованих тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі юглону (**5.1-5.5**, **5.8**, **5.10**, **5.12-5.15**, **5.18** та **5.21**) вивчалась токсичність щодо епідермальних кератиноцитів людини лінії HaCaT, макрофагів миші лінії J774.2 та нормальних фібробластів миші лінії NIH 3T3. Так, клітини лінії HaCaT виявилися нечутливими до дії досліджуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів зі значеннями  $IC_{50}$  в межах  $37,16 > 50$  мкМ. Проте для мишачих макрофагів лінії J774.2 та нормальних фібробластів миші NIH 3T3 досліджувані сполуки були досить токсичними, значення  $IC_{50}$  коливалось від 0,83 до  $> 50$  мкМ.

Таблиця 5.7

**$IC_{50}$  досліджуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі юглону (МТТ тест протягом 72 годин,  $M \pm SD$ , n/d- не визначено)**

Сполука/ Клітинна лінія	HCT-116	HCT-116 p53 (-/-)	MCF-7	KB3-1	K562	J774.2	NIH 3T3	HaCaT
<b>5.1</b>	<b>0,75±0,35</b>	<b>3,86±0,32</b>	<b>9,34±0,12</b>	<b>3,64±0,43</b>	<b>11,83±0,38</b>	<b>5,25±0,67</b>	<b>36,95±0,87</b>	>50
<b>5.2</b>	4,70±0,22	3,82±0,19	31,16±0,32	2,74±0,18	6,31±0,11	2,03±0,41	30,44±0,45	>50
<b>5.3</b>	4,12±0,11	3,10±0,41	7,50±0,56	3,33±0,21	19,22±0,22	5,27±0,23	46,63±0,13	>50
<b>5.4</b>	<b>3,19±0,13</b>	<b>3,26±0,9</b>	<b>6,10±0,21</b>	<b>0,87±0,11</b>	<b>5,66±0,31</b>	<b>2,95±0,25</b>	<b>6,78±0,34</b>	<b>40,84±0,44</b>
<b>5.5</b>	6,15±0,33	8,83±0,25	>50	7,21±0,41	22,90±0,18	26,89±0,98	>50	>50
<b>5.8</b>	35,60±0,21	43,70±0,41	7,41±0,41	46,38±1,09	28,38±0,87	7,44±0,11	n/d	n/d
<b>5.10</b>	<b>0,94±0,11</b>	<b>2,16±0,43</b>	<b>0,95±0,10</b>	<b>6,94±0,18</b>	<b>15,68±0,56</b>	<b>0,83±0,45</b>	n/d	n/d
<b>5.12</b>	40,63±0,13	41,69±0,55	>50	47,53±0,30	33±0,54	30,83±0,65	n/d	n/d
<b>5.13</b>	5,13±0,22	5,36±0,98	24,08±0,13	4,53±0,31	21,52±0,48	6,81±0,34	39,08±	>50
<b>5.14</b>	5,44±0,80	6,28±0,87	29,02±0,20	5,54±0,35	30,86±0,22	6,77±0,25	38,89±	n/a
<b>5.15</b>	<b>0,6±0,24</b>	<b>2,37±0,43</b>	<b>3,08 ± 0,41</b>	<b>0,75±0,29</b>	<b>5,98±0,41</b>	<b>2,59±0,13</b>	<b>6,07±±0,41</b>	<b>37,16±0,56</b>
<b>5.18</b>	12,9±0,11	36,20±0,21	9,48±0,11	23,38±0,98	26,80±0,45	26,39±0,38	>50	>50
<b>5.21</b>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n/d	n/d
<b>Юглон</b>	31,6	n/d	n/d	26,4	n/d	13,36	n/d	n/d
<b>Доксорубіцин</b>	0,58±0,10	0,63±0,08	0,62±0,13	0,56±0,25	0,59±0,11	0,56±0,98	0,72±1,0	4,56±0,78

Сполука-хіт **5.15** була досліджена на антилейкемічну активність щодо лімфоцитів, отриманих з трьох груп периферичної крові донорів, а саме крові хворих з нелікованою хронічною лімфоцитарною лейкемією (ХЛЛ), крові пацієнтів, які отримували лікування бендамустином та крові донорів з рецидивом хронічної лімфолейкемії після 4 років ремісії (Таблиця 5.8). Значення  $IC_{50}$  для кожної з груп становило  $>50$ ,  $8,24$  і  $28,18$  мкМ, відповідно. Варто відзначити, що сполука **5.15** проявила активність подібну до доксорубіцину щодо лімфоцитів, отриманих з донора, який піддавався лікуванню бендамустином, проте інші типи лімфоцитів були стійкі до дії даної сполуки. Зазначена сполука не була токсичною щодо виділених лімфоцитів з крові здорового донора ( $IC_{50} >50$  мкМ).

Таблиця 5.8

**Цитотоксичність сполуки 5.15 та доксорубіцину щодо лімфоцитів ( $IC_{50}$ ,  
МТТ тест, 72 години інкубації,  $M \pm SD$ )**

Сполука/ клітинна лінія	Нелікована ХЛЛ	ХЛЛ у стані лікування	ХЛЛ у стані ремісії	Лімфоцити здорового донора
<b>5.15</b>	$>50$	$8,24 \pm 0,32$	$28,18 \pm 0,68$	$>50$
Дох	$>10$	$8,6 \pm 0,98$	$7,33 \pm 1,03$	$10 \pm 2,01$

Виходячи з отриманих даних, сполука **5.15** продемонструвала подібну до доксорубіцину неселективну протипухлинну активність, але була менш токсичною щодо псевдонормальних клітин (HaCaT, макрофагів миші та нормальних фібробластів миші), а також ізольованих лімфоцитів здорового донора.

На додаток до МТТ аналізу нами було досліджено, чи може сполука **5.15** пригнічувати утворення колоній окремих ракових клітин. Для цього нами було використано клоногенний аналіз. Так, було виявлено, що частка виживання клітин після експозиції сполукою **5.15** була майже в 14 разів більшою, ніж частка виживання після інкубації клітин лінії KB-3-1 доксорубіцином у тій же

концентрації (100 нМ), який використовувався як позитивний контроль. Але при концентрації 500 нМ сполуки **5.15** нами не спостерігалось утворення жодної клітинної колонії після 72 год експозиції сполукою (рис. 5.16).

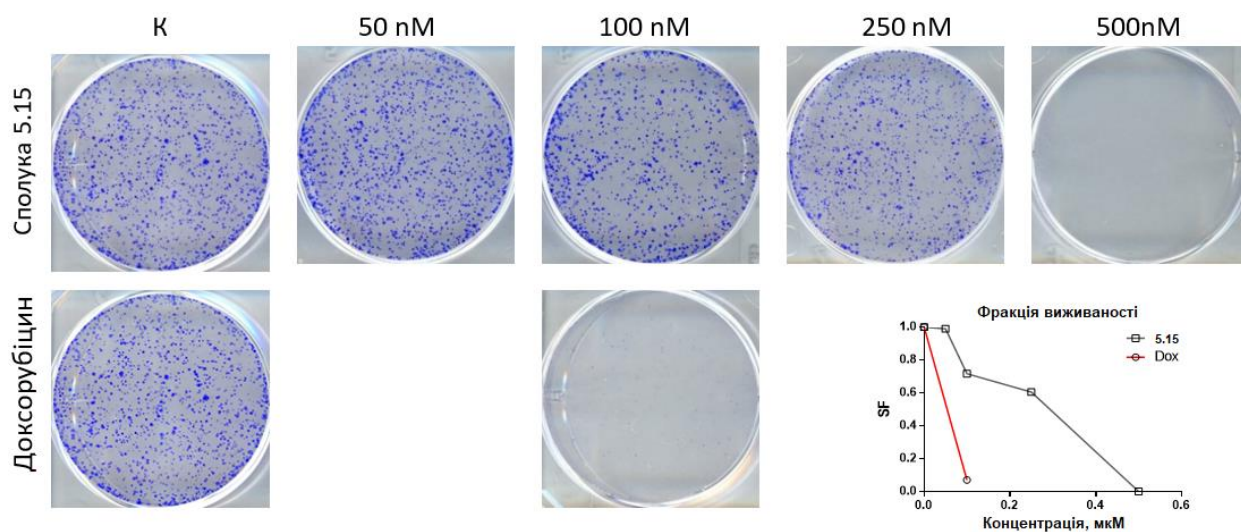


Рис. 5.16. Репрезентативне зображення лунок з культурами клітин і графічні дані результату тесту на формування колоній виконаного на клітинах лінії KB-3-1.

Продовжуючи дослідження протиракової активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону нами було проведено оцінку цитотоксичності похідних **5.7**, **5.9**, **5.11**, **5.17**, **5.19** та **5.20** щодо пухлинних і псевдонормальних клітин *in vitro*. Аналіз життєздатності клітин оцінювали методом МТТ через 72 години після обробки клітин різними концентраціями досліджуваних сполук при використанні доксорубіцину як препарату порівняння. Життєздатність клітин і значення  $IC_{50}$  для досліджуваних сполук наведені на рисунку 5.17 та у таблиці 5.9. Так, найбільш активною виявилася сполука **5.20** з максимальним ефектом на лінії клітин лейкемії. Зазначена сполука проявила високу цитотоксичність щодо клітин Т-лейкемії Jurkat у всіх досліджуваних концентраціях з величиною  $IC_{50}$  0,76 мкМ. Моноцитарні клітини лейкемії людини лінії ТНР-1 [432], виділені з периферичної крові також були чутливі до впливу сполуки **5.20** зі значенням  $IC_{50}$  7,94 мкМ. Сполука **5.20** інгібує також життєздатність клітин епідермоїдної карциноми (KB3-1 та її сублінії KBC-1 із надлишковою експресією ABCB1) та карциноми товстої кишки (HCT116wt

та її сублінії p53 НСТ116 p53-/-). Відомо, що ABCB1 (Р-глікопротеїн), MRP1/ABCC1 (білок множинної резистентності до лікарських засобів типу 1) і BCRP/BCG2 (білок резистентності раку молочної залози) є ключовими маркерами в резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії [433]. Слід зазначити, що сполука **5.20** продемонструвала виражене пригнічення росту лінії КВС-1 ( $IC_{50} = 12,81$  мкМ).  $IC_{50}$  сполуки **5.20** становив 27,66 мкМ щодо лінії клітин KB3-1. Нами було виявлено значно нижчі значення  $IC_{50}$  сполук **5.9**, **5.17** та **5.20** щодо лінії НСТ116wt порівняно з клітинами НСТ116 p53-/- .  $IC_{50}$  даних сполук відносно даних ліній коливався від 5,54 до 6,81 мкМ та від 12,34 до >50 мкМ, відповідно. Таким чином, на основі результатів досліджень встановлено, що рівень p53 протеїну у клітинах карциноми товстої кишки чітко корелює із рівнем протипухлинної активності досліджуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі 1,4-нафтохінону. Зокрема протеїн p53 маючи різноманітні мутації майже у всіх пухлинах людини, стимулює їх гіперпроліферацію, інвазію/метастазування та, таким чином, впливає на ефективність різних хіміотерапевтичних засобів (зокрема препаратів платини та антиметаболітів). p53-Дефіцитні або p53-мутантні пухлини часто мали більш агресивний фенотип і більш виражену хіміо- та радіорезистентність [434]. Ґрунтуючись на результатах МТТ аналізу, можна припустити чітку залежність дії сполуки **5.20** та рівня білка p53 щодо впливу на клітини раку товстої кишки.

Похідні **5.7**, **5.9** та **5.20** володіли антипроліферативною дією щодо гормонозалежної, естроген- та прогестерон рецептор-позитивної лінії клітин MCF-7 з величинами  $IC_{50}$  9,19, 8,47 та 8,94 мкМ, відповідно [435]. Клітини лінії K562 були помірно чутливими до дії сполук **5.11** і **5.17**, із значеннями  $IC_{50}$  13,00 і 7,11 мкМ, відповідно. Доксорубіцин виявився більш цитотоксичним на лінії клітин епідермоїдної карциноми, раку товстої кишки, карциноми молочної залози та меланоми (рис. 5.17, табл. 5.9). У той же час сполука **5.19** показала слабку активність на досліджуваних клітинних лініях. Як сполуку порівняння нами також використано 1,4-нафтохінон (1,4-NQ), що володів слабкою активністю щодо клітин ліній KB3-1 і КВС-1 ( $IC_{50}$  20,74 і 8,33 мкМ, відповідно).

Таблиця 5.9

**Цитотоксичність досліджуваних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу та 1,4-нафтохінону (1,4-NQ) на ріст окремих пухлинних клітинних ліній**

Клітинна лінія	IC <sub>50</sub> , мкМ							
	5.7	5.9	5.11	5.17	5.19	5.20	1,4-NQ	Dox
KB3-1	36,99	39,22	28,81	26,01	>50	27,66	20,74	0,73
KBC-1	ND	ND	ND	ND	ND	12,81	8,33	1,97
Jurkat	ND	ND	ND	ND	ND	0,76	ND	0,67
THP-1	ND	ND	ND	ND	ND	7,94	ND	13,97
HCT116wt	29,19	6,81	15,84	5,54	43,55	6,37	ND	0,07
HCT116 p53-/-	40,34	>50	11,09	25,22	>50	12,34	ND	0,58
MCF-7	9,19	8,47	26,75	34,34	>50	8,94	ND	0,63
HaCaT	ND	ND	ND	ND	ND	>100	ND	0,80
J774.2	24,44	0,74	30,52	11,07	>50	9,57	ND	0,97
Ізольовані лімфоцити	ND	ND	ND	ND	ND	58,66	62,93	1,00
K562	43,72	26,00	13,00	7,11	>50	25,67	ND	0,62

ND – не визначено.

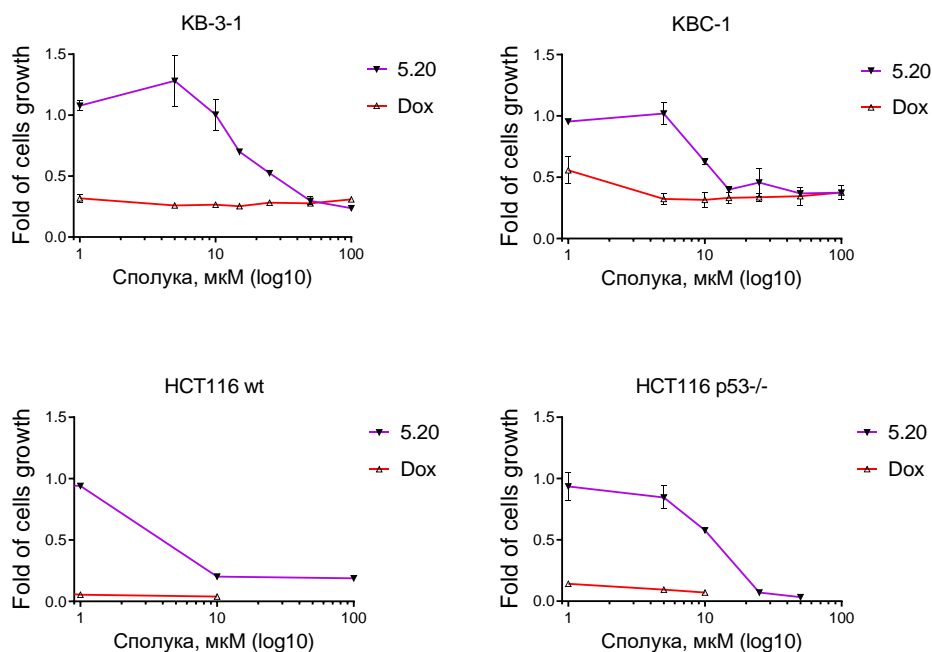


Рис. 5.17. Криві життєздатності клітин епідермоїдної карциноми (KB3-1, KBC-1) та раку товстої кишки (HCT116wt, HCT116 p53-/-) при дії сполуки **5.20** і доксорубіцину. Антипроліферативну активність аналізували методом МТТ протягом 72 години експозиції. Дані представлені як  $M \pm SD$ ,  $n = 3$ .

Сполука **5.20** показала також низьку токсичність щодо кератиноцитів людини лінії HaCaT з величиною  $IC_{50} >100$  мкМ. Ізольовані лімфоцити периферичної крові людини та мишачі макрофаги лінії J774.2 були більш чутливими до дії сполуки **5.20**. Так, зазначена молекула викликала 50% зниження життєздатності ізольованих нормальних лімфоцитів людини у концентрації 58,66 мкМ. Сполука **5.20** досягала значення  $IC_{50}$  при 9,57 мкМ для клітинної лінії макрофагів J774.2. Окрім того, похідне викликало помірне зниження життєздатності клітинних ліній лінії HaCaT, J774.2 та ізольованих нормальних лімфоцитів людини. Клітини, отримані з крові донорів, були більш чутливими до впливу сполуки **5.20**. Доксорубіцин знижував виживаність псевдонормальних клітин та ізольованих лімфоцитів людини зі значеннями  $IC_{50}$  0,8-1,0 мкМ (рис. 5.18, табл. 5.9).

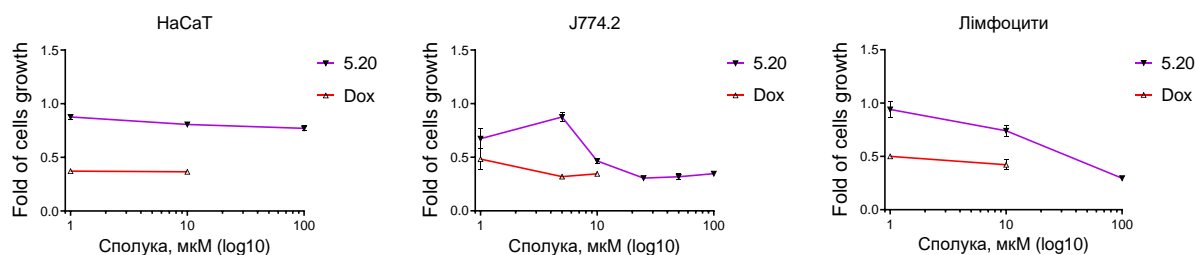


Рис. 5.18. Життєздатність кератиноцитів людини лінії HaCaT, мишачих макрофагів лінії J774.2 та ізольованих лімфоцитів периферичної крові людини при впливі різних концентрацій сполуки **5.20** і доксорубіцину (Dox) протягом 72 годин. Антипроліферативну активність досліджуваних сполук аналізували методом МТТ після 72 год експозиції. Дані представлені як  $M \pm SD$ ,  $n = 3$ .

5.3.3. Дослідження клітинної морфології клітин лінії KB3-1 індукованої сполуками-хітами **5.15** та **5.20**.

Для дослідження потенційних шляхів впливу похідних **5.15** та **5.20** на досліджувані лінії клітин нами було проведено флуоресцентну мікроскопію

після фарбування барвником Hoechst-33342. Так, барвник Hoechst-33342 було використано для підтвердження цитотоксичних ефектів сполуки **5.15** щодо клітин лінії KB3-1, який реалізується шляхом активації апоптозу. Обробка клітин лінії KB3-1 сполукою **5.15** призводила до чітких цитоморфологічних змін, зокрема спостерігався конденсований хроматин і опуклості мембрани (рис. 5.19B), які можна виявити під впливом досліджуваної сполуки у порівнянні з необробленими (контрольними) клітинами (рис. 5.19A). Доксорубіцин індукував подібні зміни (конденсацію хроматину та опуклості мембрани) в оброблених клітинах лінії KB3-1 (рис. 5.19C). Як наслідок, на основі результатів флуорисцентної мікроскопії можна припустити, що сполука **5.15** викликає проапоптотичні цитоморфологічні зміни в клітинах раку шийки матки лінії KB3-1. Окрім того, сполука **5.15** здатна до червоної флуоресценції в оброблених клітинах, подібно до доксорубіцину, що відповідно, є також важливим у детекції та оцінці локалізації зазначеної сполуки у досліджуваних пухлинних клітинах.

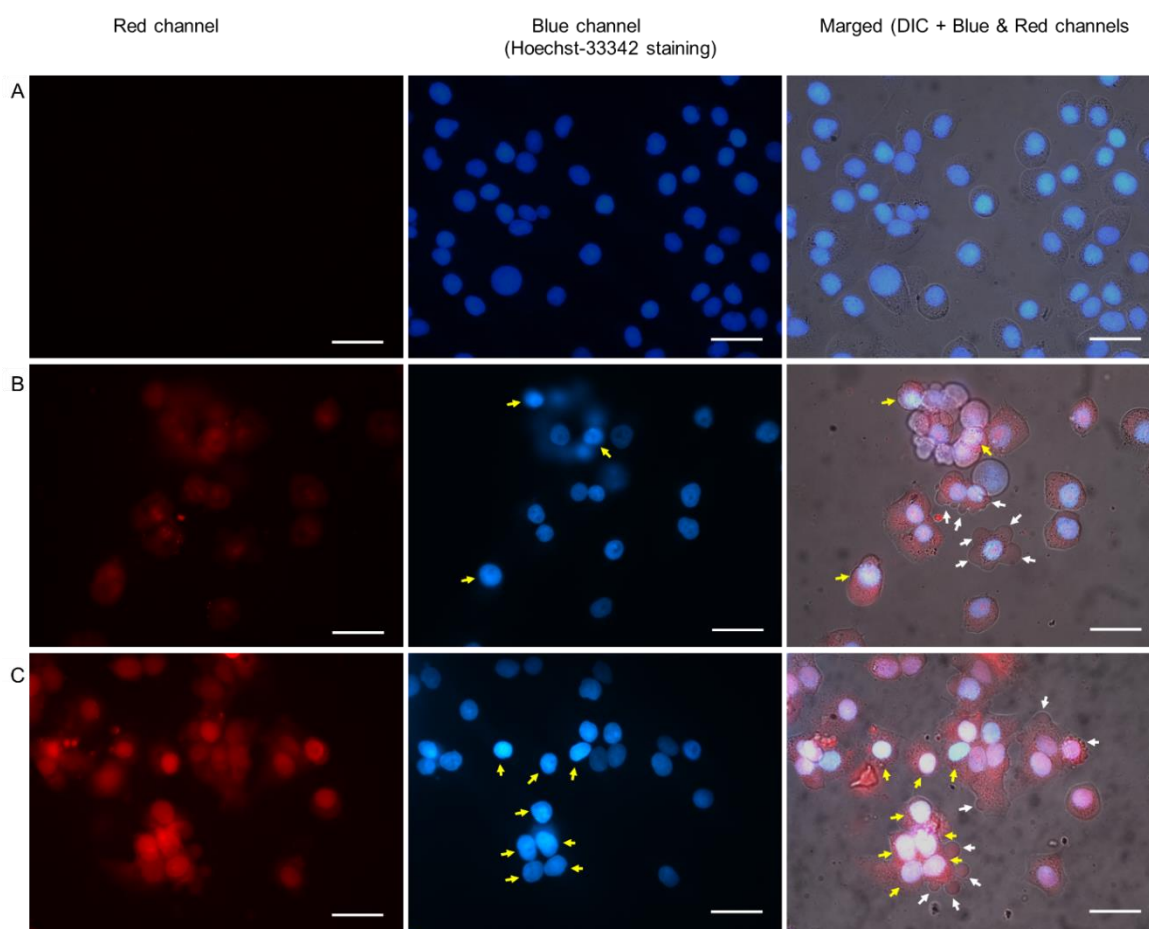




Рис. 5.19. Фотографії клітин лінії KB3-1, які спостерігали після обробки барвником Hoechst-33342 після 24-годинної експозиції: А – контрольні (необроблені) клітини; В – клітини, оброблені сполукою **5.15** (1 мкМ); С – клітини, оброблені доксорубіцином (1 мкМ). Шкала масштабування = 20 мкм.

При проведенні флуоресцентної мікроскопії після фарбування барвником Hoechst-33342 спостерігались також значні цитоморфологічні зміни в клітинах лінії KB3-1 при обробці сполукою **5.20**, які, проте, були менш виражені у порівнянні з контролем (рис. 5.20А) і супроводжувались конденсованим хроматином і мембраною (рис. 5.20В). Окрім того, можна чітко побачити гігантські клітини досліджуваної лінії KB3-1 з аномальними ядрами та пухким хроматином (рис. 5.20В), як наслідок мітотичної катастрофи, яка могла статися під час або після аберрантного мітозу. Мітотична катастрофа була описана як особливий приклад апоптозу, що впливає на пермеабілізацію мітохондріальної мембрани та активацію каспази [436]. У контрольних клітинах KB3-1 спостерігались інтактні ядра правильної форми. Доксорубіцин спричинив конденсацію хроматину та опуклість мембрани (рис. 5.20С). Таким чином, на основі флуоресцентної мікроскопії встановлено, що сполука **5.20** індукує проапоптотичні цитоморфологічні зміни в оброблених клітинах лінії KB3-1. Як показано на малюнку 5.20В, сполука **5.20** здатна до червоної флуоресценції (DIC+червоний канал) у досліджуваних клітинах, подібно доксорубіцину (фігура 5.20С) та частково до сполуки **5.15** і більш концентрується в ділянці ядра.

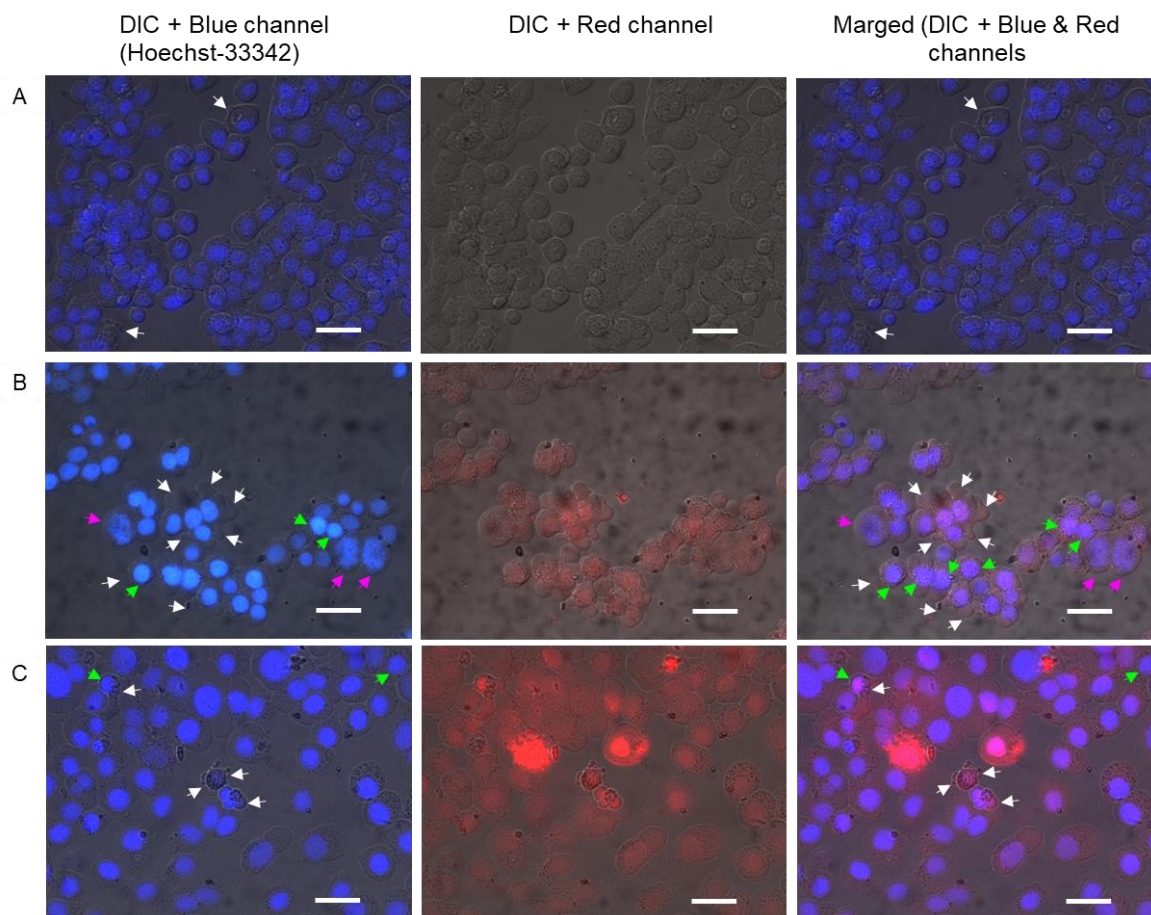


Рис. 5.20. Фотографії клітин лінії KB3-1, які спостерігали після обробки барвником Hoechst-33342 після 24-годинної експозиції: А – контрольні (необроблені) клітини; В – клітини, оброблені похідним **5.20** (1 мкМ), С – клітини, оброблені доксорубіцином (1 мкМ). Шкала масштабування = 20 мкм.

5.3.4. Дослідження впливу сполуки 5.15 на клітинний цикл у клітинах лейкемії лінії CCRF-CEM.

Порушення регуляції клітинного циклу є важливою ознакою у процесах перетворення нормальних клітин у злоякісні. Через роль, яку відіграє клітинний цикл у розвитку канцерогенезу, ряд інгібіторів клітинного циклу останніми роками відіграють все більшу роль як терапевтичні агенти у лікуванні раку, як окремо, так і в поєднанні із іншими лікарським засобами або іншими методами лікування [437].

Клітини лейкемії CCRF-CEM було використано як модельну клітинну лінію для дослідження впливу сполуки **5.15** на клітинний цикл. Зазначена клітинна лінія була чутлива до дії сполуки **5.15** з величиною  $IC_{50}$   $4,14 \pm 0,32$  мкМ. Сполука **5.15** збільшує відсоток клітин у фазі суб-G1 клітинного циклу в  $1 \times IC_{50}$  і ще більше в концентрації  $5 \times IC_{50}$  (Таблиця 5.10). Пік фази суб-G1 складається з апоптичних клітин, а також клітин, які вже втратили свою ДНК через вивільнення апоптичних тілець, клітинних фрагментів з частками хроматину, пошкоджених ядер, хромосом і клітинного детриту [438]. Сполука **5.15** показала тенденцію до зменшення частки клітин у фазі G0/G1 та збільшення відсотка клітин у фазі G2/M порівняно з контролем. Окрім того сполука **5.15** показала зниження синтезу ДНК і РНК.

Таблиця 5.10

**Вплив сполуки 5.15 на клітинний цикл (G0/G1, S, G2/M), апоптоз (суб-G1), М-фази (+pH3<sup>Ser10</sup>), синтез ДНК і РНК у клітинах лінії CCRF-CEM**

Випробувана концентрація	Суб-G1 (апоптоз)	G0/G1	S	G2/M	>G2/M	M	Синтез ДНК	Синтез РНК
Контроль	2,36± 0,049	38,68± 0,75	41,09± 0,50	20,24± 0,25	10,09± 0,14	1,97± 0,042	42,40± 0,66	31,80± 1,17
$1 \times IC_{50}$ (4,14 мкМ)	5,02	34,34	41,83	23,82	12,23	1,25	19,29	23,46
$5 \times IC_{50}$ (20,7 мкМ)	5,80	35,58	42,33	22,09	20,54	1,70	0,90	0,07

5.3.5. Вестерн-блот аналіз білків при стресі ендоплазматичного ретикулуму у клітинних лізатах лінії KB-3-1 при дії сполуки **5.15**.

Відомо, що 5-гідрокси-1,4-нафтохінон (юглон) має здатність викликати апоптоз шляхом стресу ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) [439]. Відповідно, наступним кроком нашої роботи було перевірити, як змінюється кількість білків, що беруть участь у стресі ЕР на прикладі сполуки **5.15**, що вміщує фрагмент юглону у структурі. Нами було використано Вестерн-блот аналіз для ідентифікації VIP (білок, що зв'язує важкий ланцюг імуноглобуліну), PDI

(оксидоредуктаза протеїн-дисульфід ізомерази) і калнексину в клітинних лізатах клітин лінії KB-3-1 після інкубації з сполукою **5.15** за певний час (3 та 24 години) та залежно від дози (концентрація сполуки **5.15** становила 0,5, 2,5 та 5 мкМ, відповідно). Протягом 3 годин впливу сполуки жодних змін не спостерігалося для будь-яких досліджених білків, а через 24 години спостерігалося дозозалежне збільшення рівня ВІР (рис. 5.21). ВІР - це молекулярний шаперон HSP70, розташований у просвіті ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), який зв'язує новосинтезовані білки, коли вони переміщуються в ЕР, і підтримує їх у стані, придатному для подальшого згортання та олігомеризації. Як цільовий генний продукт UPR (відповідь на незгорнутий білок), ВІР посилюється, коли фактори транскрипції UPR зв'язуються з елементом UPR у промоторній області ДНК ВІР [440]. UPR активується у відповідь на накопичення розгорнутих або неправильно згорнутих білків у просвіті ендоплазматичного ретикулуму. У цьому сценарії UPR має три цілі: спочатку відновити нормальну функцію клітини шляхом припинення трансляції білків, деградації неправильно згорнутих білків і активації сигнальних шляхів, які призводять до збільшення виробництва молекулярних шаперонів, залучених до згортання білка. Якщо ці цілі не досягаються протягом певного проміжку часу або порушення триває, UPR спрямований на апоптоз [441]. Ці дані відповідають даним експерименту зі ДНК драбинками, де ми спостерігали фрагментацію ДНК, починаючи з використанням 2,5 мкМ концентрації досліджуваної сполуки **5.15** після 24 годин експозиції.

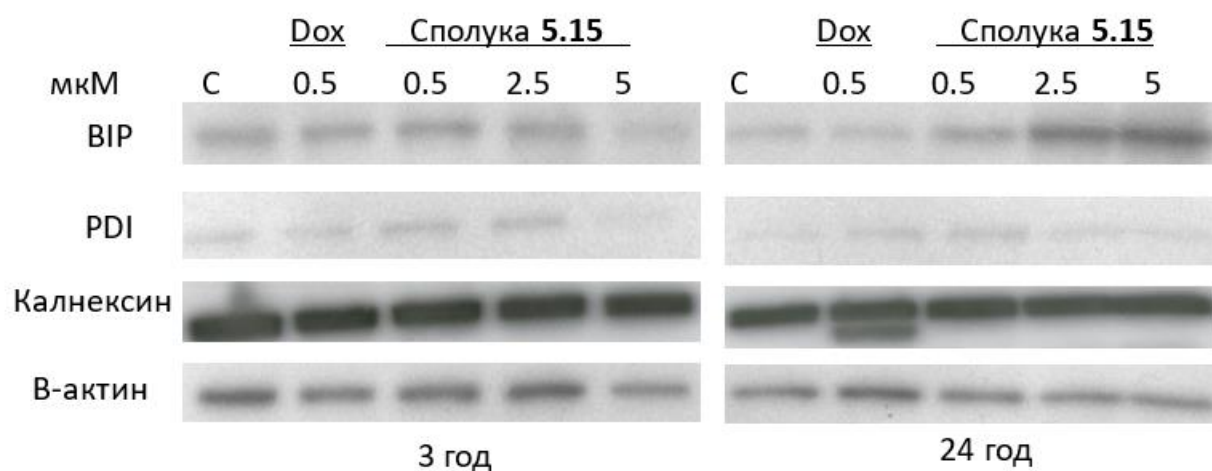


Рис. 5.21 Стимуляція білків ER при стрес-відповіді у клітинних лізатах лінії KB-3-1 після 3 та 24 годин після дії сполуки **5.15** у відповідних концентраціях, виміряних за допомогою Вестерн-блот аналізу (контроль - доксорубіцин).

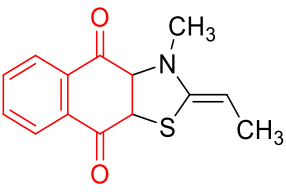
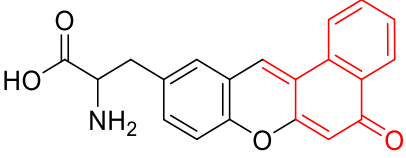
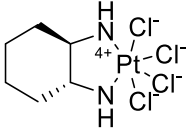
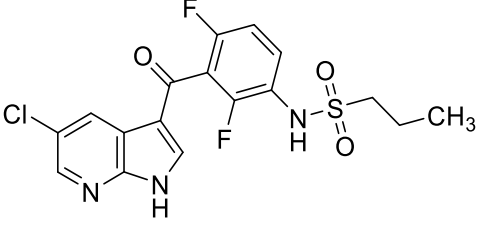
### 5.3.6. COMPARE, PRISM аналіз та докінгові дослідження сполуки-хіта **5.15**.

Враховуючи перспективні результати скринінгових досліджень протипухлинного ефекту, морфологічних досліджень клітин та вивчення клітинного циклу для сполук-хітів з класу тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі 1,4-нафтохінону нами було проведено додаткові поглиблені дослідження з метою встановлення механізмів реалізації даного виду активності, а саме COMPARE та PRISM аналіз та докінгові дослідження на прикладі сполуки **5.15**.

COMPARE аналіз та докінгові дослідження для сполуки **5.15** були виконані, з метою встановлення правдоподібних механізмів дії та кількісного вираження протипухлинної активності порівняно зі стандартними терапевтичними засобами. При аналізі порівняльних даних було встановлено, що зареєстровані на ринку протипухлинні лікарські засоби та стандартні антинеопластичні агенти не проявили достатніх коефіцієнтів кореляції Пірсона з досліджуваною сполукою **5.15**, який становив 0,54, що є статистично не достовірним [442]. З іншого боку, використання набору даних синтетичних сполук для розрахунку проявило високий рівень кореляції (PCC= 0,75) зі сполукою NSC695501 (Таблиця 5.11). На порталі Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) згадуються результати ряду біологічних досліджень, де встановлено, що сполука NSC695501 проявляє себе як інгібітор трансформуючого фактора росту пухлин бета (TGF- $\beta$ ) (BioAssay AIDs 588855, 720534 та 588856 ) з діапазоном IC<sub>50</sub> від 1,4125 мкМ до 2,2387 мкМ.

Таблиця 5.11

**Результати COMPARE аналізу сполуки 5.15 з використанням різних наборів даних при оцінці параметрів GI<sub>50</sub>**

Сполука	РСС	Набір даних	Механізм активності
 NSC695501	0,75	Синтетична сполука	TGFβ інгібітор
 NSC643735	0,64	Різносторонній набір	Невідомо
 NSC363812	0,54	Стандартний агент	Зв'язування з ДНК
 NSC761431 Вемурафеніб	0,42	Лікарський засіб	Інгібітор BRAF кінази

З метою додаткового встановлення механізмів реалізації протипухлинної активності сполуки **5.15** було проведено аналіз за допомогою сервісу PRISM Національного інституту раку США (NCI) [443]. Даний сервіс дозволяє порівняти унікальні фінгерпринти біологічної активності досліджуваної сполуки з іншими молекулами з бази даних NCI. PRISM відображає коефіцієнт кореляції з метою ідентифікації молекул, що можуть мати подібні механізми реалізації біологічної активності. Відповідно, нами був виконаний PRISM-аналіз сполуки **5.15**, яка була протестована в градієнті п'яти концентрацій, що дозволив

ідентифікувати 2,3-диметилбензо[*g*]хіноксалін-5,10-діон з найвищим показником коефіцієнту кореляції, який становив 0,72 (рис. 5.22).

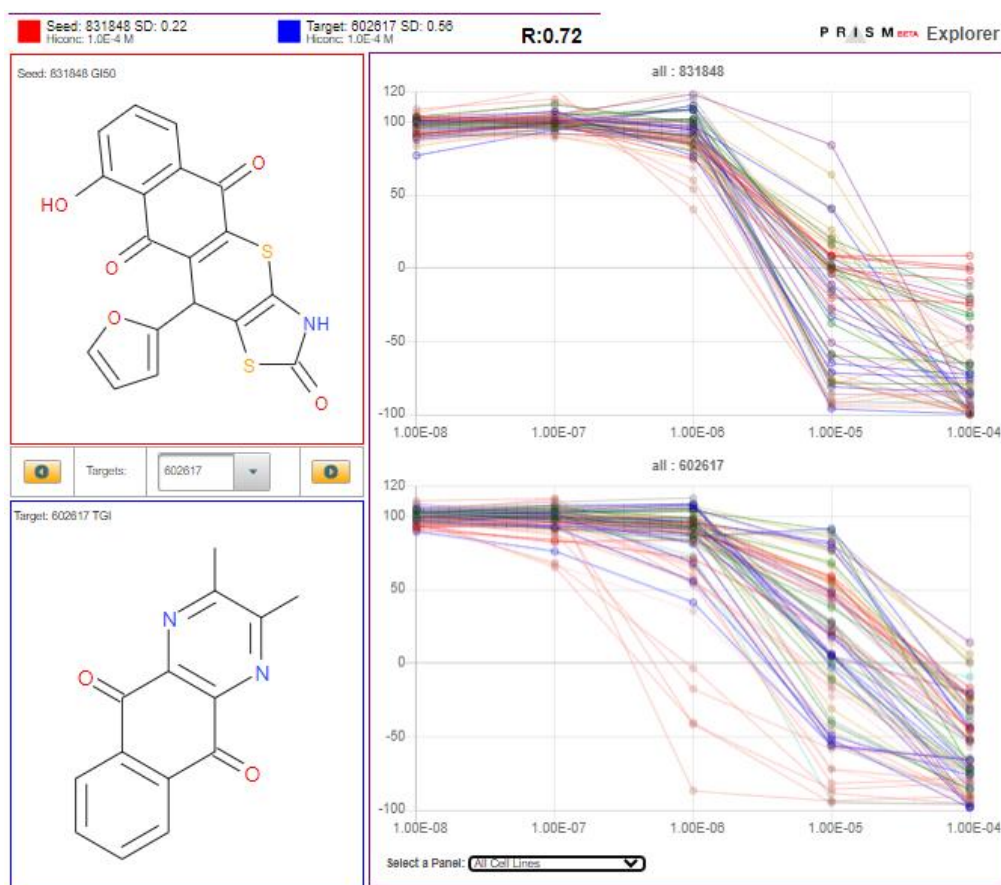


Рис. 5.22. Візуалізація NCI-60 PRISM аналізу проведеного для сполуки **5.15**.

Окрім того, нами було використано інструмент PILOT (Pharmacophore Identification Lead Organisation) сервісу PRISM. Інструмент PILOT здійснює стержне вирівнювання у фармакофору конструкцію попередньо ідентифікованих фазою порівняння сервісу PRISM сполук. Оскільки сполуки з потенційно подібним механізмом дії можуть зв'язуватися ідентичними біомішенями, відповідно, зазначений набір сполук можна у аналогічній спосіб вирівнювати у стержневому та фармакофоричному вимірах. Інструмент PILOT знаходить сполуки з найбільш жорсткою структурою в серії та використовує зазначену молекулу як шаблон для вирівнювання решти структур, вибраних у сервісі PRISM. Так, згідно з результатами функції PILOT 2,3-диметилбензо[*g*]хіноксалін-5,10-діон добре узгоджується з досліджуваною







<b>5.15</b>	-8,91	0,293	-7,33	4,24	-8,44	0,652	-8,20	0,976
<b>CID 5287512</b>	-9,69	0,078	-	-	-	-	-	-
<b>Етопозид</b>	-	-	-	-	-13,05	0,0003	-	-
<b>Доксорубіцин</b>	-8,33	0,784	-9,25	0,165	-12,03	0,0015	-5,06	195,31
<b>Камптотецин</b>	-	-	-10,42	0,023	-	-	-	-
<b>CID 154700495</b>	-	-	-	-	-	-	-11,94	0,0017

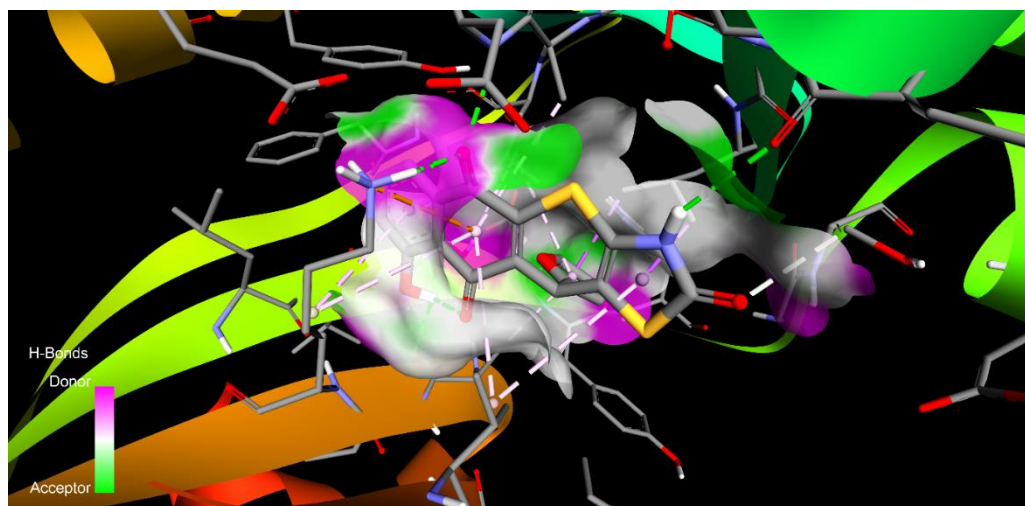


Рис. 5.23. Візуалізація зв'язування сполуки **5.15** з активним центром кристалічної структури TGF $\beta$  (PDB 1VJY).

Висока спорідненість сполуки **5.15** до TGF $\beta$  досягається завдяки чотирьом водневим зв'язкам з ASP351 (2,07 Å), LYS337 (2,67 Å), LYS332 (2,01 Å) та ALA230 (2,92 Å). Крім того, ALA350, VAL219, LEU260 і LEU360 утворюють різні типи гідрофобних взаємодій ( $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -алкіл,  $\pi$ -катіон) з ліпофільними амінокислотами всередині сайту зв'язування. Порівняно з нативним похідним 1,5-нафтиридину, ліганд **5.15** утворює більше водневих зв'язків усередині АТФ-зв'язувальної кишені (чотири зв'язки проти трьох зв'язків), однак не взаємодіє з HIS283. Тим не менш, сполука **5.15** взаємодіє з ASP351, і, як було повідомлено Sawyer et al. шляхом взаємодії з його бічним ланцюгом, що може відігравати ключову роль у здатності TGF $\beta$  взаємодіяти з рядом інгібіторів [447]. Додаткова стабілізація комплексу підтримується вуглецево-водневими зв'язками з ASP281 та SER287 (Рис. 5.24).

Загалом, TGF- $\beta$  є надзвичайно цікавою біомішенню для протиракових засобів, яка є цитокіном і для клітин епітеліальних тканин, в т.ч злякисних

служує потужним інгібітором росту та індуктором апоптозу. Дія TGF- $\beta$  на пухлинну клітину сильно залежить від рівня трансформації клітин-мішеней. Зокрема TGF $\beta$ 1 пригнічує проліферацію нормальних клітин або слабо трансформованих пухлинних клітин, однак не пригнічує сильно трансформовані злоякісні клітини, одночасно активуючи їх міграцію, що викликає розвиток метастазів [448].

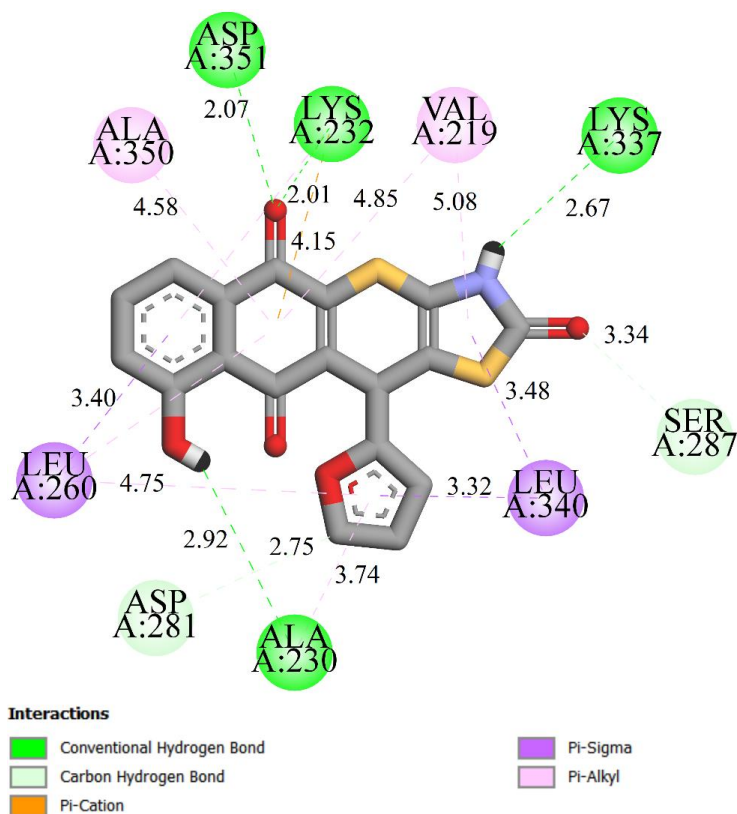


Рис. 5.24. 2D схема TGF $\beta$ -5.15 комплексу.

5.3.7. Дослідження індукції апоптозу шляхом зниження потенціалу мітохондріальної мембрани на фоні дії похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі юглоноу 5.4 та 5.15.

Для кількісного визначення апоптотичних ефектів сполук **5.4** та **5.15** було проведено проточний цитометричний аналіз із застосуванням подвійного фарбування аннексином V-FITC і пропідій йодидом (AV/PI) на клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 (рис. 5.25). Дане дослідження дозволило диференціювати чотири клітинні популяції, а саме, нефарбовані клітини (живі

клітини), пофарбовані пропідій йодидом (некротичні клітини), пофарбовані FITC-міченим аннексином V (ранні апоптотичні клітини), а також клітини пофарбовані двома барвниками (пізні апоптотичні клітини). У випадку дії сполуки **5.4** було виявлено 13,2% (5 мкМ) та 40,6% (10 мкМ) апоптотичних клітин (сума раннього та пізнього апоптозу), тоді як у випадку сполуки **5.15** 11,7% (5 мкМ) та 28,2% (10 мкМ), відповідно. Кількість апоптотичних клітин у контролі становила 8,9 %.

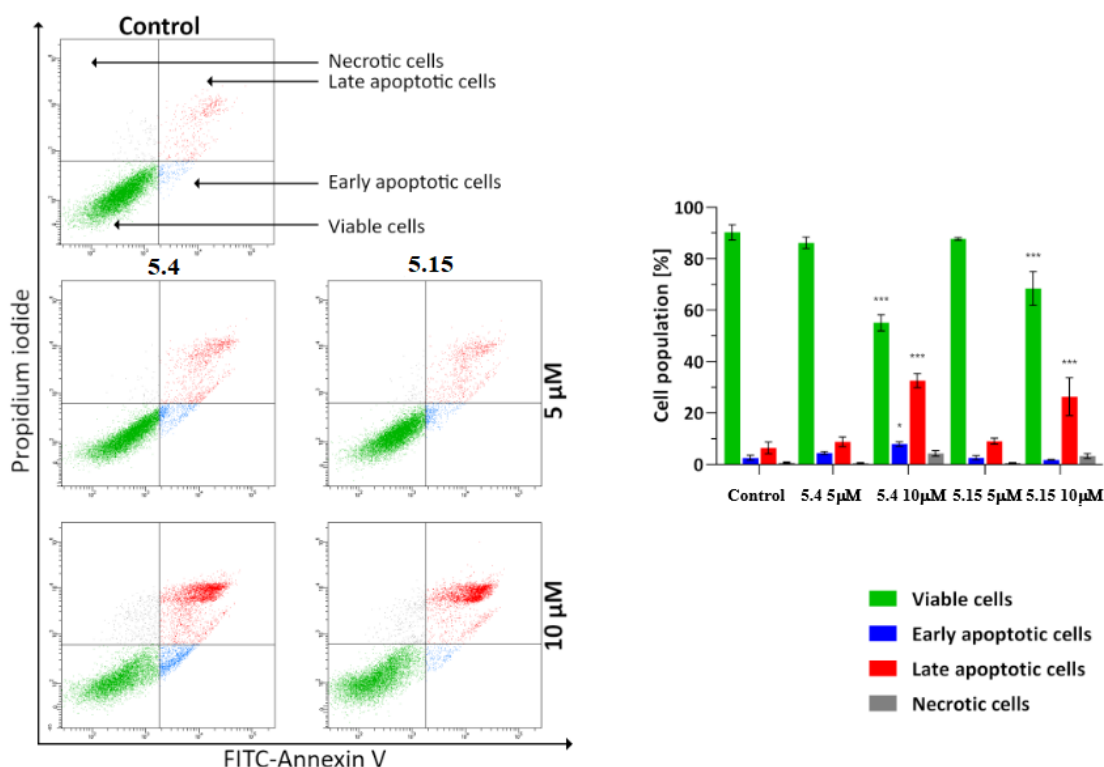


Рис. 5.25. Результати проточної цитометрії клітин раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24 годин інкубації сполуками **5.4** та **5.15** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ) з подальшим фарбуванням аннексином V і пропідій йодидом. Отримані результати представлені як середні значення  $\pm$  СВ, отримані з трьох незалежних експериментів ( $n = 3$ ), які вимірювали двічі. \*  $p < 0.05$  порівняно з контрольною групою, \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Варто відзначити, що процес апоптозу відбувається в клітинах двома напрямками: зовнішнім (опосередкованим активацією рецепторів смерті) та внутрішнім (опосередкованим мітохондріями). При зовнішньому напрямку після стимуляції рецепторів смерті відбувається залучення адапторних молекул з

утворенням сигнального комплексу, що викликає клітинну смерть (DISC) з подальшою активацією каспаз 8 та 10. Наведений процес разом із подальшою активацією виконавчих каспаз, зрештою призводить до апоптозу та загибелі клітин [449]. Враховуючи важливу роль каспази 8 в ініціації апоптозу через зовнішній шлях, нами було оцінено вплив досліджуваних сполук: **5.4** та **5.15** на активацію даного білка в клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24-годинної експозиції (концентрації 5 і 10 мкМ). Було встановлено, що досліджувані сполуки збільшували рівень даної активної форми каспази (рис. 5.26). Спостерігалось 26,5% (**5.4**) та 19,5% (**5.15**) у концентрації 5 мкМ клітин з активованою каспазою 8, відповідно. При вищій концентрації (10 мкМ) досліджуваних сполук спостерігалось 68,5% (**5.4**) і 62,7% (**5.15**) клітин, відповідно. Результати активності каспази 8 узгоджуються з результатами, отриманими в аналізі AV/PI, що вказує на те, що апоптоз, індукований досліджуваними сполуками може відбуватися через зовнішній шлях, опосередкований активацією рецепторів смерті.

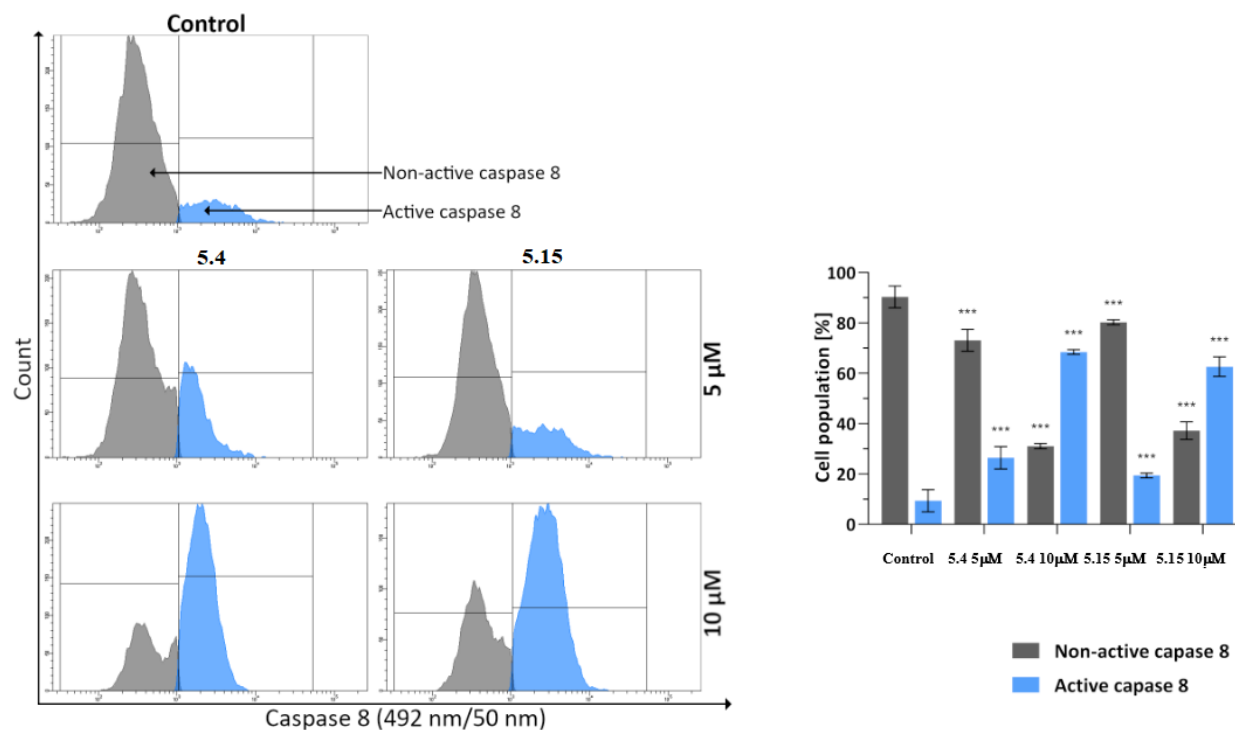


Рис. 5.26. Результати вимірювання проточною цитометрією активності каспази 8 у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24-годин інкубації при дії сполук **5.4** та **5.15** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати

представлені як середні значення  $\pm$  СВ, отримані з трьох незалежних експериментів ( $n = 3$ ), які вимірювали двічі. \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Окрім апоптозу, індукованого зовнішньою активацією рецепторів смерті, він також може бути ініційований внутрішнім шляхом, у якому мітохондрії відіграють основну роль. Ключовими пусковими факторами даного шляху є процеси пошкодження ДНК або окислювальний стрес [450]. З метою дослідження впливу досліджуваних сполук на потенціал мітохондріальної мембрани ( $\Delta\Psi_m$ ), клітини лінії MDA-MB-231 обробляли сполуками **5.4** та **5.15** у різних концентраціях (5 мкМ та 10 мкМ) протягом 24 годин, після чого проводили цитометричний аналіз за допомогою JC-1 барвника. JC-1 - це карбоціанін-ліпофільний катіонний флуорохром, який може приймати різні форми та флуоресценцію залежно від рівня потенціалу мітохондріальної мембрани. У життєздатних клітинах з нормально функціонуючими мітохондріями зазначений барвник накопичується в гіперполяризованій мітохондріальній мембрані з утворенням агрегатів, які випромінюють червону флуоресценцію. Навпаки, в апоптичних або некротичних клітинах ці агрегати розпадаються і утворюються мономери з зеленою флуоресценцією. Як показано на рисунку 5.27, досліджувані сполуки викликали збільшення відсотка клітин зі зниженим  $\Delta\Psi_m$  у клітинних лініях раку молочної залози MDA-MB-231. У необроблених клітинах (контрольна група) відсоток клітин з деполяризованими мітохондріями становив 5,7%. Менша концентрація (5 мкМ) сполук **5.4** та **5.15** призводила до зниження  $\Delta\Psi_m$  у досліджуваній лінії раку молочної залози, який становив 18,4% (**5.4**) і 15,7% (**5.15**) від популяції клітин. Водночас концентрація 10 мкМ досліджуваних сполук збільшила цей відсоток більш ніж у 3 рази (57,9%) у випадку сполуки **5.4** сполуки та більш ніж у 2 рази (37,3%) при дії сполуки **5.15** порівняно з контрольною групою.

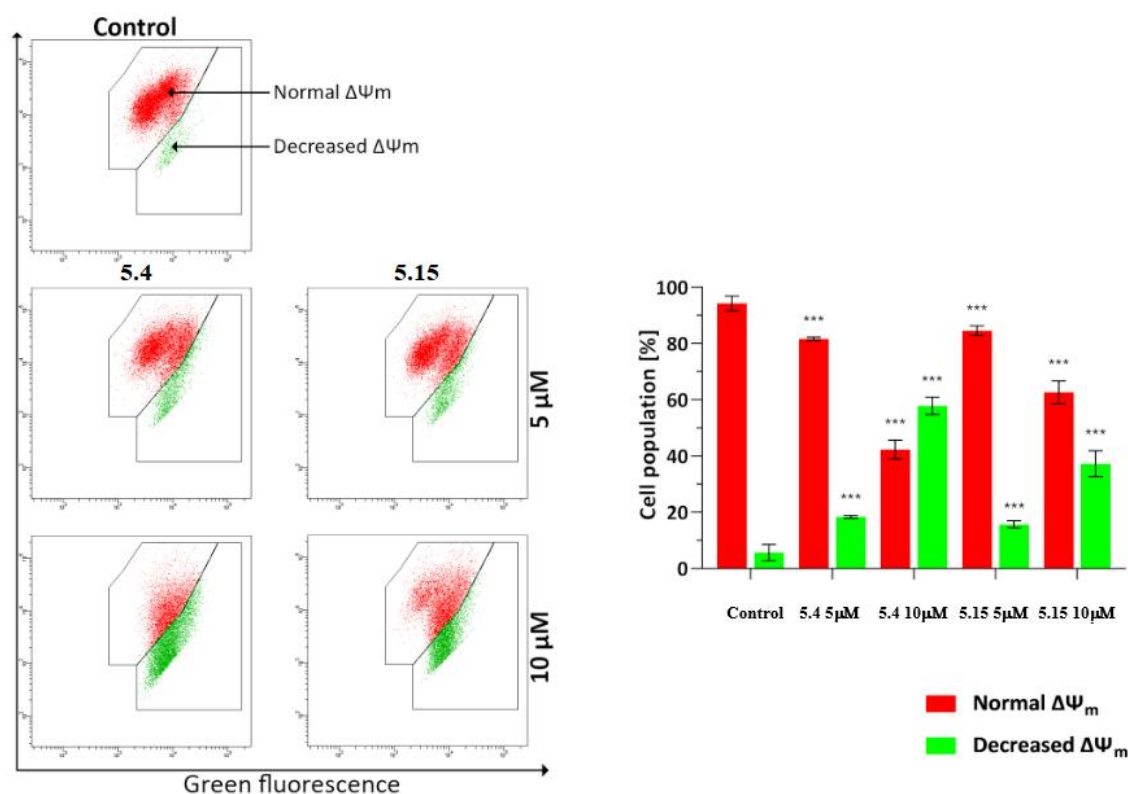


Рис. 5.27. Аналіз змін потенціалу мітохондріальної мембрани ( $\Delta\Psi_m$ ) за допомогою проточної цитометрії в клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24 годин інкубації при дії сполук **5.4** та **5.15** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення  $\pm$  СВ, отримані з трьох незалежних експериментів ( $n = 3$ ), які вимірювали двічі. \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Відомо, що ініціація внутрішнього шляху апоптозу призводить до активації каспази 9 [451]. Відповідно, нами було здійснено оцінку впливу сполук **5.4** та **5.15** на активацію зазначеного протеїну в клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231. Сполуки **5.4** та **5.15** при 24-годинній інкубації індукували певну кількість клітин з активною каспазою 9 порівняно з контролем. Так, спостерігалось 20,2% клітин з активною каспазою 9 у концентрації 5 мкМ і 33,8% при 10 мкМ на фоні дії сполуки **5.4**. У випадку сполуки **5.15** спостерігалось 15,0% (5 мкМ) і 32,6% (10 мкМ) клітин з активною каспазою 9, відповідно (рис. 5.28).

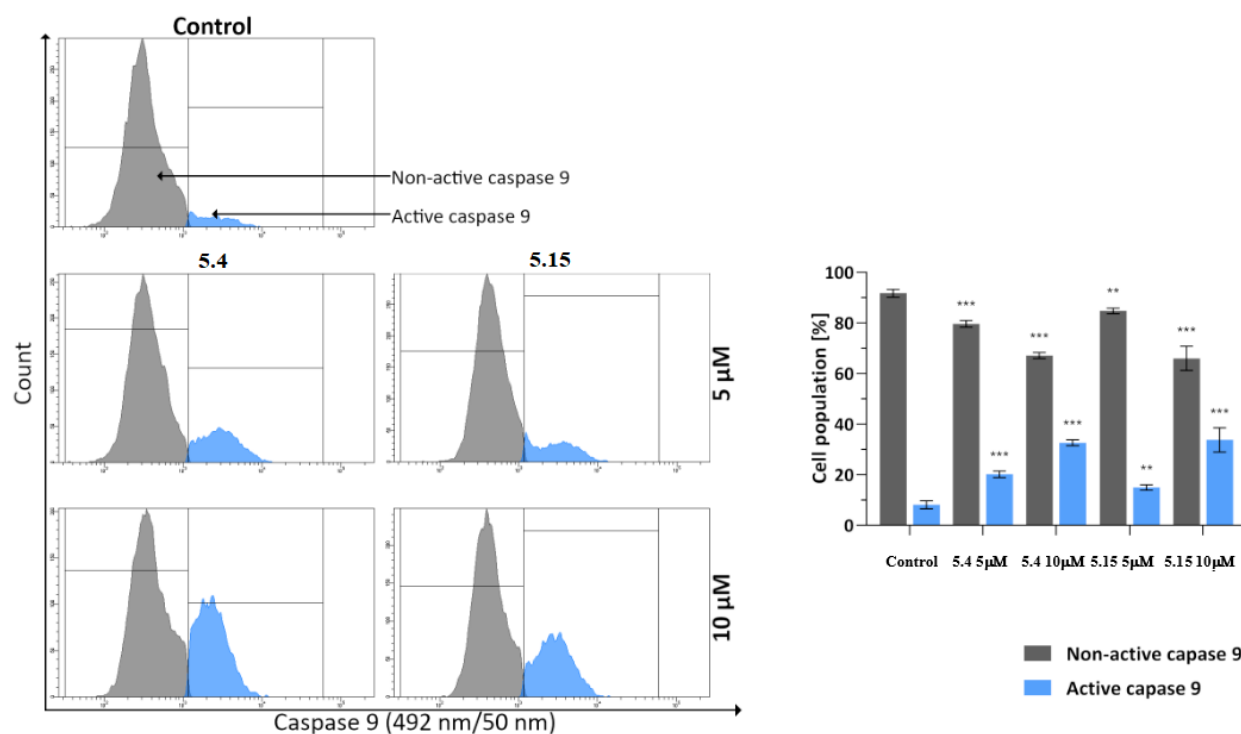


Рис. 5.28. Результати вимірювання проточною цитометрією активності каспази 9 у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24-годин інкубації при дії сполук **5.4** та **5.15** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення  $\pm$  СВ, отримані з трьох незалежних експериментів ( $n = 3$ ), які вимірювали двічі. \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Для підтвердження результатів, отриманих при аналізі активних форм каспаз 8 і 9, нами було здійснено оцінку активності каспази 3/7. Після активації ініціаторних каспаз (каспази 8 і 9) обидва шляхи апоптозу (внутрішній і зовнішній) зливаються в загальний, що зумовлює початок виконавчої фази апоптозу. Під час цієї стадії утворюються активні виконавчі каспази, головним чином каспаза 3, а також каспаза 7 [252]. Відповідно, нами було оцінено активність каспаз 3/7 у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 за допомогою проточної цитометрії після 24 годин інкубування досліджуваними сполуками **5.4** та **5.15**. Обидві сполуки зумовлювали зміни активності каспази 3/7 порівняно з контролем (Рис. 5.29). Після обробки сполукою **5.4** активація каспази 3/7 спостерігалася у 11,6% (5 мкМ) і 30,3% (10 мкМ) клітинних популяцій лінії



MDA-MB-231, відповідно. У випадку сполуки **5.15** спостерігалось збільшення кількості клітин з активними формами каспази 3/7 до 10,6% (5 мкМ) та 20,6% (10 мкМ), відповідно.

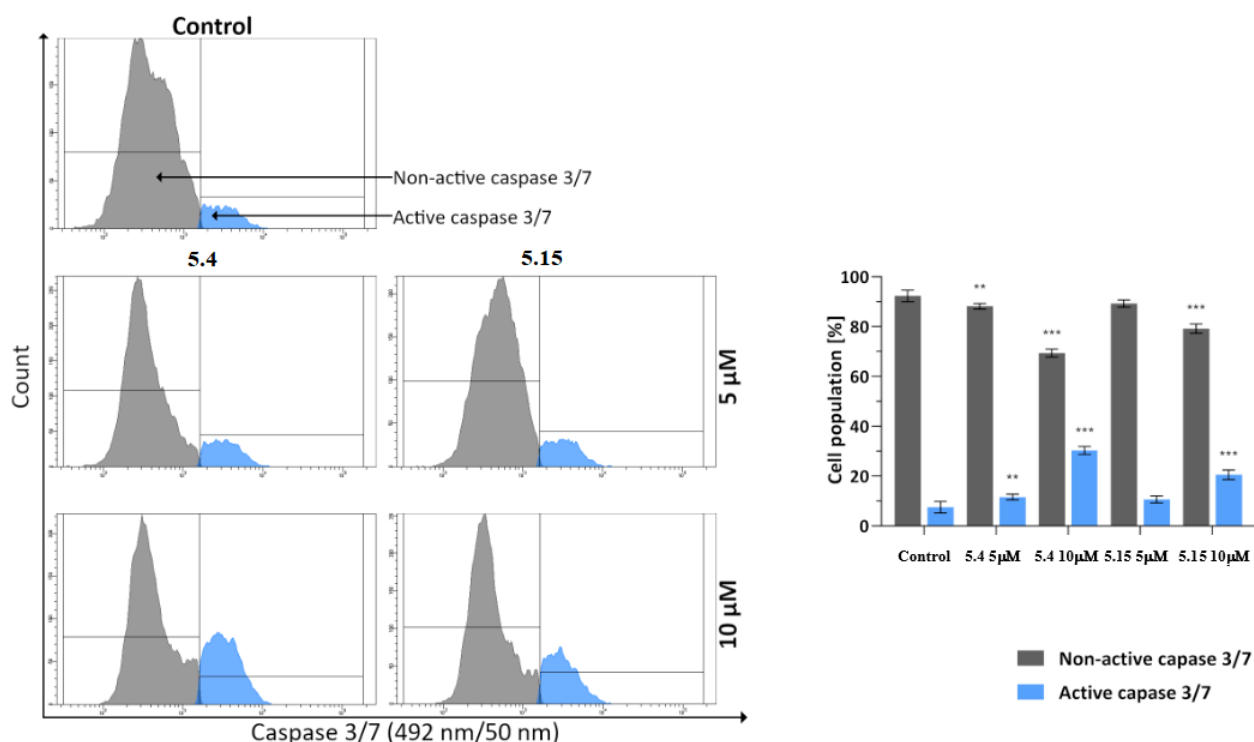


Рис. 5.29. Аналіз активності каспази 3/7 методом проточної цитометрії в клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 після 24 годин інкубації при дії сполук **5.4** та **5.15** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення  $\pm$  СВ, отримані з трьох незалежних експериментів ( $n = 3$ ), які вимірювали двічі. \*\*  $p < 0.01$  порівняно з контрольною групою, \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Наведені вище результати проточної цитометрії для досліджуваних сполук **5.4** та **5.15** добре узгоджуються з іншими даними, отриманими в результаті оцінки апоптичної активності зумовленої залученням у нього каспаз, що вказує на те, що зазначені похідні індують апоптоз у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 двома шляхами, зовнішнім і внутрішнім.



### 5.3.8. Оцінка впливу синтезованих сполук на ДНК.

У сучасній клінічній та експериментальній онкології є надзвичайно поширеним використання препаратів або агентів, які мають здатність до зв'язування та/або модифікації ДНК [452]. Головною перевагою зазначених сполук є їх висока селективність щодо пухлинних клітин з дефектами репарації ДНК [453]. У цьому фрагменті нашої роботи нами було використано метод фрагментації ДНК, метод конкурентного витіснення метилового зеленого (МЗ), реакції окислення ДНК калію перманганатом та УФ-видиму спектроскопію для дослідження властивостей зв'язування ДНК синтезованими сполуками.

На основі вищезазначених результатів скринінгу протипухлинної активності та результатів клітинної морфології проведеної за допомогою флуоресцентної мікроскопії, а також Вестерн-блот аналізу та дослідження клітинного циклу на клітинах лейкемії лінії CCRF-CEM було встановлено, що сполука **5.15** індукує апоптичну загибель пухлинних клітин, яка також була додатково підтверджена методом фрагментації ДНК. Процес фрагментації ДНК є відомим маркером процесів апоптозу, який активується каспазою-3 [454]. Результати фрагментації ДНК для сполуки **5.15** представлені на рисунку 5.23, на якому показано, що процес апоптозу ініційований досліджуваною сполукою викликає пошкодження ДНК у клітинах лінії Jurkat. У концентрації 25 мкМ (рис. 5.30, рядок б) сполука **5.15** індукувала найбільшу некротичну деградацію ДНК. Доксорубіцин у концентрації 1 мкМ використовувався як позитивний контроль, який у концентрації 0,5 мкМ індукував некротичні зміни в оброблених клітинах лінії Jurkat.

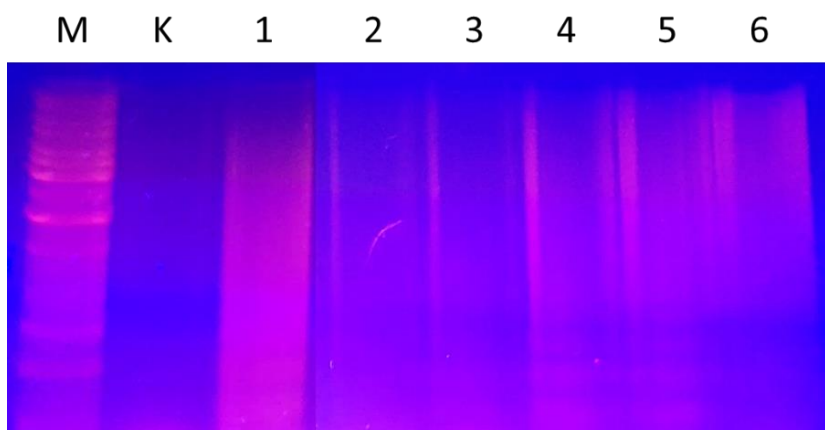


Рис. 5.30. ДНК фрагментація у клітинах лінії Jurkat після 24-годинного впливу сполуки **5.15**: М – ДНК-маркер, К – контроль, 1 – доксорубіцин, 1 мкМ, 2 – сполука **5.15**, 1 мкМ, 3 – **5.15**, 2,5 мкМ, 4 – **5.15**, 5 мкМ, 5 – **5.15**, 10 мкМ, 6 – **5.15**, 25 мкМ.

При дослідженні сполуки **5.20** за допомогою методу фрагментації ДНК нами не було виявлено апоптичної загибелі клітин клітинах лінії Jurkat (рис. 5.31). Можна помітити, що сполука **5.20** у концентрації 1 мкМ викликає незначну фрагментацію ДНК. У концентраціях 2,5 мкМ і 5 мкМ сполука **5.20** індукувала некротичну деградацію ДНК. Ми припускаємо, що у високих концентраціях сполуки **5.20** (10, 25 мкМ) виникає екстремальна фрагментація ДНК, яку не можна було побачити на гелі. З іншого боку на основі результатів клітинної морфології встановлено, що сполука **5.20** індукує як апоптотичну, так і некротичну загибель у клітин лінії KB3-1. Доксорубіцин у дозі 0,5 мкМ індукував більше некротичних змін в оброблених клітинах лінії Jurkat ніж апоптичних (рис. 5.31).

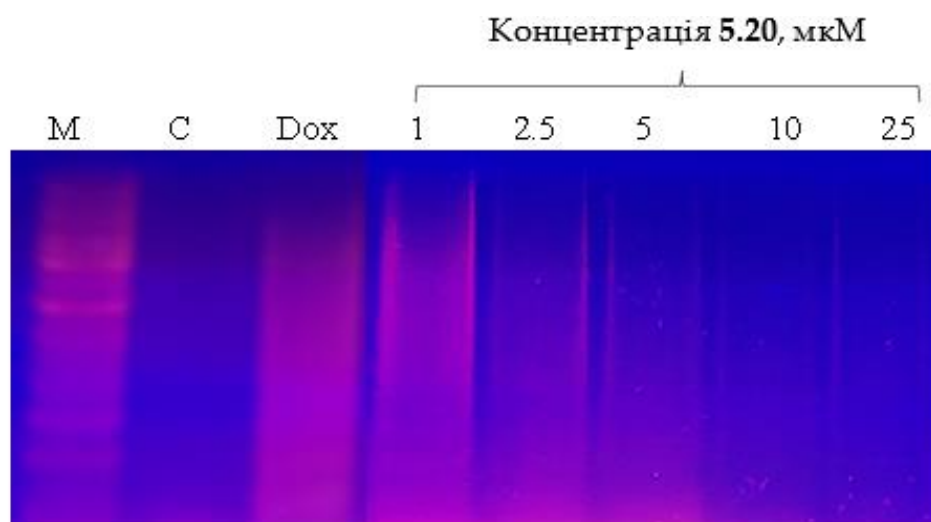


Рис. 5.31. ДНК фрагментація у клітинах лінії KB3-1 після 24 год експозиції сполукою **5.20** та доксорубіцином (Dox, 1 мкМ).

Метод конкурентного витіснення метилового зеленого (МЗ) з його комплексу з ДНК є важливим методом біохімічного скринінгу для виявлення біологічно активних сполук, які мають здатність до взаємодії з ДНК шляхом зв'язування з великою борозенкою подвійної спіралі. Ряд досліджуваних похідних показав певну здатність до взаємодії з ДНК. Так, сполуки **5.5**, **5.10**, **5.13**, **5.13** і **5.18** найбільшою мірою витіснили МЗ із його комплексу з ДНК на 55,4, 53,2, 66,4, 44,3 і 42,5%, відповідно, що наближаються до значень відсотків витіснення юглону та доксорубіцину (55,4 і 72,3 %). Сполуки **5.1-5.4** та **5.12** показали середню здатність до витіснення з ДНК МЗ в межах 29,5-37,35%. Інші похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, такі як **5.8**, **5.14** та **5.21**, витісняли МЗ найменшою мірою в межах від 11,8 до 20,7 % (рис.5.32).

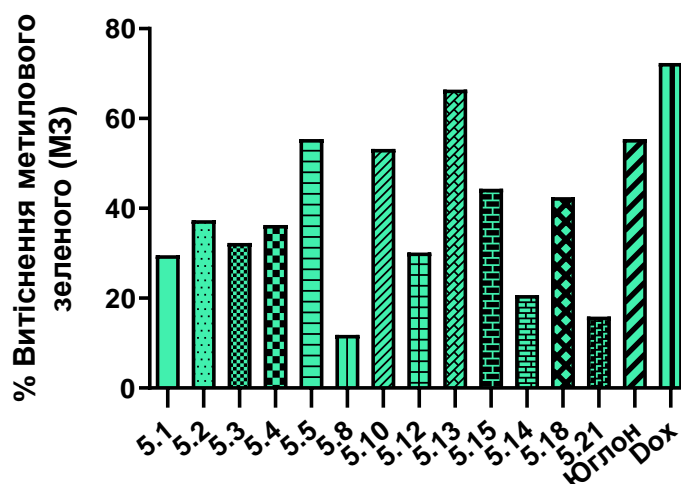


Рис. 5.32. Витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК сперми лосося похідними тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі юглону, вільним юглоном та доксорубіцином у концентрації 10 мкМ/мл.

Взаємодія похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу з ДНК свідчить про їхню здатність зупиняти процес її синтезу у досліджуваних клітинних лініях у порядку **5.13**>**5.5**>**5.10**>**5.15**>**5.18**>**5.2**>**5.4**>**5.3**>**5.12**>**5.1**>**5.14**>**5.21**>**5.8**. Цей порядок не корелює з результатами МТТ-тесту, однак дві активні сполуки з класу тіопірано[2,3-*d*]тіазолів з фрагментом юглону згідно даного тесту (**5.10** і **5.15**) значною мірою взаємодіють з ДНК. Ці результати можуть вказувати на те, що активні сполуки мають інші механізми реалізації протипухлинної дії не лише внаслідок інтеркаляції ДНК.

Окрім того для 11-фенетил-3,11-дигідро-2*H*-benzo[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону **5.20** також було проведено колориметричне дослідження конкурентного витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК з метою оцінки здатності до взаємодії з ДНК. Так, встановлено, що досліджувана сполука **5.20** інтеркалює між двома комплементарними парами основ у дволанцюговій ДНК, і залежно від концентрації, відсоток витіснення метилового зеленого коливався від 35,0 до 39,64% (рис. 5.33). 1,4-Нафтохінон (1,4-NQ) як сполука порівняння продемонструвала сильнішу здатність до витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК. Так, 1,4-NQ у концентрації 1 мкМ витісняв

метиловий зелений з комплексу на 65%. Доксорубіцин, який використовувався як позитивний контроль, у концентрації 1 мкМ проявив подібну дію до сполуки **5.20**, але в концентрації 10 мкМ витісняв метиловий зелений з комплексу у 2 рази ефективніше. На основі колориметричних даних при проведенні даного дослідження, і появи характерної червоної флуоресценції в області ядра (дані морфологічних досліджень), дані результати можуть вказувати на те, що одним із можливих механізмів реалізації біологічної активності сполуки **5.20** є інтеркаляція ДНК.

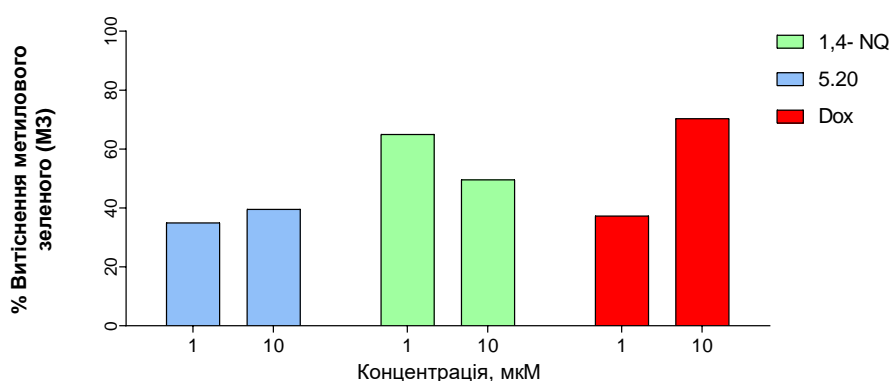


Рис. 5.33. Оцінка витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК сперми лосося сполукою **5.20**, 1,4-нафтохіноном та доксорубіцином (позитивний контроль).

Реакцію окиснення  $\text{KMnO}_4$  використовували для вивчення селективного окиснення піримідинових основ, зокрема тимідину, в областях пошкодження ДНК на прикладі високоактивної сполуки **5.15**. Так, сполуки, що взаємодіють з ДНК, викривляють її дуплексну структуру, тому, піддаючи піримідинові основи окисленню  $\text{KMnO}_4$ , утворені продукти можна виявити за допомогою UV/VIS спектрофотометрії. Цей аналіз дозволяє виявити різні класи агентів, що мають здатність до зв'язування ДНК [455].

Результати даних досліджень показали, що рівень окиснення ДНК сперматозоїдів лосося калію перманганатом індукований сполукою **5.15**, продемонстрував подібну дозозалежну тенденцію з її прекурсором 5-(фуран-2-ілметил)-4-тіоксо-2-тіазолідином **2.10** (рис. 5.34). Чиста зміна абсорбції

(NetAbs) в реакції з дволанцюговою ДНК (dsDNA) становила від -0,836 до 0,562 для сполуки **5.15** і від -0,259 до 0,637 – для похідного **2.10**. Юглон як сполука порівняння продемонстрував залежний від часу ефект, величина NetAbs становила від -0,030 до 0,490.

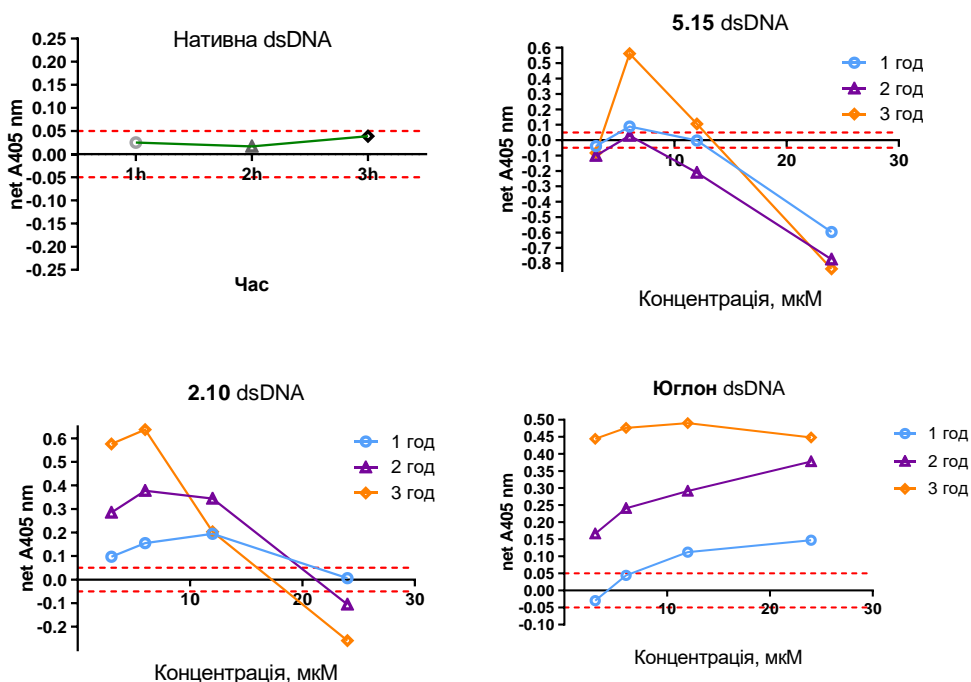


Рис. 5.34. Рівень окисації неспарених піримідинових основ  $\text{KMnO}_4$  у ділянці комплексу ДНК-сполука **5.15**. ДНК-зв'язувальні сполуки були віднесені до груп, де чиста зміна абсорбції між нульовим і різними моментами часу становила  $>0,05$  або  $<-0,05$ .

При дослідженні зразків ДНК інкубованих сполукою **5.20** спостерігалось значне збільшення рівня окисації, залежне від часу та концентрації, порівняно з контрольною ДНК (без інкубації досліджуваною сполукою). Зміна абсорбції A405 становила в межах від 0,00 до 0,50 у присутності сполуки, а зміна абсорбції у контролі A405 коливався від 0,02 до 0,045 у контрольному випадку (рис. 5.35). Отримані результати свідчать про те, що сполука **5.20** певним чином має здатність до взаємодії з ДНК.

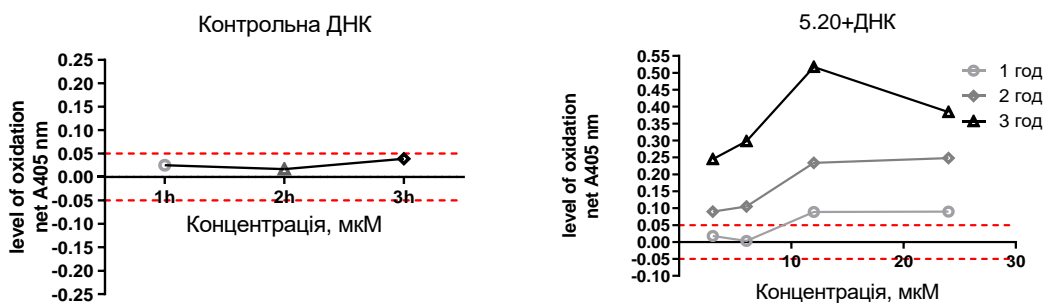


Рис. 5.35. Зміна величин абсорбції при збільшенні концентрації досліджуваної сполуки **5.20** в різні проміжки часу. Контрольний розчин складається із ДНК, води та розчину  $\text{KMnO}_4$ . Досліджуваний зразок включає в себе ДНК, сполуку **5.20** та розчин  $\text{KMnO}_4$ .

Будь-яка зміна в конформації та структурі ДНК, яка виникає при зв'язуванні з нею молекул малої молекулярної маси, призводить до зміни її спектральної поведінки. Вимірювання УФ-видимого спектру поглинання сполуки **5.15** та її комплексу з ДНК було використано для більш детального вивчення можливого типу взаємодії з ДНК. Спектр поглинання **5.15** показав смуги при 262, 362 та 420 нм (рис. 5.36). З додаванням все більшої кількості ДНК абсорбція сполуки **5.15** збільшилася при 262, тоді як при 362 і 420 нм незначно зменшилася. Гіперхромний ефект, що спостерігається при 262 нм, є результатом дестабілізації вторинної структури ДНК досліджуваною сполукою **5.15**. Такий ефект також може бути наслідком електростатичної взаємодії. Невеликий гіпохромізм, який тут спостерігається, пов'язаний з інтеркаляцією сполуки **5.15** у пари основ ДНК. Невеликий зсув довжини хвилі вліво (блакитний зсув, 2-3 нм) характерний для зовнішніх зв'язувачів (groove binders) [456].

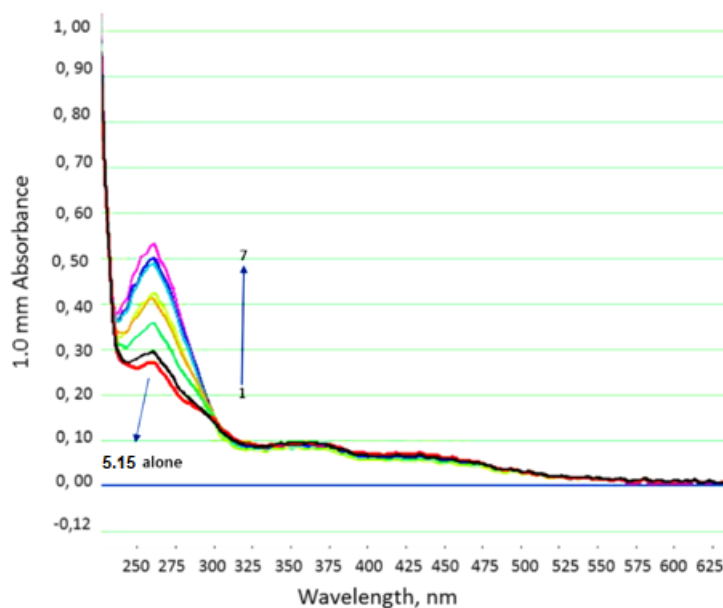


Рис. 5.36. УФ-видимий спектр поглинання у концентрації 250 мкМ/мл сполуки **5.15** у присутності різних концентрацій ДНК: 20 (1, чорна лінія), 40 (2, зелена лінія), 60 (3, оранжева лінія), 80 (4, світло-зелена лінія), 100 (5, світло-блакитна лінія), 120 (6, блакитна лінія) і 140 (7, рожева лінія) мкг/мл.

### 5.3.9. Оцінка реактивності сполук 5.15 та 5.20 з відновленим глутатіоном (GSH).

Відомо, що онкологічна патологія часто супроводжується явищем оксидативного стресу, що характеризується надмірною продукцією активних форм кисню (АФК), а саме пероксидів, супероксид та пероксинітрит аніонів, гідроксильних радикалів, синглетного молекулярного кисню та альфа-кисню [457]. В організмі існують численні системи, які здатні регулювати рівень даних АФК, зокрема ферменти антиоксидантної системи (АОС) (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза), макромолекулярні неферментні сполуки (трансферин, феритин, церулоплазмін, гаптоглобін, транскобаламін) та низькомолекулярні неферментні сполуки АОС (водо- та жиророзчинні вітаміни, коензим Q, стероїдні гормони, карнозин та глутатіон) [458]. Як наслідок, наявність у лікоподібних сполук, що володіють протипухлинною активністю додаткових антиоксидантних властивостей є ключовим маркером для їх потенційного відбору на подальші етапи поглиблених фармакологічних



досліджень. Варто відзначити, що досліджувані сполуки **5.15** та **5.20** на рівні із тiazольним ядром у структурі містять фрагмент 1,4-нафтохінону, відомого своїм значним антиоксидантним потенціалом, що відповідно, підтверджує актуальність даного дослідження для тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на основі 1,4-нафтохінону.

Глутатіон є однією з важливих сполук у функціонуванні АОС як джерела мобільного пулу сульфгідрильних (SH) груп. Даний трипептид також є ключовим у активності ряду ферментних систем глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази та особливо, глутатіонпероксидази, яка відновлює перекиси ліпідів та пероксид водню і захищає клітинні структури від окиснення [459].

Відповідно, оцінку реактивності похідних **5.15** та **5.20** проводили в тесті з м'яким нуклеофілом, а саме відновленим глутатіоном (GSH). У якості сполук порівняння при дослідженні сполуки **5.15** було використано її синтетичні попередники, а саме юглон та 5-(фуран-2-ілметилен)-4-тіоксо-2-тіазолідинон **2.10** (Рис. 5.37). При дослідженні похідного **5.20** у якості сполук порівняння було обрано 1,4-нафтохінон та 1,4-бензохінон (Рис. 5.38). Встановлено, що після інкубації досліджуваними сполуками **5.15** та **5.20** рівень відновленого глутатіону знижується і суттєво не підвищується при додаванні боргідриду натрію, що дозволяє припустити утворення GS-адуктів, які не відновлюються до GSH боргідридом натрію, на відміну від окисленого глутатіону (GSSG). Дані результати підтверджують антиоксидантні властивості даних сполук у тесті з відновленим глутатіоном, що підтверджують їх потенціал для подальшого поглибленого вивчення та встановлення детальних механізмів реалізації біологічної активності, включно з протипухлинною.

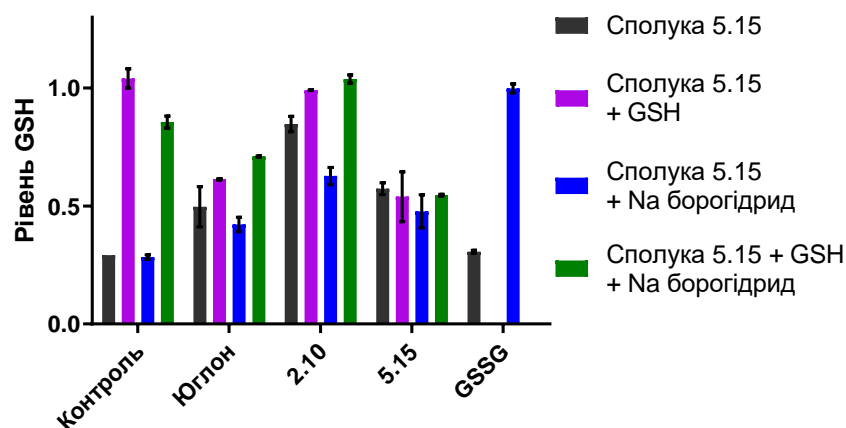


Рис. 5.37. Оцінка рівня відновленого глутатіону (GSH) при дії сполуки **5.15**.

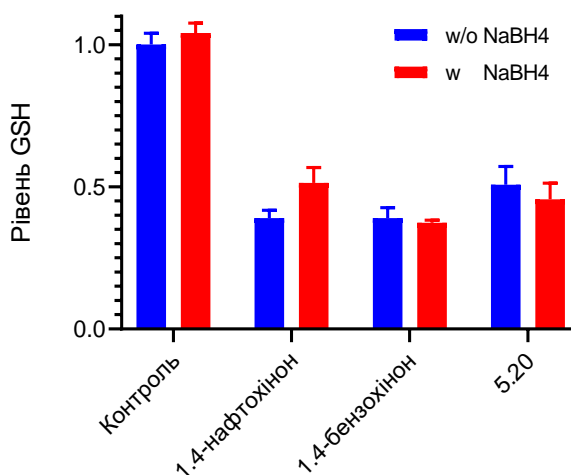


Рис. 5.38. Оцінка рівня відновленого глутатіону (GSH) при дії сполуки **5.20**.

### 5.3.10. Дослідження гострої токсичності сполуки **5.15** *in vivo*.

Для однієї із високоактивних сполук-хітів на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолу з фрагментом 1,4-нафтохінону, що володіла високою протираковою активністю а саме сполуки **5.15** було проведено дослідження *in vivo* гострої токсичності при використанні як препарату порівняння лікарського засобу доксорубіцину, який як відомо, із високою терапевтичною активністю проявляє ряд суттєвих побічних ефектів.

Лабораторні миші, яким вводили доксорубіцин (Dox), характеризувались швидкою та залежною від часу та дози втратою маси тіла. Незначне зниження маси тіла тварини спостерігалось вже після першого введення цього препарату в дозі 6,6 мг/кг. Миші втратили 10% від початкової ваги після 3-го введення Dox (6-й день експерименту), коли його кумулятивна доза становила 20 мг/кг (рис. 5.32). Це призвело до загибелі мишей, які отримували Dox на 8-й і 13-й день після першого введення цього антрациклінового антибіотика. Таким чином, лише 50% (2 з 4) тварин, яким вводили доксорубіцин, вижили до 22-го дня експерименту, коли всі тварини були піддані евтаназії (рис. 5.32). Важливо відзначити, що введення сполуки **5.15** мишам лінії C57BL/6 у дозі 20 мг/кг (подібно до дози Dox) не супроводжувалося втратою ваги. Також тварини цієї групи мали 100% виживання (рис. 5.39, 5.40). Відомо також, що введення доксорубіцину призводить до втрати маси тіла, що супроводжується зменшенням маси жирової тканини та скелетної мускулатури, втомлюваністю та анорексією [460-462]. Це свідчить про токсичність цього препарату, яка в нашому досліді також призвела до швидкої загибелі тварин. На відміну від Dox, досліджувана сполука **5.15** не характеризувалася подібними гострими токсичними ефектами.

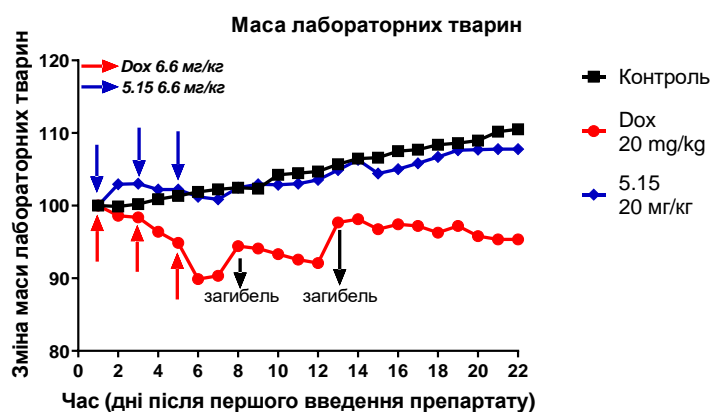


Рис. 5.39. Зміна маси тіла мишей лінії C57BL/6 трьох груп: контрольна група (неліковані тварини); тварини, яким вводили доксорубіцин (Dox) у дозі 20 мг/кг; тварини, яким вводили сполуку **5.15** у дозі 20 мг/кг.

Примітка: Контроль – n=4; Dox – n=4; **5.15** – n=6. ↓ - **5.15** (6,6 мг/мл) ін'єкційно; ↑ - Докс (6,6 мг/мл) ін'єкційно;

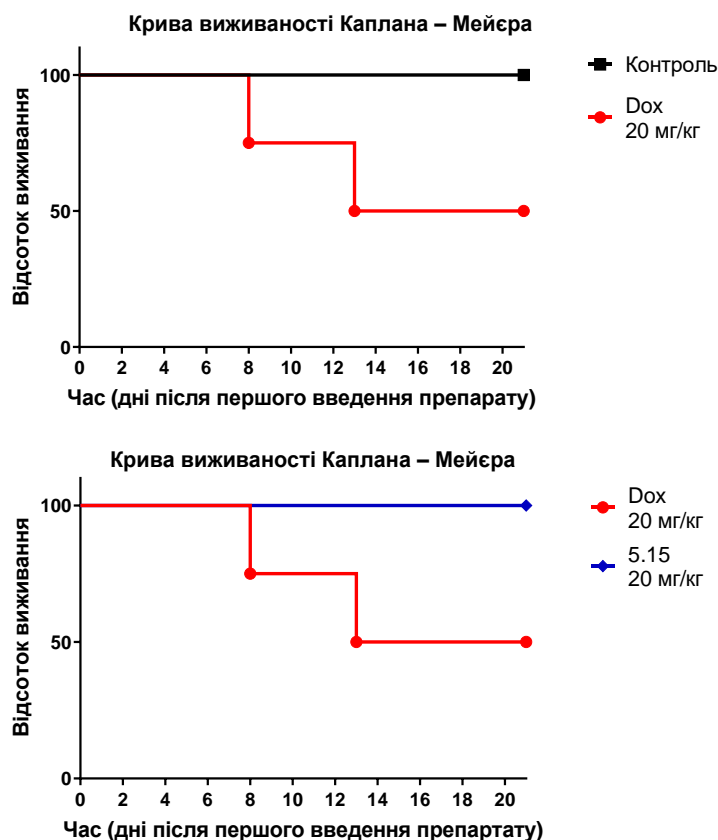


Рис. 5.40. Час виживаності мишей лінії C57BL/6 (криві виживаності Каплана-Мейєра) контрольних (нелікованих) або тварин, які отримували доксорубіцин (Dox) у дозі 20 мг/кг або сполуку **5.15** у дозі 20 мг/кг.

Примітка: Контроль – n=4; Dox – n=4; 5.15 – n=6.

У лабораторних мишей, яким вводили доксорубіцин виникала анемія, яка супроводжувалася зниженням кількості еритроцитів у 1,4 рази ( $p \leq 0,001$ ) і зниженням рівня гемоглобіну в 1,3 рази ( $p \leq 0,01$ ) порівняно із параметрами у тварин контрольної групи (рис. 5.34). Крім того, Dox у дозі 20 мг/кг призводив до лейкопенії, а кількість лейкоцитів у мишей цієї групи була в 1,88 рази нижчою ( $p \leq 0,05$ ) ніж у тварин контрольної групи на 22 добу експерименту (рис. 5.41). Причиною цього є пригнічення роботи кісткового мозку, спричинене доксорубіцином [463-465]. Так, багато хіміотерапевтичних лікарських засобів включно з доксорубіцином викликають суттєву мієлосупресію, яка є типовим побічним ефектом даної групи сполук [466-469]. Водночас рівень еритроцитів,

лейкоцитів і гемоглобіну в крові піддослідних мишей, яким вводили сполуку **5.15**, не відрізнявся від цих показників у тварин контрольної групи на 22 добу після введення сполуки (рис. 5.34).

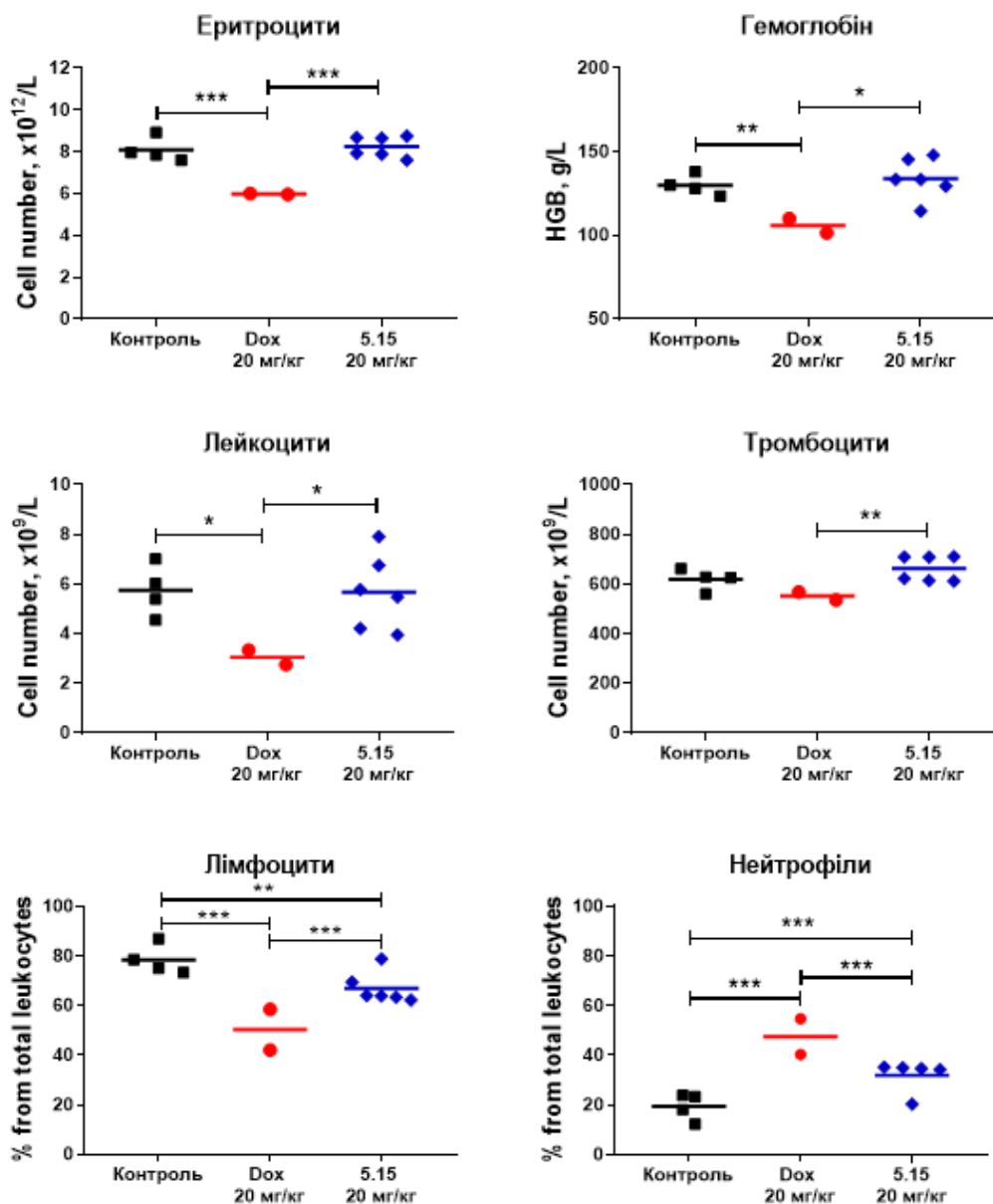


Рис. 5.41. Число еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, рівень гемоглобіну та співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів у крові контрольної групи мишей лінії C57BL/6 і тварин, які отримували доксорубіцин (Dox) у дозі 20 мг/кг або сполуку **5.15** у дозі 20 мг/кг на 22-й день після першої ін'єкції або на 17-й день після останньої ін'єкції досліджуваних сполук.

Примітка: Контроль – n=4; Dox – n=2 (оскільки на той час загинуло 2 миші); 5.15 – n=6. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  – статистично значущі порівняно один з одним.

Відносна кількість нейтрофілів була в 2,3 рази вищою ( $p \leq 0,001$ ), а відносна кількість лімфоцитів була в 1,56 рази нижчою ( $p \leq 0,001$ ) у мишей, яким вводили доксорубіцин, ніж у тварин контрольної групи на 22-й день після першої ін'єкції даного препарату. Так, відношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR) у контрольних мишей дорівнювало 0,257, тоді як у тварин, які отримували Dox, воно було вищим у 3,48 рази, а саме 0,894 (рис. 5.34, табл. 5.13). Ці дані також свідчать про токсичний вплив доксорубіцину на кровотворну систему (мієлосупресія) та його гостру імунотоксичність внаслідок сильного зменшення кількості лімфоцитів, що можна пояснити пригніченням їх проліферації або руйнуванням доксорубіцином [470-472].

Досліджувана сполука **5.15** також незначно зменшувала кількість лімфоцитів у 1,17 рази і збільшувала кількість нейтрофілів в 1,6 рази у крові досліджуваних мишей порівняно з цими показниками у контрольних тварин на 22 добу досліду. Важливо відзначити, що відносна кількість нейтрофілів зменшилася в 1,4 рази ( $p \leq 0,001$ ), а відносна кількість лімфоцитів збільшилася в 1,3 рази ( $p \leq 0,001$ ) у мишей, яким вводили сполуку **5.15**, порівняно з їх рівнем у крові тварин, яким вводили доксорубіцин (рис.5.34, табл. 5.13). Співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів у досліджуваних мишей, яким вводили сполуку **5.15**, було в 1,8 рази вищим порівняно з тваринами контрольної групи, але в 1,9 разів нижчим, ніж у мишей, які отримували доксорубіцин (таблиця 5.13). Таким чином, досліджувана сполука **5.15** також викликає зміну співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів, але меншою мірою, ніж доксорубіцин. Водночас досліджувана сполука **5.15** не викликає у досліджуваних тварин втрати ваги, їх швидкої загибелі, лейкопенії, еритропенії, зниження рівня гемоглобіну.

Таблиця 5.13

**Значення відносної кількості нейтрофілів, лімфоцитів (RLC) та співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR) у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Dox), у дозі 20 мг/кг і сполуку 5.15 у дозі 20 мг/кг на 22-й день досліду**

	Контроль (n=4 або 8)	Dox 20 мг/кг (n=2 або 4)	<b>5.15</b> 20 мг/кг (n=6 або 12)
Нейтрофіли, %	19,43±5,01	45,05±5,45 <sup>***</sup>	31,21±6,03 <sup>***, ...</sup>
Лімфоцити, %	78,56±5,69	50,35±9,63 <sup>***</sup>	67,05±6,21 <sup>**, ...</sup>
NLR	0,257	0,894	0,465

На наступному етапі нами було проаналізовано показники органної маси тіла у мишей, яким на 22 добу експерименту вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Dox, 20 мг/кг) і сполуку **5.15** (20 мг/кг). Отримані дані представлені в таблиці 5.14. Важливо відзначити, що нами не спостерігалось статистично значущих змін у індексах маси для легень, серця, селезінки, нирок між контрольними тваринами та тваринам, яким вводили сполуку **5.15**. Лише індекс маси тіла печінки у тварин, яким вводили сполуку **5.15** дещо знизився (в 1,14 рази,  $p \leq 0,05$ ) порівняно з аналогічним параметром у мишей контрольної групи (табл. 5.14). На відміну від досліджуваної сполуки (**5.15** у дозі 20 мг/кг), доксорубіцин суттєво впливав на масу легень і печінки у тварин, яким вводили даний препарат. Так, індекси маси легень і печінки до загальної маси у мишей, які отримували доксорубіцин, були нижчими у 2,96 та 1,93 рази ( $p \leq 0,05$  та  $p \leq 0,001$ ), ніж у тварин контрольної групи (табл. 5.14). Зокрема, індекс маси легень до тіла у контрольних мишей дорівнював  $0,80 \pm 0,09$ , у мишей, які отримували сполуку **5.15** –  $0,82 \pm 0,08$  ( $p \leq 0,05$  проти групи Dox) і у тварин групи Dox –  $0,27 \pm 0,06$  ( $p \leq 0,05$  проти групи зі сполукою **5.15**). Індекс маси печінки до тіла у мишей контрольної групи становив  $5,22 \pm 0,42$ , у мишей, яким вводили сполуку **5.15** –  $4,54 \pm 0,55$  ( $p \leq 0,05$  проти контролю,  $P \leq 0,001$  проти групи Dox), а у тварин, які отримували Dox –  $2,70 \pm 0,04$  ( $p \leq 0,001$  проти контролю) (Таблиця 5.14). Втрата маси легень і печінки під дією доксорубіцину (20 мг/кг) може свідчити про ураження цих органів [473]. Щоб більш детально дослідити

аномалії в тканинах легень і печінки, можна було б провести гістопатологічний аналіз цих тканин. Проте невибірковість дії доксорубіцину, що призводить до ураження життєво важливих органів, таких як серце, печінка, нирки та інших органів є вже добре відомим і дослідженим фактом [474-478]. Крім того, у роботах Favreau-Lessard та співавторів також нещодавно було виявлено, що миші, які отримували лікування доксорубіцином, мали значно меншу печінку, а їх гістопатологічний аналіз показав атрофію печінкової пластинки зі зменшеним об'ємом цитоплазми та як з внутрішньоклітинним, так і канальцевим холестазом, що вказує на метаболічне та токсичне пошкодження печінки, спричинене доксорубіцином [479]. Крім того, токсична дія доксорубіцину на кровотворну систему підтверджує зниження маси селезінки в  $\sim 2,4$  рази порівняно з цим параметром у мишей контрольної групи і групи, яка отримувала сполуку **5.15**. Варто відзначити, що досліджувана сполука **5.15** (20 мг/кг) не змінила індекс орган-тіло для легень, серця, селезінки та нирок порівняно з цими параметрами у мишей контрольної групи. Індекс маси печінки до маси тіла дещо знижувався під дією **5.15** (таблиця 5.14).

Таблиця 5.14

**Значення індексів маси органів мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Dox) у дозі 20 мг/кг і сполуку 5.15 у дозі 20 мг/кг на 22-й день експерименту. Індекс маси органу = (вага органу  $\times$  100)/загальна вага миші**

Групи органів	Контроль (n=4)	Dox 20 мг/кг (n=2)	<b>5.15</b> 20 мг/кг (n=6)
Легені	0,80 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,06*	0,82 $\pm$ 0,08*
Серце	0,62 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,03
Селезінка	0,53 $\pm$ 0,18	0,22 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,15
Нирки	1,39 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,12
Печінка	5,22 $\pm$ 0,42	2,70 $\pm$ 0,04***	4,54 $\pm$ 0,55*,***

Примітка: \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  – статистично значущі порівняно з контрольною групою; \*\*\*  $p \leq 0,001$  – статистично значущий порівняно з групою Dox (20 мг/кг).



#### 5.4. Експериментальна частина.

##### *Синтез 5-гідроксинафтален-1,4-діону (юглон)*

У двогорлу колбу на 50 мл поміщають 0,004 моль оцтового ангідриду та додають при постійному перемішуванні порціями 0,0066 моль 30% пероксиду водню. Реакційну суміш перемішують при 40 °С протягом 4 годин. Після цього реакційну суміш залишають при кімнатній температурі на 24 години і виливають у 1 л холодної води. Одержаний продукт відфільтровують, промивають водою, висушують та перекристалізують із толуолу.

##### *Синтез 5-метоксинафтален-1,4-діон (О-метилюглон)*

Суміш 0,0012 моль метилйодиду, 0,0057 моль 5-гідроксинафтален-1,4-діону, 0,0046 моль оксиду срібла(I) у 180 мл дихлорометану перемішують протягом 20 годин при кімнатній температурі у плоскодонній колбі із зворотнім холодильником. Після цього до реакційної суміші знову додають 0,0046 моль метилйодиду, 0,0046 моль оксиду срібла(I) та перемішують протягом 3 годин при кімнатній температурі (контроль перебігу реакції контролюють за допомогою ТШХ). Потім реакційну суміш фільтрують через цеоліт, промивають дихлорметаном та відганяють розчинник до сухого залишку. Сухий залишок очищають колонковою хроматографією з утворенням цільового продукту.

##### *Загальна методика синтезу 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів (5.1-5.19)*

Суміш 0,005 моль відповідного 5-іліден-4-тіоксо-2-тіазолідинону, 0,01 моль відповідного похідного 1,4-нафтохінону, декілька кристалів гідрохінону та 10 мл оцтової кислоти нагрівають протягом 2 год у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з оцтової кислоти, або суміші з суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Загальна методика синтезу 11-фенетил-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріонів (5.20-5.21)*

Суміш 0,005 моль 2-тіоксо-4-тіазолідинону, 0,0055 моль 3-фенілпропіональдегіду та 0,01 моль відповідного похідного 1,4-нафтохінону у середовищі ацетонітрилу нагрівають протягом 2 годин у колбі із зворотнім холодильником у присутності 0,0005 моль ЕДДА як каталізатора. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші з суміші ДМФА-етанол (1:2).

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що похідні нафтохінону, а саме гідроксинафтален-1,4-діон, 5-гідроксинафтален-1,4-діон (юглон) та 5-метоксинафтален-1,4-діон (О-метилюглон) вступають в реакцію *гетеро*-Дільса-Альдера з 5-іліден-4-тіоксо-2-тіазолідонами як гетеродієнами, з утворенням неописаних в хімічній літературі 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів, причому у випадку О-метилюглону зазначена [4+2]-циклоконденсація не є регіоселективною і супроводжується утворенням суміші двох регіоізомерів, а саме 6-метокси- та 9-метоксипохідних, що можна пояснити відсутністю чіткої переваги утворення *endo*- чи *exo*-аддуктів у перехідному стані реакції.

2. Показано, що трикомпонентна реакція 4-тіоксо-2-тіазолідинону, 3-фенілпропіональдегіду та відповідних похідних 1,4-нафтохінону як дієнофілів при кип'ятінні в середовищі ацетонітрилу у присутності етилендіамоній діацетату (ЕДДА) як каталізатора призводить до одержання 11-фенетил-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріонів.

3. Структура синтезованих сполук та інтерпретація проведених хімічних досліджень підтверджена елементним аналізом, методами спектроскопії  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, 2D ЯМР, хромато-мас-спектрометрії, а також рентгеноструктурним аналізом.

4. Серед похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону ідентифіковано ряд сполук з протипухлинною активністю. Скринінгові дослідження в рамках програми DTP NCI дозволили ідентифікувати похідні **5.1**, **5.2**, **5.10**, **5.13** та **5.15** з високою антимітотичною активністю щодо абсолютної більшості досліджуваних ліній ракових клітин із середнім значенням мітотичної активності ( $GR_{mean}$ ) -65,45% (**5.1**), -54,97% (**5.2**), 6,83 (**5.10**), -61,06% (**5.13**) та -2,68% (**5.15**), відповідно.

5. Поглиблене дослідження цитотоксичності *in vitro* похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону щодо пухлинних і псевдонормальних клітин *in vitro* методом МТТ дозволило ідентифікувати високоактивні сполуки щодо раку товстої кишки лінії НСТ-116 (**5.1**, **5.10**, **5.15**), раку молочної залози MCF-7 (**5.10**) та раку шийки матки лінії KB3-1 (**5.4**, **5.15**) із значеннями  $IC_{50}$  в межах 0,6-0,95 мкМ та встановити низьку токсичність досліджуваних сполук щодо епідермальних кератиноцитів людини лінії HaCaT.

6. Проведення флуоресцентної мікроскопії після фарбування барвником Hoechst-33342 при обробці сполуками-хітами **5.15** та **5.20** встановило значні цитоморфологічні зміни в клітинах раку шийки матки лінії KB3-1 подібно до референс-препарату доксорубіцину. Окрім того досліджувані сполуки здатні до червоної флуоресценції в оброблених клітинах, що є важливим у детекції та оцінці локалізації зазначених сполук у пухлинних клітинах.

7. Докінговими дослідженнями високоактивної сполуки **5.15** окреслено ймовірні молекулярно-біологічні шляхи реалізації протипухлинної дії, серед яких інгібування  $\beta$ -трансформуючого фактора росту пухлин (TGF- $\beta$ ), що можна розглядати як теоретичну платформу для синтезу *de novo* потенційних біологічно активних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів з фрагментами 1,4-нафтохінону у структурі.

8. Дослідження методом проточної цитометрії дозволило встановити активацію каспаз 3/7, 8 та 9, зміну мітохондріального потенціалу у клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 на фоні дії сполук **5.4** та **5.15**, що підтверджує їх апоптичну здатність зумовлену активуванням зовнішнім та внутрішнім шляхів апоптозу.

9. Серед похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону ідентифіковано ряд сполук, які мають здатність до конкурентного витіснення метилового зеленого з його комплексу з ДНК, зокрема сполуки **5.5**, **5.10**, **5.13**, **5.14** та **5.18** проявили рівень витіснення барвника в межах 42,5-66,4 %. Окрім того, при дослідженні реакції окиснення  $\text{KMnO}_4$  піримідинових основ в областях пошкодження ДНК сполуки-хіти з протираковою активністю **5.15** та **5.20** проявили величини чистої зміни абсорбції (NetAbs) в реакції з дволанцюговою ДНК (dsDNA) в межах -0,836 до 0,562, що свідчить про їхню здатність до взаємодії з ДНК.

10. Встановлено, здатність двох сполук-хітів (**5.15**, **5.20**) знижувати рівень відновленого глутатіону шляхом утворення ковалентних GS-адуктів, що підтверджує антиоксидантні властивості досліджуваних сполук, як один із можливих механізмів реалізації протиракової активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону на рівні із інтеркаляцією ДНК.

11. Дослідження гострої токсичності сполуки **5.15** *in vivo* показало відсутність токсичних ефектів на досліджуваних мишах лінії C57BL/6, а саме їхню швидку загибель, втрату маси тіла, що супроводжується зменшенням маси жирової тканини та скелетної мускулатури, втомлюваністю та анорексією, лейкопенією, еритропенією, зниженням рівня гемоглобіну у порівнянні з доксорубіцином. Водночас, досліджувана сполука **5.15** викликає зміну нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення у крові досліджуваних тварин, але значно меншою мірою ніж доксорубіцин.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [422-425, 443]*

## РОЗДІЛ 6

ВИВЧЕННЯ ПОЛІФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ  
ФУНКЦІОНАЛЬНО-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО[2,3-*d*]ТІАЗОЛУ

Похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолу у більшості випадків розглядаються у контексті теорії «акцепторів Міхаеля», як сполуки, які не мають даної особливості, що на думку ряду фахівців є хорошим аргументом у пошуку потенційних лікоподібних молекул серед даного класу речовин. Варто нагадати, що сполуки з властивостями акцепторів Міхаеля, зокрема прекурсори тіопірано[2,3-*d*]тіазолів – 5-іліден-4-тіазолідинони, мають прояви неселективної дії, як наслідок зв'язування з багатьма біомішенями, що є небажаним явищем у сучасному контексті створення ліків [26, 27, 480]. Відповідно, часто існує думка, що саме 5-іліден-4-тіазолідинони – це сполуки, які проявляють поліфармакологічні властивості, а не їх конденсовані аналоги. Апелюючи до даного твердження, варто згадати підходи до синтезу тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, зокрема реакції *гетеро*-Дільса-Альдера, Міхаелівського приєднання тощо. Кожне із зазначених перетворень, зокрема реакції гетеродієнового синтезу, включають в себе поєднання у одну конденсовану гетероциклічну систему структур двох молекулярних фрагментів, що часто володіють фармакологічною активністю, а саме різних гетеродієнів та дієнофілів. Відповідне поєднання часто призводить до появи у похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів активності, яка притаманна їх синтетичним прекурсорам, яка іноді суттєво їх перевищує або зумовлює набуття поліфармакологічних властивостей. Враховуючи можливості варіювання замісників у різних положеннях тіопірано[2,3-*d*]тіазольного ядра є можливість ідентифікувати сполуки із різновекторною фармакологічною активністю. Відповідно, у даному фрагменті нашої роботи була проведена оцінка деяких видів активностей серед попередньо синтезованих похідних тіопіранотіазолу з метою ідентифікації високоактивних сполук-хітів для подальшого їх поглибленого дослідження.

## 6.1 Дослідження протимікробної та протигрибкової активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу.

Одним із найбільших викликів, з яким сьогодні стикаються багато наукових груп, є глобальне подолання антимікробної резистентності мікроорганізмів. Відповідно, створення протимікробних препаратів нового покоління має важливе значення для вирішення проблеми розвитку інфекційних захворювань. Очікується, що протягом наступних десяти років антимікробна резистентність буде для багатьох країн та їх системи охорони здоров'я значним фінансовим тягарем, а обмежена кількість ефективних ліків не дозволить суттєво покращити ситуацію. Так, очікується, що до 2050 року антибіотикорезистентні збудники інфекцій вбиватимуть більше людей у всьому світі, ніж діабет і рак разом узяті, що вимагатиме термінових негайних дій, зокрема, пошуку нових високоефективних протимікробних засобів для широкого клінічного використання. Варто зазначити, що згідно із рекомендаціями ВООЗ, однією з найефективніших короткострокових стратегій боротьби з антибіотикорезистентними збудниками інфекцій є відкриття нових синтетичних сполук з протимікробною дією. Відповідно у контексті пошуку потенційних протимікробних агентів нами було вивчено деякі класи похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, що володіють широким спектром протимікробної та протигрибкової активності стосовно музейних та клінічних штамів, включно із антибіотикорезистентними мікроорганізмами. Варто зазначити, що вибір сполук на користь похідних тіопіранотіазолу, обумовлений тим, що тіазольне ядро у структурі даних молекул по аналогії із багатьма антибіотиками, зокрема пеніцилінами та монобактамами, є тим фрагментом, який може сприяти прояву протимікробної активності, особливо у комбінації із іншими фармакофорними групами, які містяться у структурі досліджуваних сполук.

Так, протимікробну та протигрибкову активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу визначали методом дифузії в агар. На першому етапі було проведено дослідження протимікробної дії 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-

тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот (сполуки **6.1-6.15**), які було нами синтезовано за описаними раніше методиками [362] (Рис. 6.1). Скринінг протимікробної активності досліджуваних сполук проводили щодо грампозитивних та грамнегативних штамів мікроорганізмів, а саме *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*, а також грибків *Candida albicans* [481-483]. Отримані дані показали, що деякі з досліджених сполук показали хорошу інгібуючу активність щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів у дозі 20 мкг на лунку (Табл. 6.1.).

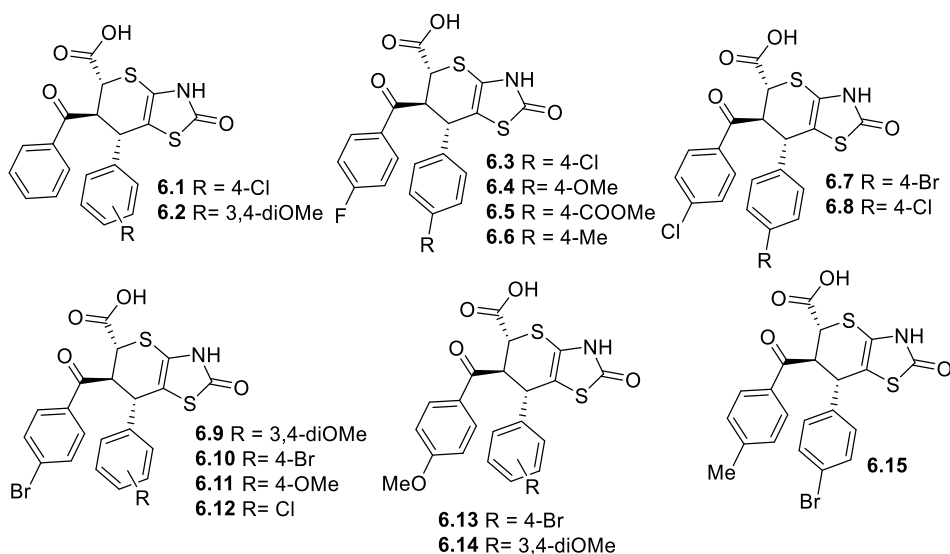


Рис. 6.1. Структури *rel*-(5*R*,6*S*,7*S*)-6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот, використані для скринінгу протимікробної активності.

Результати дослідження показали, що сполука **6.11** проявила високу протимікробну активність щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів, а саме *S. aureus* та *B. subtilis* співмірну з препаратом порівняння стрептоміцином. Сполуки **6.7**, **6.8** та **6.10-6.12** проявили хорошу антибактеріальну активність щодо метацилін-чутливого (MSSA) та метицилін-резистентного (MRSA) штамів *S. aureus*. Сполуки **6.9** і **6.13** виявляли помірну активність щодо метицилін-резистентного (MRSA) штаму *S. aureus*. Усі досліджувані сполуки виявили незначну інгібуючу активність щодо *E. coli*. Варто відзначити, що 6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонові кислоти

виявили також помітну протигрибкову активність щодо *Candida albicans*. Так, сполуки **6.1**, **6.4**, **6.7**, **6.8** та **6.9** проявили кращу протигрибкову активність ніж референс-препарат амфотерицин-В.

Таблиця 6.1

**Протимікробна та протигрибкова дія 6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-5-карбонових кислот 6.1-6.15**

Сполука	Діаметри зон пригнічення росту, мм					
	<i>S. aureus</i> MSSA	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	
					Фунгістатична	Фунгіцидна
<b>6.1</b>	4,74±0,27	5,93±0,14	4,23±0,36	5,13±0,21	8,94±0,53	7,02±0,36
<b>6.2</b>	4,45±0,30	6,35±0,15	4,90±0,27	-	5,08±0,14	4,73±0,21
<b>6.3</b>	5,29±0,35	6,19±0,31	5,26±0,28	5,83±0,53	5,27±0,14	4,29±0,09
<b>6.4</b>	5,52±0,48	6,81±0,19	5,14±0,28	4,73±0,3	10,38±0,58	7,46±0,22
<b>6.5</b>	5,11±0,37	6,42±0,48	4,99±0,48	5,37±0,16	7,58±0,89	6,79±0,63
<b>6.6</b>	4,42±0,41	-	4,22±0,41	-	9,04±0,69	5,76±0,33
<b>6.7</b>	7,48±0,34	13,25±0,99	5,96±1,01	6,83±0,98	11,92±0,24	10,45±0,37
<b>6.8</b>	10,16±0,13	9,67±0,35	5,16±0,36	-	9,76±0,52	8,25±0,67
<b>6.9</b>	5,70±0,21	10,20±0,82	4,93±0,08	-	13,21±0,46	10,89±0,22
<b>6.10</b>	10,24±1,15	11,42±1,31	4,59±0,47	5,24±0,73	6,73±0,57	5,25±0,38
<b>6.11</b>	7,78±0,47	18,15±1,11	5,69±0,36	10,55±0,15	7,71±0,38	5,46±0,61
<b>6.12</b>	11,56±0,73	9,50±0,58	5,31±0,34	5,34±0,27	7,46±0,54	5,63±0,65
<b>6.13</b>	4,12±0,30	5,60±0,29	4,32±0,59	5,47±0,36	7,88±0,59	5,99±0,20
<b>6.14</b>	4,03±0,26	-	4,92±0,21	-	5,93±0,57	4,61±0,28
<b>6.15</b>	6,78±0,36	10,02±0,42	4,90±0,14	-	6,91±0,52	5,49±0,42
Стрептоміцин	13,00±0,42	-	10,00±0,36	10,00±0,38	-	-
Амфотерицин-В	-	-	-	-	9,00±0,65	-

\*Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ)

Мінімальні інгібуючі концентрації найбільш активних сполук **6.1**, **6.4**, **6.7-6.12**, та **6.15** визначали методом мікророзведень щодо тих самих мікроорганізмів, які використовувалися під час попереднього скринінгу (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

**Мінімальні інгібуючі концентрації досліджуваних сполук, мкг/мл**

Мікроорганізм	МІК (мкг/мл)								
	<b>6.1</b>	<b>6.4</b>	<b>6.7</b>	<b>6.8</b>	<b>6.9</b>	<b>6.10</b>	<b>6.11</b>	<b>6.12</b>	<b>6.15</b>
<i>S. aureus</i> /MSSA	>50	>50	50	25	>50	25	50	25	>50
<i>S. aureus</i> /MRSA	>50	>50	12,5	25	25	12,5	6,25	25	25
<i>E. coli</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>C. albicans</i>	>50	50	12,5	25	3,13	>50	>50	>50	>50

Аналіз взаємозв'язку структура-активність похідних 6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2H-тіопірано[2,3-d]тіазол-5-карбонових кислот дозволив



встановити, що наявність електроноакцепторних груп у структурі досліджуваних сполук зумовлює значний антимікробний потенціал. Зокрема сполуки, що вміщують атом бром у фенільному циклі у положенні С-7 тіопірано[2,3-*d*]тіазолового ядра володіли найвищим рівнем протимікробної активності у порівнянні зі сполуками із іншими атомами галогенів або електроннодонорними групами у структурі (Br>Cl>F>OCH<sub>3</sub>).

Значний рівень протимікробної активності ряду 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот дозволив нам здійснити розробку фармакофорних моделей як альтернативного методу у ліганд-орієнтованому дизайні потенційних протимікробних агентів [484]. Враховуючи значний рівень активності досліджуваних сполук щодо грам-позитивного метицилін-резистентного штаму *Staphylococcus aureus* (MRSA) було проведено ідентифікацію можливих фармакофорів, відповідальних за прояв протимікробної активності досліджуваних сполук щодо згаданого збудника використовуючи спеціальну процедуру фармакофорного пошуку імплементовану в програмі МОЕ версії 2007.09 [294]. Для побудови фармакофорної моделі використовували дані біологічної активності 59 сполук на основі похідних 4-тіазолідинону та споріднених гетероциклів. У даній базі, 47 речовин позначено як неактивні, 12 – як активні, з них сполуки **6.7-6.12** та **6.15** з класу 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот.

У процесі моделювання виділено три найкращі за точністю класифікації фармакофорні моделі (таблиця 6.3). Найкраща фармакофорна модель (*Модель 1*) містить 5 фармакофорних центрів і характеризується значенням показника точності класифікації 72,4 %. Незважаючи на те, що дана величина не є достатньо високою для застосування фармакофорної моделі як самостійного інструменту у цілеспрямованій ідентифікації активних сполук, вона має потенціал для застосування у якості засобу для віртуального скринінгу хімічних баз даних. При цьому фактор збагачення розробленої моделі становить EF = 2,05.

Таблиця 6.3

**Характеристика фармакофорних моделей антимікробної активності щодо метицилін-резистентного штаму *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

№	Кількість фармакофорних центрів	Перелік фармакофорних центрів	Ступінь взаємного перекриття активних сполук	Точність класифікації, %
1	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ароматичне кільце (або цикл з <math>\pi</math>-зв'язками);</li> <li>• гідрофобна область;</li> <li>• проєкція донора водневого зв'язку;</li> <li>• дві проєкції акцептора водневого зв'язку</li> </ul>	6,69	72,4
2	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дві проєкції донора водневого зв'язку;</li> <li>• дві проєкції акцептора водневого зв'язку;</li> </ul>	5,97	63,8
3	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ароматичне кільце (або цикл з <math>\pi</math>-зв'язками);</li> <li>• проєкція донора водневого зв'язку;</li> <li>• дві проєкції акцептора водневого зв'язку</li> </ul>	6,68	58,6

Для активних сполук встановлено помірний ступінь взаємного перекриття, який у повній мірі не дає можливості висувати аргументи на користь одного спільного чи кількох відмінних механізмів реалізації біологічної активності даного класу сполук, що виявляють істотний антибактеріальний ефект *in vitro*.

Фармакофорні центри, з яких формується *Модель 1*, представлені одним ароматичним кільцем (або циклом з  $\pi$ -зв'язками), однією гідрофобною областю, однією проєкцією донора водневого зв'язку та двома проєкціями акцептора водневого зв'язку. Розташування ароматичного ядра певною мірою просторово перетинається з гідрофобною областю (рис. 6.2), по одну сторону від яких лежать дві проєкції акцепторів протону, а по іншій – проєкція донора водневого зв'язку. Діаметр фармакофора становить 8,05 Å, лінію діаметра утворюють проєкції

донора та акцептора водневого зв'язку. Слід зазначити, що всі фармакофорні центри просторово розташовані в одній площині.

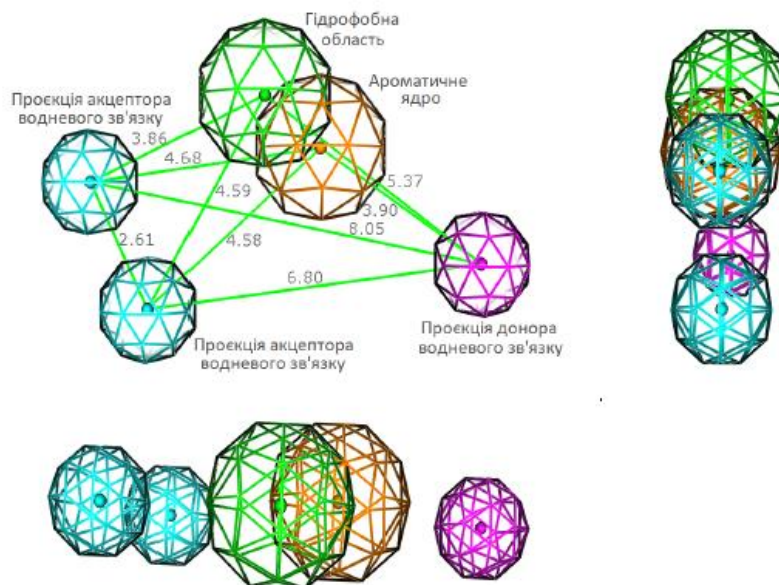


Рис. 6.2. Просторове розміщення фармакофорної *Моделі 1* у трьох проєкціях. Числами позначено відстань між фармакофорними центрами у Å.

Аналізуючи узгодженість однієї з високоактивних сполук які інгібують ріст метицилін-резистентного штаму *Staphylococcus aureus* (MRSA), а саме сполуки **6.9** (діаметр зони затримки росту –  $10,20 \pm 0,82$  мм) з фармакофорною моделлю, було виявлено два різні варіанти конформаційного узгодження даної сполуки з фармакофором (рис. 6.3). Відповідно до першого варіанту гідрофобна область та ароматичне ядро представлені одним і тим же фенільним фрагментом, який сполучений із тіопірано[2,3-*d*]тіазольним ядром, як потенційні акцептори протону для утворення водневого зв'язку виступають віцинальні метоксильні групи, гідроксил ОН карбоксильної групи на протилежному кінці молекули навпаки є донором протону для утворення водневого зв'язку. Згідно з другим варіантом гідрофобна область представлена тіопірановим циклом, ароматичне ядро – конденсованим із попереднім циклом тіазолідиноновим ядром (це допускається алгоритмом, оскільки в даному ядрі наявний подвійний зв'язок, який спроможний брати участь у  $\pi$ - $\pi$  взаємодії з комплементарними фрагментами біомішені); карбоксильна та оксо-група виступають у ролі

акцепторів водневого зв'язку, а донором водневого зв'язку в цьому випадку є амідний (NH) фрагмент тiazолідинонового ядра.

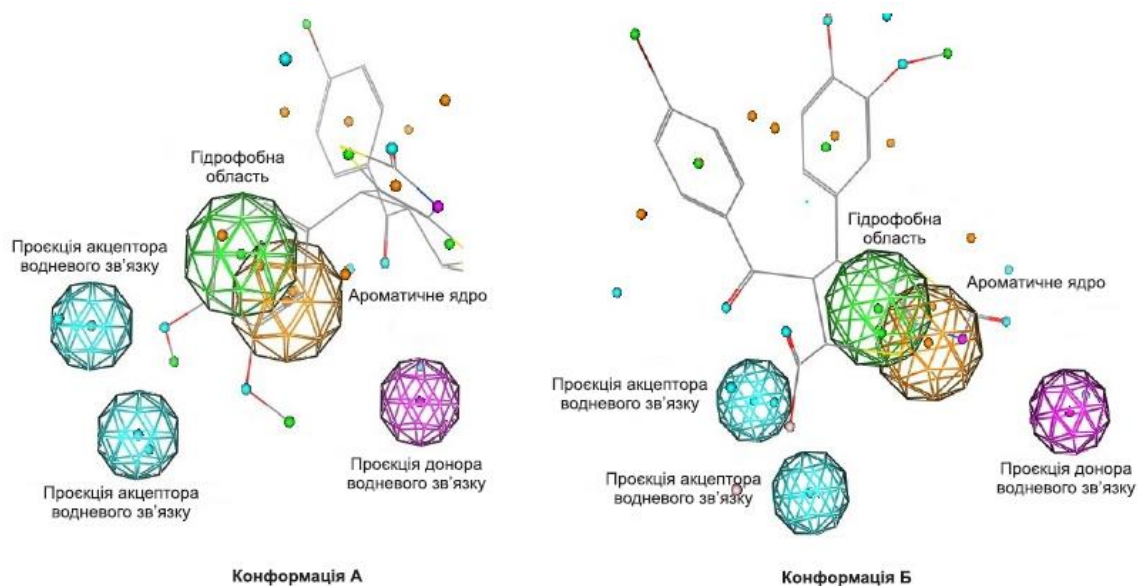


Рис. 6.3. Сполука-лідер **6.9** в узгоджених з фармакофорною моделлю конформаціях. Конформація А – RMSD = 0,803Å, конформація Б – RMSD = 0.906 Å.

У продовження цієї теми, нами було вивчено протимікробну активність інших похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолу **6.16-6.18** (рис. 6.4) щодо дванадцяти штамів мікроорганізмів, а саме *Staphylococcus aureus* 4591 (MRSA), *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (MSSA, ATCC 29213), біоплівково-утворюючого *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221, *Enterococcus faecium* VanA 419/Ana (VRE), *Enterococcus faecalis* CCM 4224, MDR ESBL *Escherichia coli* CE5556, резистентної до колістину *Enterobacter kobei* 3683, *Pseudomonas aeruginosa* R дикого типу, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954, *Escherichia coli* дикого типу CCM 201761 та *Candida albicans* з колекції Словацького технічного університету (Братислава, Словаччина).

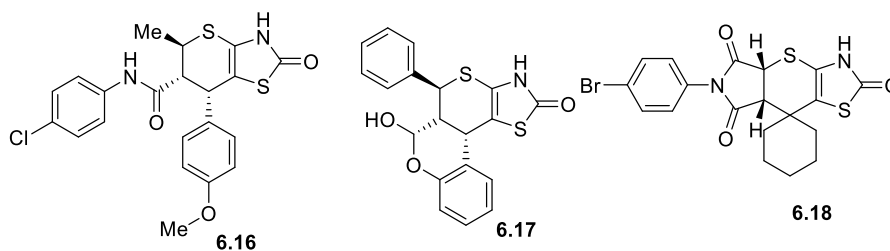


Рис. 6.4 Ряд функціонально-заміщених тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **6.16-6.18** використаних для скринінгу протимікробної та протигрибкової активності.

Дослідження проводилось шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) та мінімальної бактерицидної концентрації (МВС) за допомогою стандартизованого методу серійних мікророзведень (Таблиця 6.4.). Синтез сполук **6.16-6.18** для подальшого скринінгу протимікробної та протигрибкової активностей було здійснено згідно методик повідомлених раніше [362, 366, 485].

Так, сполука **6.16** виявила помірну інгібуючу активність щодо *Staphylococcus aureus* CCM 4223 MSSA із значенням МІК 25 мкМ. Сполука **6.17** проявила дещо слабшу протимікробну активність щодо штамів *Staphylococcus aureus* CCM 4223 MSSA та *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 із величиною МІК 50 мкМ. При цьому сполука **6.18** щодо аналогічних штамів мікроорганізмів проявила набагато кращу активність із значеннями МІК 25 та 12.5 мкМ, відповідно. Варто відзначити, що доволі високий протимікробний ефект сполуки **6.18**, обумовлено наявністю спіросистеми, а також піролідинового фрагменту у структурі, який у комплексі із тіазольним ядром і забезпечує даний вид активності, що було повідомлено у ряді досліджень для схожих гетероциклічних систем [66, 486, 487].

Таблиця 6.4

***In vitro* антибактеріальна та протигрибкова активності досліджуваних сполук, мкМ (МБК – мінімальна бактерицидна концентрація, МІК – мінімальна інгібувальна концентрація)**

Сполуки	Грам-позитивні										Грам-негативні										Гриби			
	<i>Staphylococcus aureus</i> 4591 MRSA		<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223 MSSA		<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 7221		<i>Enterococcus faecium</i> 419/ANA		<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224		<i>Escherichia coli</i> CE5556		<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Escherichia coli</i> 20574		<i>Enterobacter kobei</i> 3683		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955		<i>Candida albicans</i> CCM 8161	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК
<b>6.16</b>	>200	>200	>200	25	>200	>200	n/a	n/a	n/a	>200	n/a	n/a	>200	>200	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	>200	>200	>200	>200
<b>6.17</b>	n/a	n/a	>200	50	>200	50	>200	200	>200	100	n/a	n/a	>200	>200	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	>200	>200	>200	>200
<b>6.18</b>	>200	>200	50	25	12,5	12,5	n/a	n/a	>200	>200	n/a	n/a	>200	>200	-	-	-	-	n/a	n/a	>200	>200	>200	>200

n/a- відсутність активності; «-» не тестовано;

## 6.2 Дослідження протитрипаносомної активності поліфункціональних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу.

У доступних літературних даних було повідомлено про значний рівень протитрипаносомної активності 4-тіазолідинонів та їх конденсованих похідних зокрема, тіопірано[2,3-*d*]тіазолів [487-493]. Відповідно, метою даного фрагменту нашої роботи стала оцінка протитрипаносомного потенцілу деяких поліфункціональних похідних тіопіранотіазолу, зокрема 2-оксо-5-феніл-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-іл-оксо-ацетатних кислот **6.19-6.21**, амідів 5-феніл-7-арил(гетерил)-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонових кислот **6.22-6.27** та 5-гідроксиметил-3,5,5а,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,6-діону **6.28**. Синтез зазначених сполук було здійснено за методами повідомленими нами раніше [321, 362, 365, 485] (Рис. 6.5).

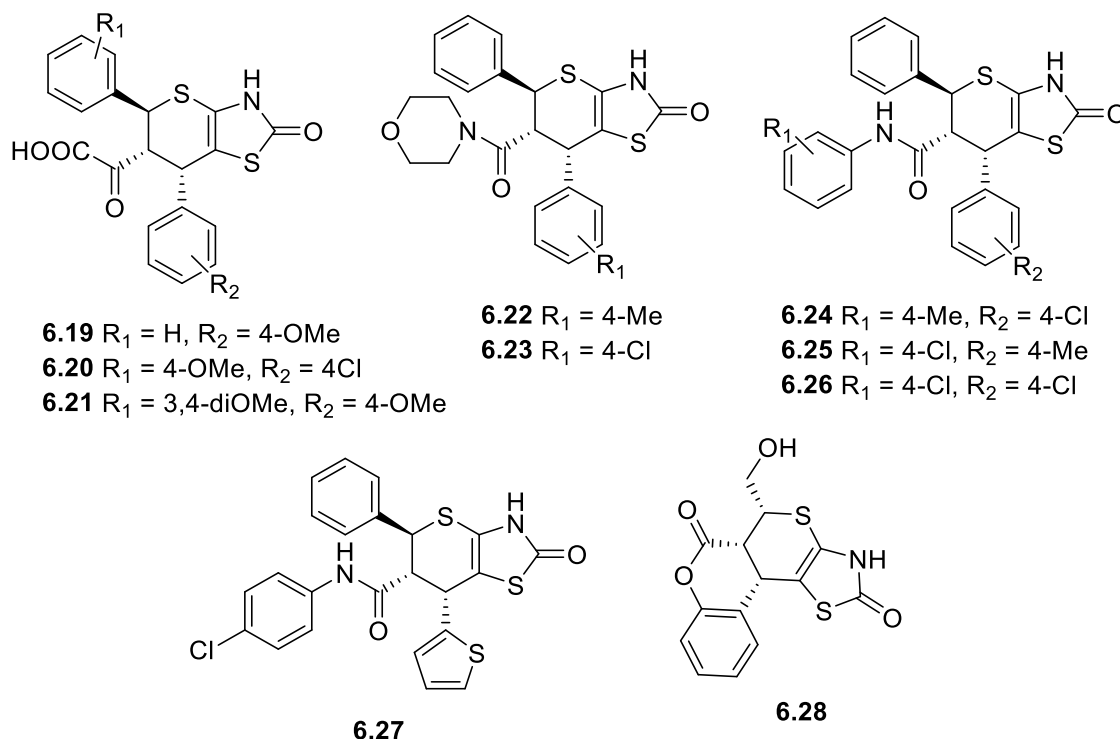


Рис. 6.5. Структури ряду функціонально-заміщених тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, використаних для скринінгу протитрипаносомної активності.

Протитрипаносомну активність тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **6.19-6.28** досліджували *in vitro* експерименті щодо *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg). Значення IC<sub>50</sub> розраховували на основі щонайменше трьох незалежних експериментів.

Загалом, серед досліджуваних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу було ідентифіковано три «сполуки-хіти» **6.24-6.26**, які пригнічували ріст паразитів у мікро- та субмікромольних концентраціях (табл. 6.5). Аналіз взаємозв'язку структура-активність досліджуваних сполук доводить наявність чіткої залежності протипаразитарних властивостей від природи замісників у тіопірано[2,3-*d*]тіазольному ядрі. Так, похідні 2-оксо-5-феніл-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-іл-оксо-ацетатних кислот проявили низький рівень протитрипаносомної активності. З іншого боку, заміна оксо-ацетатного фрагменту у положенні С-5 базового ядра на амідний фрагмент зумовлювала суттєве збільшення рівня активності. Зокрема наявність *N*-4-хлорофеніламідного фрагменту у положенні С5 є найбільш сприятливим на прояв протипаразитарної активності. Дещо в меншій мірі наявність 4-хлорофенільних фрагментів у положенні С-7 зумовлює наявність протитрипаносомної активності у ряді амідів 5-феніл-7-арил(гетерил)-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонових кислот. Варто відзначити, що тетрациклічне похідне, а саме 5-гідроксиметил-3,5,5а,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,6-діон **6.28** проявило низький рівень активності щодо *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg).

Таблиця 6.5

**Антитрипаносомна активність похідних  
тіопірано[2,3-*d*]тіазолу щодо *Trypanosoma brucei gambiense***

Сполука	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	SD	IC <sub>50</sub> , мкМ	SD
<b>6.19</b>	>10	-	>22,5	-
<b>6.20</b>	>10	-	>21,6	-
<b>6.21</b>	>10	-	>20,3	-
<b>6.22</b>	>10	-	>22,1	-
<b>6.23</b>	6,3	1,2	13,3± 1,11	2,6
<b>6.24</b>	2,2 ± 0,40	0,1	4,4± 0,55	0,1



<b>6.25</b>	0,232 ± 0,03	0.0	0.470± 0.05	0,041
<b>6.26</b>	1,1± 0,31	0.1	2.1± 0.41	0,2
<b>6.27</b>	4,8± 0,60	1.2	10.0± 0.90	2,6
<b>6.28</b>	>10	-	>31.1	-
Пентамідин, nM			1,364 ± 0,464	-
Ніфуртімокс			2,389 ± 0,608	-

6.3 Розробка методів кон'югування з лектинами 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів та вивчення їх антипроліферативної активності.

Лектини – це білки або глікопротеїни рослинного, мікробного або тваринного походження, які здатні до селективного зв'язування вуглеводів (вільних або у складі глікокон'югатів), не викликаючи їх подальших перетворень (на відміну від ферментів глікозидаз). Лектини – потужний інструмент для вивчення вуглеводів та їхніх похідних як у розчинах, так і на поверхні клітин. Їх широко використовують у препаративних і аналітичних цілях у біохімії, клітинній біології, імунології та споріднених науках, передусім при дослідженні глікокон'югатів [494-496]. Спектр застосувань лектинів швидко зростає і потенціал їх ще далеко не вичерпаний. Так, одним із перспективних напрямків застосування лектинів є цілеспрямована доставка лікарських засобів до певного типу клітин або тканин. Доставка ліків до специфічного місця їх дії забезпечує ряд переваг над ліками нецілеспрямованої дії. Перевага лектинів як носіїв у порівнянні з синтетичними полімерами також полягає у їх легкій біодеградабельності, адже лектини – це білки, які легко руйнуються лізосомальними ферментами живих клітин.

Для того, щоб лектини виконували роль носія, необхідно створити відносно стійкий у біологічному середовищі комплекс лектин-лікарський засіб. Зв'язування може бути здійснене через специфічний вуглевод (якщо він є у складі лікарського засобу), або шляхом ковалентного зв'язування лектину з лікарським засобом. У першому випадку зв'язок лектину з глікозидом є дуже

нетривким, але структура лікарського засобу не змінюється. У другому випадку відбувається хімічна модифікація лікарського засобу та молекули лектину, що може вплинути на його біологічну активність.

Метою даного фрагменту нашої роботи була розробка методик приєднання похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолу до лектинів та оцінка біологічної активності одержаних кон'югатів в порівнянні з вихідними речовинами.

В якості низькомолекулярного ліганда для приєднання до лектину було використано 7-заміщені 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегіди (сполуки **6.29** та **6.30**), які було синтезовано за описаними раніше методиками (Рис. 6.6) [497].

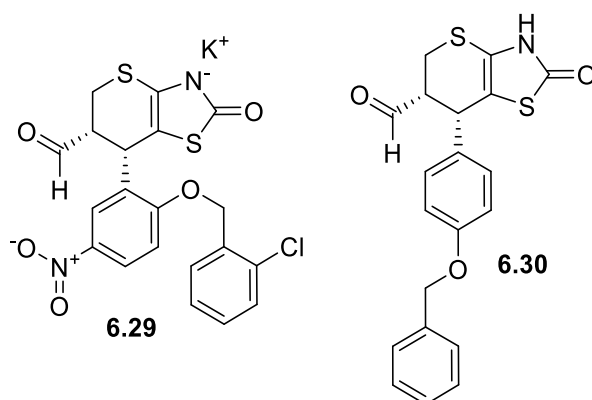
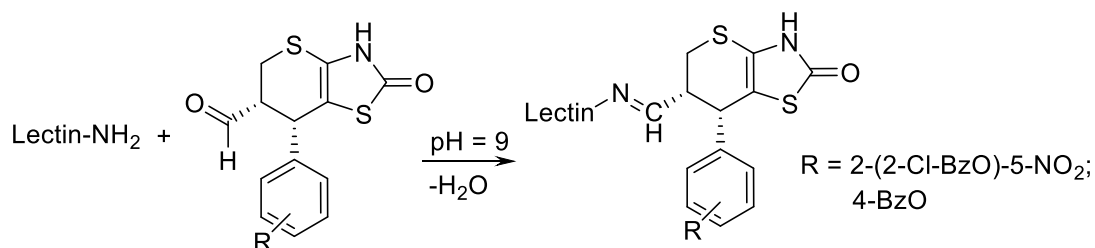


Рис. 6.6. Структури 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів **6.29**, **6.30** використані для кон'югування з лектинами.

Зазначені похідні було кон'юговано до лектину з насіння гороху (PSA, *Pisum sativum* agglutinin), лектину насіння арахісу (PNA, peanut agglutinin), а також еритроаглютиніну квасолі звичайної (PHA-E). Крім того, сполуку **6.30** було кон'юговано з сироватковим альбуміном людини (HSA). Кон'югація здійснювалась шляхом взаємодії альдегідної групи досліджуваних сполук з аміногрупами білка в лужному середовищі (pH = 9,0) (Схема 6.1) [498-501].



Важливою умовою для приєднання ліганда до лектину є його розчинність у водному середовищі, або у середовищі, де не відбувається процес денатурації білків. Це водно-сольові середовища з можливим невисоким вмістом спирту (до 20 – 30 %) або інших органічних речовин (наприклад, диметилсульфоксиду, до 20 – 30 %). Досліджувані сполуки **6.29** та **6.30** добре розчинні в ДМСО, етанолі і водно-етанольних сумішах, що важливо для одержання кон'югатів. Крім, того наявність у структурі досліджуваних сполук високореакційної альдегідної групи дозволяє легко приєднувати залишки білків в м'яких умовах не викликаючи їх денатурації.

При аналізі досліджуваних кон'югатів встановлено, що приблизно 0,4 мг сполуки **6.29** (4% загальної маси кон'югату) зв'язується з 10 мг лектину PSA. Одержаний кон'югат розчинний у воді, 30 % ДМСО, нерозчинний у органічних розчинниках. При більшому вмісті досліджуваної сполуки **6.29** в кон'югаті останній втрачав розчинність і випадав в осад. Дія одержаного кон'югату сполуки **6.29** на клітини лейкемії миші лінії L1210 представлено на рис. 6.7.

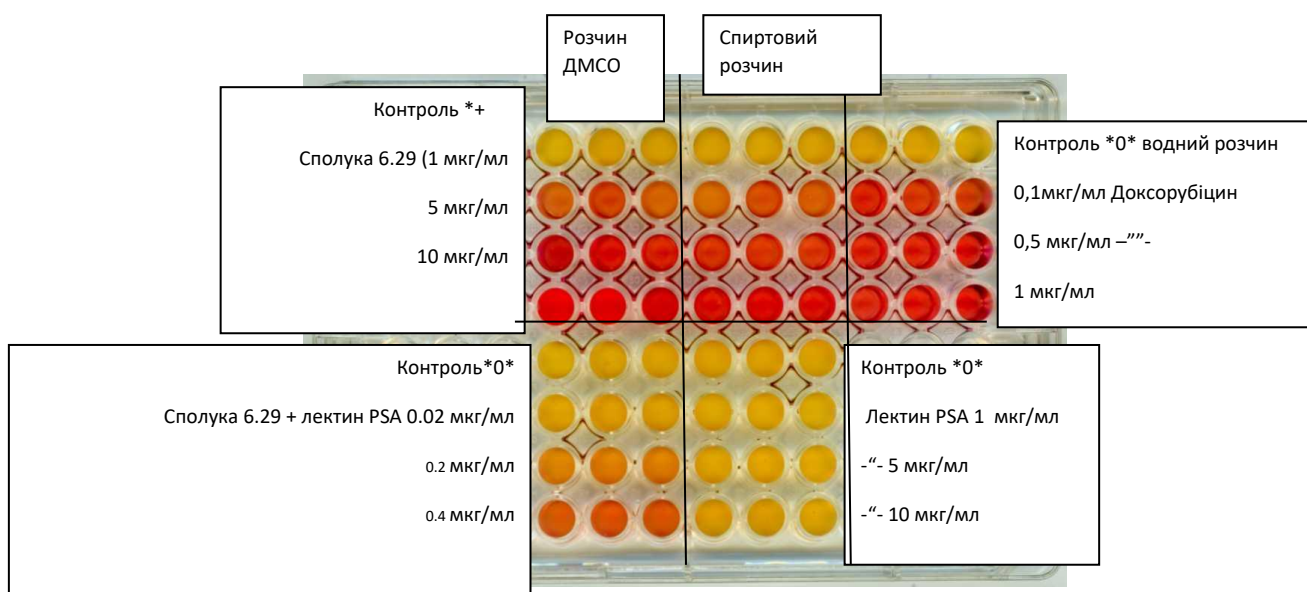


Рис. 6.7. Цитотоксичність лектину гороху, доксорубіцину, сполуки **6.29**, та кон'югату сполуки **6.29** з лектином гороху на клітини лейкемії миші лінії L1210 через 72 год від початку досліджу.

У лунках планшета зміна кольору індикатора метилового червоного з жовтого на червоний сигналізує про появу загиблих клітин. Так, встановлено, що сполука **6.29** є приблизно у 10 разів менш активною за доксорубіцин, однак її активність все ж є достатньо високою. Лектин гороху в концентрації 10 мкг/мл є повністю нетоксичним для клітин лейкемії миші лінії L1210. В той же час кон'югат лектину гороху з сполукою **6.29** в концентрації 10 мкг/мл виявляє приблизно аналогічну дію, як некон'югована сполука **6.29** в дозі 1 мкг/мл. При перерахунку дії кон'югату на чисту сполуку, можна стверджувати про підсилення ефекту досліджуваної сполуки **6.29** у 2,5 рази за рахунок її приєднання до лектину PSA (рис 6.8).

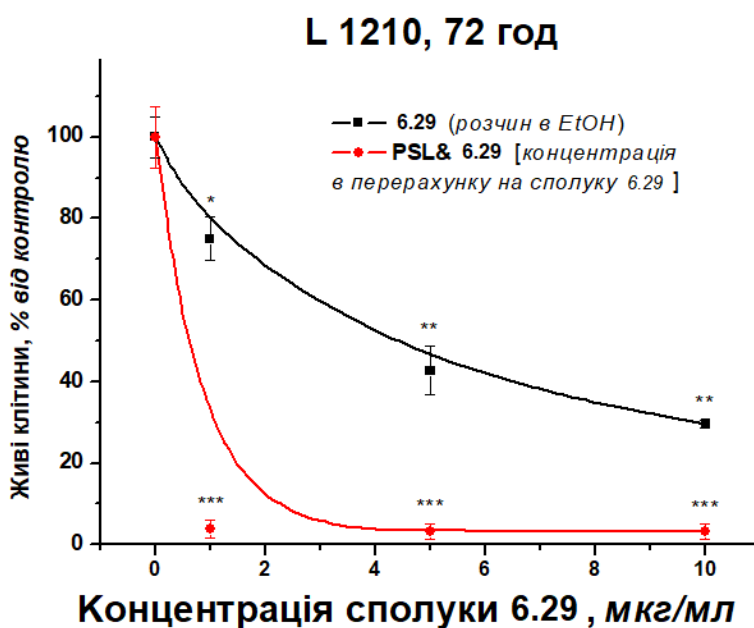


Рис. 6.8. Дія сполуки **6.29** та її кон'югату з лектином гороху на клітини лейкемії миші лінії L1210 (в перерахунку на чисту субстанцію **6.29**).

У той час як клітини лейкемії миші лінії L1210, що ростуть у суспензійній культурі, гинули під дією як доксорубіцину, так і сполуки **6.29**, цитотоксичний

ефект даних агентів також досліджувався щодо ембріональних клітин нирки людини лінії HEK293, що ростуть у моношаровій культурі і був менш вираженим, особливо в випадках обробки клітин сполукою **6.29** (рис. 6.9).

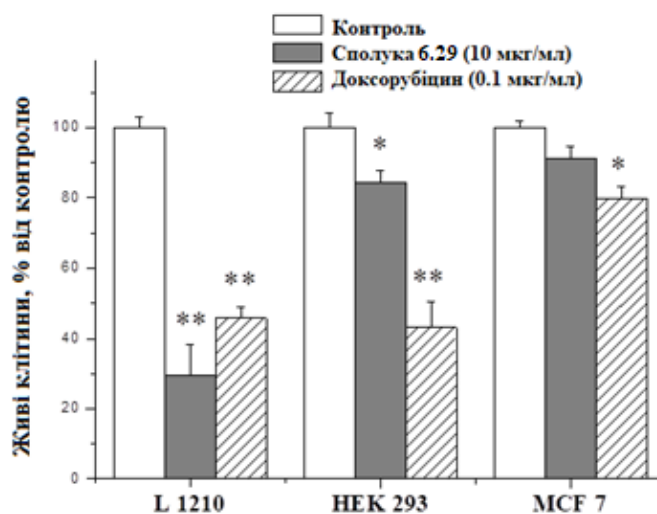


Рис. 6.9. Дія сполуки **6.29** і доксорубіцину на клітини лейкемії миші L1210, ембріональні клітини нирки людини лінії HEK293 та клітин карциноми молочної залози людини лінії MCF-7.

Окрім того, досліджувана сполука **6.29** не впливала на клітини карциноми молочної залози людини (епітеліального походження) лінії MCF-7, які також ростуть у моношаровій культурі. Доксорубіцин був цитотоксичним для клітин лінії MCF-7, хоча в набагато меншій мірі, ніж для клітин лейкемії L1210 та ембріональних клітинах нирки людини (HEK293).

Вірогідною причиною посилення токсичності досліджуваної сполуки **6.29** щодо клітин лейкемії миші лінії L1210 є селективне зв'язування лектинів з вуглеводними рецепторами клітинної мембрани. Зокрема із лектинами подібним чином також реагують тканини живих організмів, які складаються з клітин різного типу. Доволі показовим є те, що дія кон'югату сполуки **6.30** з лектином в повній мірі проявляється не одразу, а лише на третю добу від початку досліду. Це ймовірно свідчить про те, що кон'югат сполуки **6.29** з лектином PSA спочатку проникає в клітину, надалі від'єднується від лектину і лише після цього проявляє свою дію. Проникнення лектинового кон'югату в клітини може відбуватися

шляхом піноцитозу, як це відбувається у випадку вільних лектинів [502]. Вивільнення ліганду в клітинах ймовірно може здійснюватися шляхом дії лізосомальних ферментів подібно до інших типів білків, які використовуються у якості носіїв біологічно активних сполук [503].

Варто зазначити, що величина  $EC_{50}$  для сполуки **6.29** та її кон'югату з лектином гороху є інтегральним показником, який залежить від тривалості експерименту. Величини  $EC_{50}$  представлені в таблиці 6.6.

Таблиця 6.6

**Значення  $EC_{50}$  для сполуки 6.29 та її кон'югату з лектином гороху в залежності від тривалості експерименту**

$EC_{50}$ , мкг/мл	24 год	48 год	72 год
Феноловий червоний (дослідження на цитотоксичність)	~ 10	~ 8,3	4,4
МТТ (метаболический тест)	$\geq 10$	7,8	3,4

Фарбування товстої кишки людини лектином гороху міченим колоїдним золотом засвідчило селективність зв'язування даного лектину з певними гістологічними структурами, зокрема з муцином келихоподібних клітин (в тому числі лектин інтенсивно взаємодіяв з мембраною везикул) (рис 6.10).

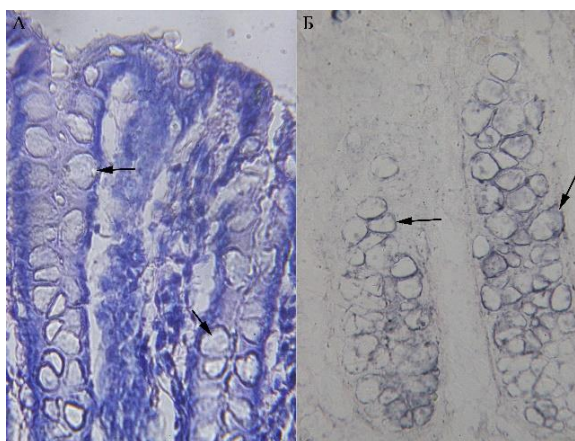


Рис. 6.10. Фрагмент слизової товстої кишки людини. А) Фарбування гематоксилін-еозин; Б) фарбований PSA-K3. Стрілками позначені секреторні гранули келихоподібних клітин.

Вибір товстої кишки людини як органу, з яким було досліджено взаємодію лектину гороху обумовлений тим, що внутрішня поверхня травного тракту може бути місцем зв'язування кон'югату сполуки **6.29** з лектинами. Зокрема, можливе введення подібних кон'югатів в мазеву або супозиторну основу, наприклад у свічках при пухлинах прямої кишки. Загалом враховуючи ряд обмежень застосування лектинів при системному введенні їх доцільно використовувати лише місцево при захворюваннях шкіри, травного тракту, носоглотки, легень, у складі полоскань і спреїв, свічок і мазевих основ.

На відміну від сполуки **6.29** збільшення концентрації досліджуваної сполуки **6.30** у реакційній суміші до 1 мг на 10 мг лектину гороху PSA не призводить до інактивації лектину, хоча не вся кількість **6.30** була іммобілізована на лектині. При аналізі одержаного кон'югату з 10 мг лектину зв'язувалось до 0,9 мг сполуки **6.30** (9% загальної маси кон'югату). У подібний спосіб із сполукою **6.30** взаємодіяли лектин насіння арахісу PNA та еритроаглютинін квасолі звичайної PNA-E, але з 10 мг PNA максимально зв'язувалось до 0,5 мг сполуки (5% загальної маси кон'югату), а з 10 мг PNA-E – до 8% загальної маси кон'югату. В той же час з 10 мг сироваткового альбуміну людини HSA максимально зв'язувалось до 1,6 мг досліджуваної сполуки (16% загальної маси кон'югату). Одержані кон'югати лектинів із похідним **6.30** розчинні у воді, забуференому фізіологічному розчині та у 1 % розчині NaHCO<sub>3</sub>, тоді як вихідна сполука **6.30** у воді практично не розчинна.

Клітини Т-лімфобластної лейкемії людини лінії Jurkat на відміну від клітин лейкемії миші лінії L1210, які не були чутливі до дії лектину гороху PSA проявляли чутливість до дії лектинів PNA-E і PNA. Обчислення показали, що IC<sub>50</sub> для PNA становило 80 мкг/мл, PSA – 37 мкг/мл та PNA-E – 20 мкг/мл. IC<sub>50</sub> для сполуки **6.30** становило 32 мкг/мл. Таким чином, встановлено, що лектин PNA-E є більш активним по відношенню до клітин лінії Jurkat, ніж сполука **6.30**. Кон'югати зазначених лектинів з 5% вмістом сполуки **6.30** були більш токсичні щодо клітин Т-лімфобластної лейкемії людини лінії Jurkat на 23 % для PSA-**6.30**, на 34 % для PNA-**6.30** та на 12 % для PNA-E-**6.30**. IC<sub>50</sub> для кон'югатів лектинів з

**6.30** становила 10 мкг/мл, а  $IC_{50}$  для некон'югованої сполуки **6.30** становила приблизно 30 мкг/мл. В той же час приєднання похідного **6.30** до людського сироваткового альбуміну збільшило розчинність даної сполуки у воді, але послабило дію одержаного кон'югату. Кон'югат людського сироваткового альбуміну (HSA) з похідним **6.30** був менш токсичним щодо клітин Т-лімфобластної лейкемії людини лінії Jurkat приблизно на 40% (рис. 6.11).

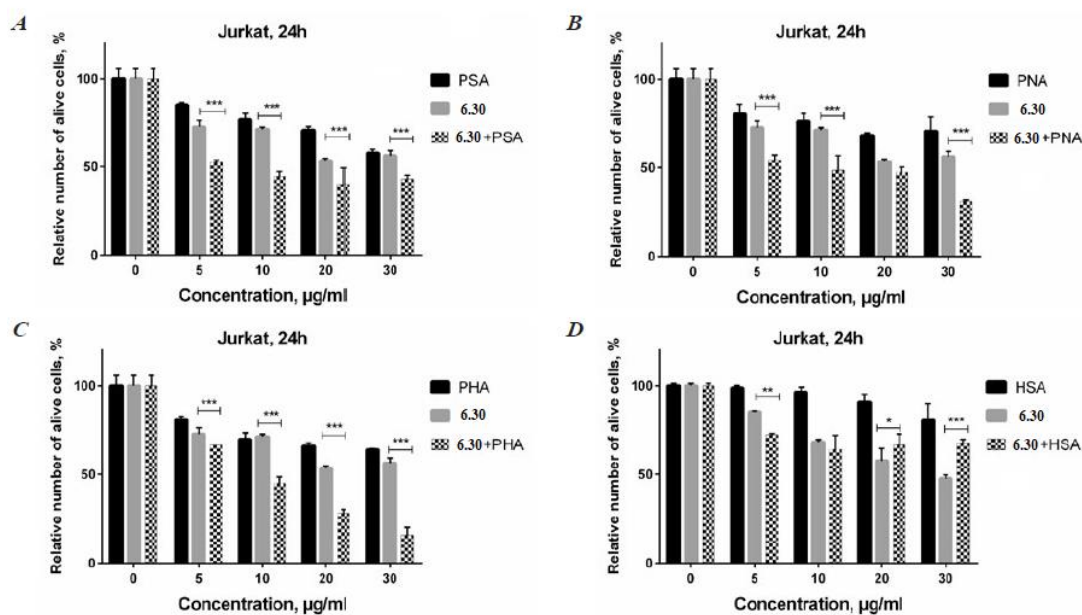


Рис. 6.11. Дія лектинів, похідного **6.30** та їх кон'югатів на клітини Т-лімфобластної лейкемії людини.

Встановлено, що людський сироватковий альбумін HSA та лектин гороху дещо пригнічували ріст клітин аденокарциноми товстої кишки людини лінії НСТ 116, однак дія PNA та PNA-E на дані клітини була значно сильнішою. Також дія кон'югатів лектинів з похідним **6.30** була сильнішою, ніж окрема дія **6.30** та лектинів.  $IC_{50}$  для кон'югату PSA-**6.30** стосовно клітин вищезазначеної лінії становила 28 мкг/мл, для PNA-**6.30** – 4 мкг/мл та для PNA-E-**6.30** – 3 мкг/мл.  $IC_{50}$  для похідного **6.30** становила приблизно 10 мкг/мл. В той же час дія HSA-E-**6.30** та кон'югату PSA-**6.30** була слабшою, у порівнянні з дією некон'югованого похідного **6.30** (рис. 6.12).

В той же час псевдонормальні клітини ембріона нирок людини (HEK 293) проявили слабку чутливість до дії лектинів PSA, PNA та PNA-E (при дозі 30



мкг/мл спостерігалось приблизно 20% мертвих клітин). Кон'югація похідного **6.30** із зазначеними лектинами не призвела до суттєвого зростання цитотоксичного ефекту, який був співмірним із некон'югованим похідним **6.30** (рис. 6.13).

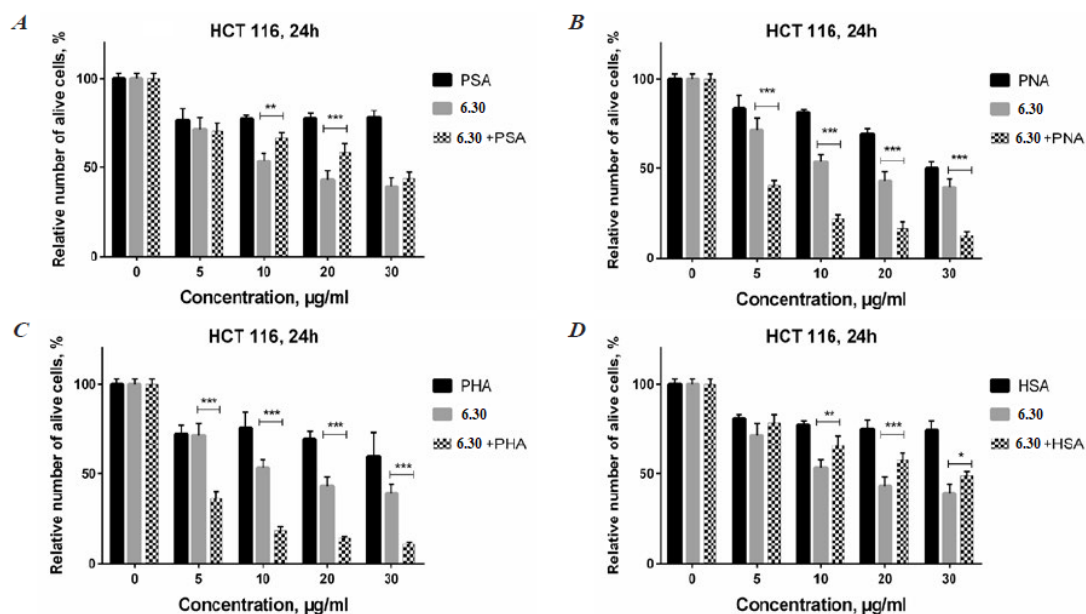


Рис. 6.12. Дія лектинів, похідного **6.30** та їх кон'югатів на клітини аденокарциноми товстої кишки людини HCT 116.

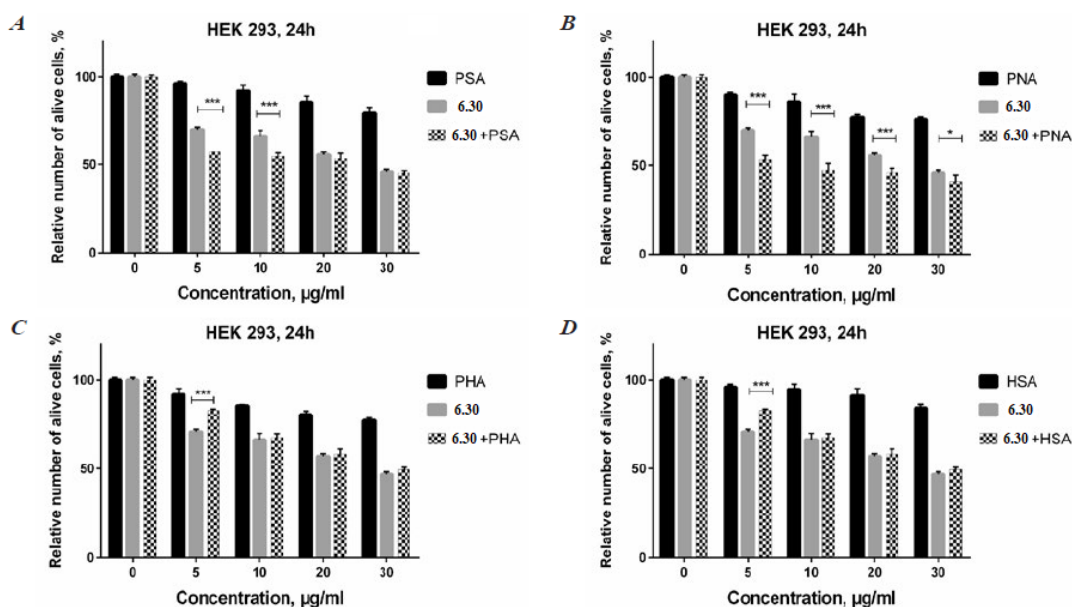


Рис. 6.13. Дія лектинів, похідного **6.30** та їх кон'югатів на псевдонормальні клітини ембріона нирок людини (HEK 293).

Таким чином, як свідчать результати дослідження цитотоксичності кон'югування сполуки **6.30** до лектинів гороху та арахісу підвищує

протипухлинну активність одержаних кон'югатів. Псевдонормальні клітини лінії НЕК 293 є малочутливі до дії лектинів, тоді як клітини аденокарциноми товстої кишки людини лінії НСТ 116 виявляли відносно високу чутливість як до лектинів, так і до їх кон'югатів з похідним **6.30**. Клітини аденокарциноми товстої кишки людини НСТ 116 проявили значний рівень чутливості до дії досліджуваних кон'югатів, який був більш ніж у 2 рази вищий ніж дія окремих лектинів чи некон'югованої досліджуваної сполуки **6.30**. Враховуючи те, що досліджувані лектини практично не токсичні до нормальних клітин є можливість зменшення токсичної дії досліджуваної сполуки **6.30** на нормальні клітини і відповідно підвищення її для пухлинних клітин, зокрема для клітин аденокарциноми товстої кишки людини.

Як свідчать численні літературні дані [504-507] найвірогіднішою причиною посилення токсичності різних типів кон'югатів з лектинами на нормальні клітин є селективне зв'язування лектинів з вуглеводними рецепторами клітинної мембрани. Зокрема встановлено, що кон'югат HSA-**6.30** не діє на клітини Т-лімфобластної лейкемії людини і діє значно слабше на клітини аденокарциноми товстої кишки людини НСТ 116 за відповідні досліджувані кон'югати з лектинами.

Якщо розглядати дію кон'югатів лектинів на псевдонормальні клітини лінії НЕК 293 через 72 години, то їх дія виявляється лише у високих дозах, тоді, як при дії на клітини аденокарциноми товстої кишки людини лінії НСТ 116 підсилюється у декілька разів (рис. 6.14).

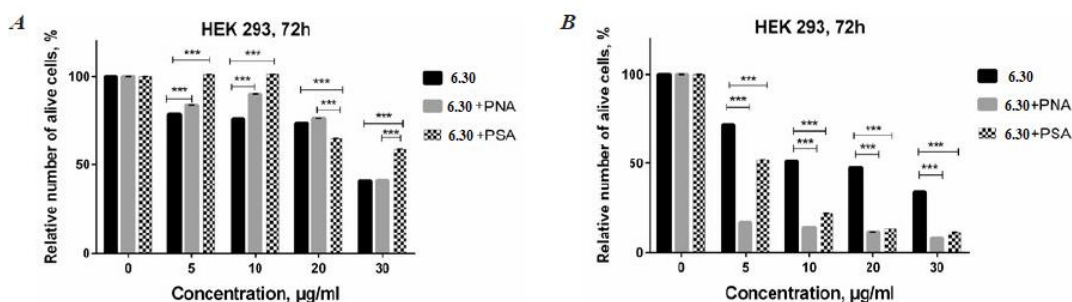


Рис. 6.14. Дія лектинів, похідного **6.30** та їх кон'югатів на псевдонормальні клітини ембріона нирок людини (НЕК 293) та клітини аденокарциноми товстої кишки людини НСТ 116 протягом 72 годин.

Враховуючи відсутність псевдонормальних клітин товстої кишки людини при дослідженні цитотоксичності нами було використано клітини ембріона нирок людини лінії НЕК 293, що мають багато спільного з наведеною лінією в плані структури глікокон'югатів клітинної поверхні. Зокрема, відомо що, на відміну від пухлинних клітин, вони мають значну кількість термінальних сіалових кислот. Таким чином, видається імовірним, що лектини можуть зв'язуватись специфічно з окремими глікокон'югатами, створюючи підвищену локальну концентрацію речовин, які вони здатні на собі нести.

Слід зазначити, що діюча концентрація одержаних нами кон'югатів з досліджуваними сполуками є недостатньою для практичного використання, так як вона більша приблизно у 10 разів за дію відомого протипухлинного препарату доксорубіцину. Однак можна сподіватись, що при приєднанні до лектинів, як носіїв більш активних протипухлинних сполук ефективність подібних кон'югатів може бути суттєво підсилена.

6.4. Дослідження впливу похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на виживання пухлинних, псевдонормальних і нормальних ізольованих мононуклеарних клітин *in vitro*.

В якості досліджуваних сполук було використано *rel*-(5*R*,5*aR*,11*bS*)-5-гідроксиметил-3,5,5*a*,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,6-діони (сполуки **6.31** та **6.32**), які було синтезовано за описаною раніше методикою [366] (Рис. 6.15).

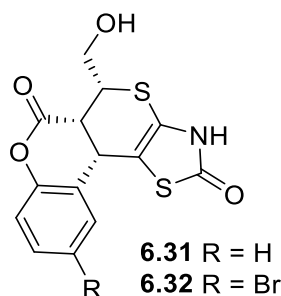


Рис. 6.15. Структури *rel*-(5*R*,5*aR*,11*bS*)-5-гідроксиметил-3,5,5*a*,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2,6-діонів використані для оцінки цитотоксичності.

Лейкемія, рак молочної залози та гліобластома, є прикладами онкологічної патології, яка піддається надзвичайно складному лікуванню, та відповідно є актуальними моделями у вивченні протипухлинних ефектів при створенні нових хіміотерапевтичних препаратів. Так, цитотоксичність похідних тіопіранотіазолу **6.31**, **6.32** досліджували на клітинах раку людини різного тканинного походження (лейкемія лінії HL-60 та Jurkat, K562; рак молочної залози лінії MCF-7, аденокарцинома MDA-MB-231; клітини гліобластоми лінії U251) і неракових клітинних лініях (псевдонормальні кератиноцити людини HaCaT) (табл. 6.7) [508].

Так, досліджувані сполуки проявили відсутність цитотоксичного ефекту або низький його рівень щодо ліній лейкемії HL-60 та K562, аденокарциноми MDA-MB-231 та гліобластоми лінії U251. З іншого боку сполука **6.31** проявила високий цитотоксичний ефект стосовно лінії Jurkat зі значенням  $IC_{50}$  9.2 мкМ, а сполука **6.32** проявила помірну цитотоксичність щодо раку молочної залози лінії MCF-7 ( $IC_{50} = 21,0$  мкМ). Варто відзначити, що за ідентичних умов проведення експерименту доксорубіцин як препарат порівняння проявив вищу цитотоксичну активність, ніж досліджувані похідні, щодо усіх досліджуваних пухлинних клітинних ліній. Проте, позитивним у дослідженні даних сполук являлось, те що дані сполуки мають дуже низький рівень цитотоксичності ( $IC_{50} > 100$  мкМ) щодо псевдонормальних кератиноцитів людини лінії HaCaT, зокрема у порівнянні з доксорубіцином ( $IC_{50} = 0,9$  мкМ).

Таблиця 6.7

**IC<sub>50</sub> сполук 6.31, 6.32 та доксорубіцину (Dox) щодо клітинних ліній різного  
тканинного походження (МТТ аналіз протягом 72 годин інкубації)**

Сполука	IC <sub>50</sub> , мкМ						
	HL-60	K562	Jurkat	MCF-7	MDA- MB-231	U251	HaCaT
<b>6.31</b>	nd	56,6 ± 2,7	9,2 ± 0,7	>100	93,6 ± 2,1	86,7 ± 3,2	>100
<b>6.32</b>	nd	48,3 ± 2,1	49,3 ± 2,6	21,0 ± 0,2	>100	63,5 ± 2,8	>100
<b>Dox</b>	1,0 ± 0,07	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,06	3,8 ± 0,3	2,3 ± 0,3	4,3 ± 0,6	0,9 ± 0,05

\*nd – не визначено

Індекс селективності (SI) – це значення, яке використовується для оцінки *in vitro* протипухлинного потенціалу лікарських засобів та лікоподібних молекул [509, 510]. Він розраховується як відношення значення IC<sub>50</sub> для нормальних клітин до вибраної лінії пухлинних клітин. Так, нами було розраховано SI як відношення значення IC<sub>50</sub> клітин лінії HaCaT до значень IC<sub>50</sub> для обраних пухлинних клітинних ліній. Відповідно, найвищий рівень SI був встановлений для сполуки **6.31** відносно клітин лейкемії лінії Jurkat (SI = 10,87), а також спостерігався помірний рівень селективності щодо раку молочної залози лінії MCF-7 (SI = 4,76) для сполуки **6.32** (табл. 6,8). Варто відзначити, що значення індексів селективності у повній мірі корелюють зі значеннями результатів цитотоксичності методом МТТ аналізу для досліджуваних сполук.

Таблиця 6.8

**Індекс селективності сполук 6.31, 6.32 та доксорубіцину (Dox) для  
пухлинних клітин людини різних ліній порівняно з псевдонормальними  
клітинами людини лінії HaCaT**

Сполука	SI						
	HL-60	K562	Jurkat	MCF-7	MDA- MB- 231	U251	HaCaT
<b>6.31</b>	nd	1,77	10,87	1,00	1,07	1,15	1,00
<b>6.32</b>	nd	2,07	2,03	4,76	1,00	1,57	1,00
<b>Dox</b>	0,90	0,69	0,90	0,23	0,39	0,21	1,00

\*nd – не визначено

## ВИСНОВКИ

1. Пошук протимікробних агентів серед похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу дозволив ідентифікувати ряд сполук-лідерів з найбільшою активністю щодо *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 та *Candida albicans*, при цьому найактивнішими були похідні 6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот **6.7**, **6.9-6.11** та 6'-(4-бромофеніл)-4*a*',7*a*'-дигідро-5'*H*-спіро[циклогексан-1,8'-піроло[3',4':5,6]тіопірано[2,3-*d*]тіазол]-2',5',7'(3'*H*,6'*H*)-тріон **6.18**.

2. Для високоактивних похідних на основі 6-бензоїл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот запропоновано фармакофорну модель для оцінки прояву протистафілококової активності, яка складається з ароматичного кільця (або циклу з  $\pi$ -зв'язками), гідрофобної області, проєкції донора водневого зв'язку та двох проєкцій акцептора водневого зв'язку. Дана модель може бути застосована для скринінгу протимікробної активності серед подібних структур із фактором збагачення EF = 2.05. Попри невстановлений механізм, через який реалізують свою протимікробну дію дані сполуки, зв'язування з потенційною біомішенню може відбуватися через три водневі зв'язки – у двох з них активна сполука є акцептором протону, а в одному постає в ролі донора протону.

3. Досліджено протитрипаносомну активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на паразитах *Trypanosoma brucei gambiense*. Серед амідів 5-феніл-7-арил(гетерил)-3,7-дигідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбонових кислот було ідентифіковано три «сполуки-хіти» **6.10-6.12** з високою протипаразитарною активністю у мікро- та субмікромолярних концентраціях.

4. Досліджено особливості зв'язування 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів **6.29**, **6.30** із лектинами та людським сироватковим альбуміном, яке дозволило одержати високоактивні кон'югати щодо ліній клітин аденокарциноми товстої кишки людини НСТ 116,

лейкемії миші L1210, Т-лімфобластної лейкемії людини Jurkat, які були нетоксичні на псевдонормальні клітини ембріона нирок людини лінії НЕК 293.

5. Дослідження *in vitro* цитотоксичності хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **6.31**, **6.32** на пухлинні, псевдонормальні і нормальні ізольовані моонуклеарні клітини встановило, що дані сполуки виявляють високу цитотоксичність щодо Т-лімфобластної лейкемії людини Jurkat та раку молочної залози лінії MCF-7, та володіють набагато нижчими токсикометричними показниками на псевдонормальну клітинну лінію кератиноцитів людини лінії HaCaT ніж доксорубіцин як препарат порівняння.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [481-484, 498-501, 508]*

## РОЗДІЛ 7

СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ  
АНТРАХІНОНГІДРАЗОНІВ НА ОСНОВІ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА ЙОГО  
СТРУКТУРНИХ АНАЛОГІВ

Похідні антрацен-9,10-діону (9,10-антрахінону) є важливим джерелом для одержання нових біоактивних молекул, які мають широкий спектр фармакологічної активності, зокрема антимікробну [511], протівірусну [512], протипухлинну [513-515] та антиоксидантну [516]. Окрім того, серед зазначеного класу сполук було ідентифіковано ряд лікарських засобів, у тому числі протипухлинні антрациклінові антибіотики, такі як дауноміцин, адриаміцин та мітоксантрон [517-519], послаблюючі засобів (дантрон, емодин, алое-емодин) [520], антипсоріатичний середник антралін [521] та препарат для лікування астеоартриту діацреїну [522]. Унікальність антрахінонового фрагменту з точки зору фармакологічного потенціалу ґрунтується на поліфункціональних замісниках у планарній циклічній системі [523] у вигляді поліпептидного, полінуклеотидного та глікозидного фрагментів, а також залишків метиленактивних сполук. Слід зазначити, що метиленактивні сполуки (наприклад, похідні на основі 4-тіазолідинону та його аналоги, ацетилацетон,  $\beta$ -динітрили тощо) представляють значний інтерес в сучасній органічній та медичній хімії, зокрема, похідні 4-тіазолідинону є важливим джерелом у синтезі багатьох сполук, що проявляють протиракову, антимікробну, протівірусну, протизапальну та антитрипаносомну активність [28, 355]. Даний клас сполук окрім того є привабливим інструментом для синтезу різноманітних гетероциклічних систем, зокрема конденсованих тіазоло[4,5-*b*]піридинів та тіопірано[2,3-*d*]тіазолів [28, 29]. У сучасному промисловому виробництві представники метиленактивних сполук широко використовуються як пігменти, полімери та важливі реагенти в хімії координаційних сполук [524]. Як результат, метою даного фрагменту нашої роботи є спрямований синтез ароматичних гідрозсполук як потенційних біологічно активних молекул шляхом взаємодії



триазенів з 9,10-антрахіновим фрагментом і похідних на основі 4-тіазолідинону та їх структурних аналогів як метиленактивних сполук (Рис. 7.1).

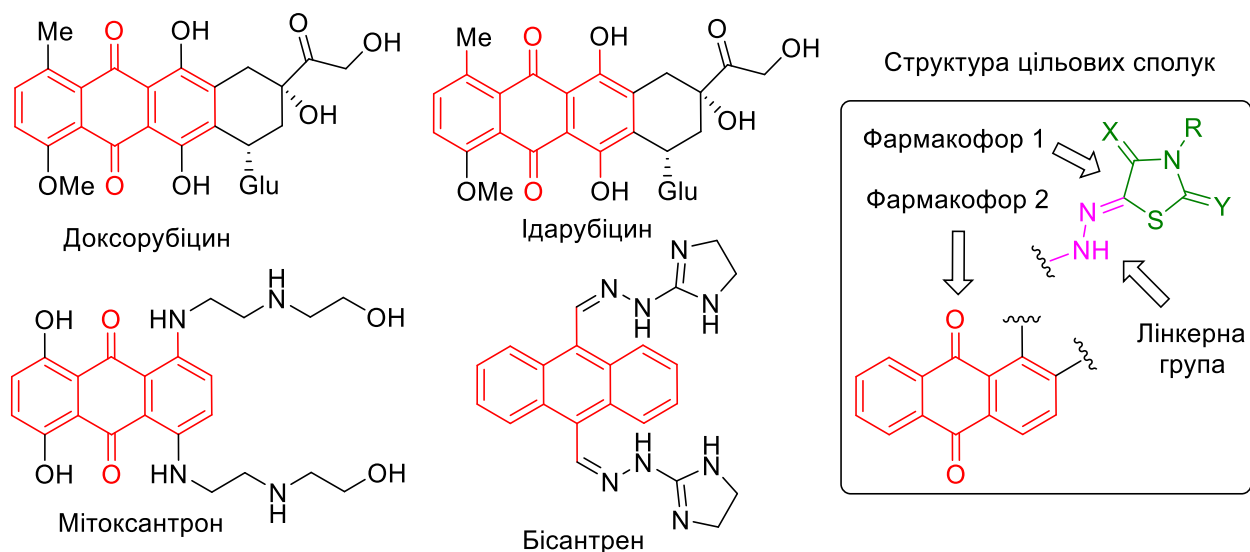


Рис 7.1. Обґрунтування дизайну цільових гідразино-антрахінонових кон'югатів похідних 4-тіазолідинону та його структурних аналогів.

7.1. Синтез антрахінонгідразонових кон'югатів на основі похідних 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук.

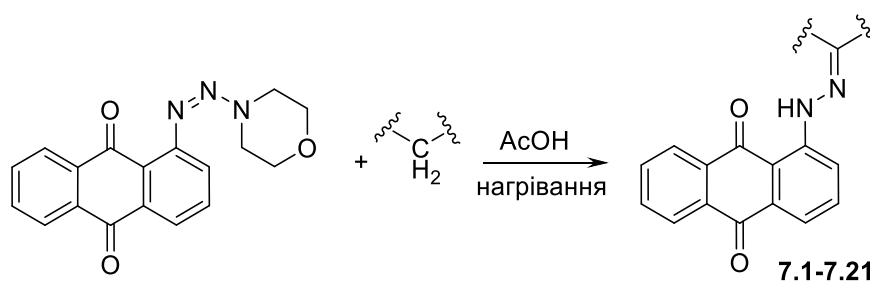
7.1.1. Синтез гібридних молекул на основі 1-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук.

Похідні алкілтріазену використовуються в фармацевтичній та клінічній практиці як високоефективні цитотоксичні препарати при хіміотерапії різних видів раку [525, 526]. З іншого боку похідні на основі 1(2)-аміно-9,10-антрахінону мають подібні властивості шляхом пригнічення росту пухлин внаслідок інтеркаляції ДНК, що ґрунтується на включенні площини фрагменту антрахінону між паралельними парами нуклеїнових кислот [527]. Класичним методом синтезу похідних тріазену є взаємодія солей діазонію з амінами [528].

У якості діазосполуки нами було апробовано 9,10-діоксо-9,10-дигідро-1-антраценедіазонію гідроген сульфат отриманий за відомою методикою шляхом діазотування 1-аміно-9,10-антрахінону натрію нітритом у середовищі сульфатної кислоти [529]. В якості азокомпоненту було використано серію високоосновних аліфатичних амінів: діетаноламін, діетиламін, морфолін, моноетаноламін, етилендіамін, а також  $\gamma$ -аміномасляна кислота. Слід зазначити, що при проведенні реакції з вторинними амінами (діетаноламін, діетиламін, морфолін) спостерігалось утворення цільових продуктів з високим виходом, тоді як взаємодія з первинними амінами в аналогічних умовах не призводила до утворення цільових сполук або спостерігався їх низький вихід, що ускладнював процес виділення.

Тріазенові похідні 9,10-антрахінону вводились у реакцію з різними метиленактивними сполуками з утворенням відповідних похідних гідразину **7.1-7.21** [530, 531]. Так, нами було використано похідне триазену на основі морфоліну як азокомпоненти, що було обумовлено високим виходом даної сполуки на стадії одержання у порівнянні з іншими тріазеновими конюгатами. У результаті нами проведено взаємодію кон'югату на основі морфолінтріазен-антрахінону з рядом метиленактивних сполук, зокрема, похідними тіазолідинону, гідантоїну, 1-(2-аміно-4-метил-1,3-тіазол-5-іл)-1-етаноном, 2(5*H*)-фураноном, 1,3-дигідроіндол-2-оном, 2-тіобарбітуровою кислотою, кислотою Мельдрума, малондинітрилом, ацетилацетоном та етилціаноацетатом (Схема 7.1). Зазначена реакція швидко і кількісно проходить в середовищі оцтової кислоти.

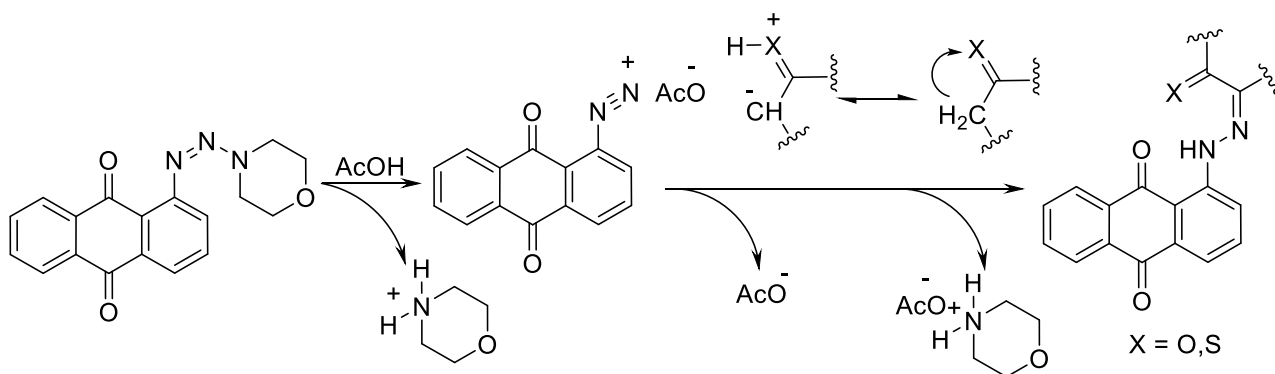
Схема 7.1



Встановлено, що взаємодія 1-(морфолінодіазеніл)-антрацен-9,10-діону з сполуками з активною метиленою групою відбувається із заміщенням амінного фрагменту на залишок СН-кислот з утворенням цільових арилгідразонів метиленактивних сполук **7.1-7.21**. Цікаво, що при взаємодії морфолінтриазен-антрахінону з малоновою кислотою відбувається декарбоксилювання однієї карбоксильної групи фрагменту малонової кислоти з утворенням похідного **7.18**.

На основі літературних даних [532], правдоподібний механізм утворення антрахінонгідразонів ґрунтується на проходженні кислотної деградації з утворенням електрофільного протонізованого морфоліну та аридїазонієвої солі, яка в подальшому піддається нуклеофільній атаці метиленактивними сполуками забезпечуючи утворення цільових похідних гідразину **7.1-7.21** (Схема 7.2). Варто відзначити, що за досліджуваних умов реакції заміщені триазени реагують подібним чином, як і солі діазонію з різними метиленактивними сполуками в умовах реакції азосполучення [533].

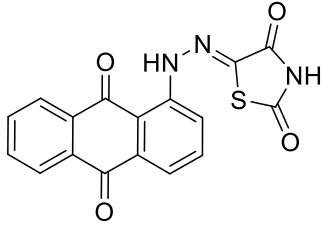
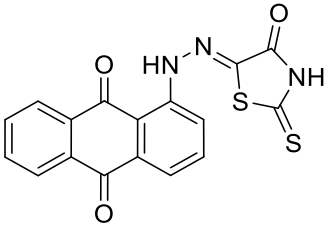
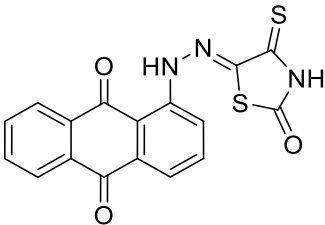
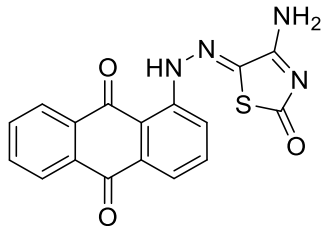
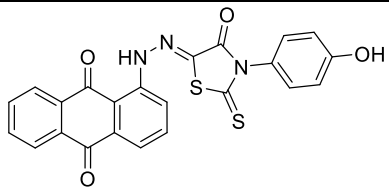
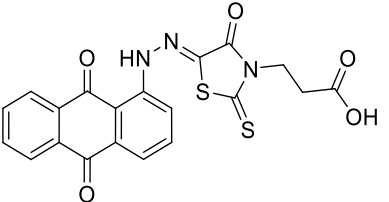
Схема 7.2

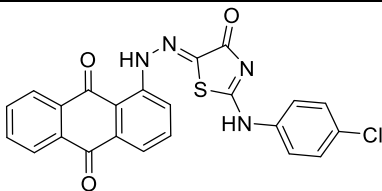
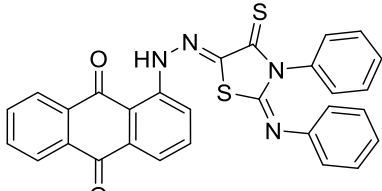
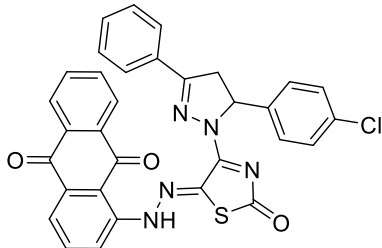
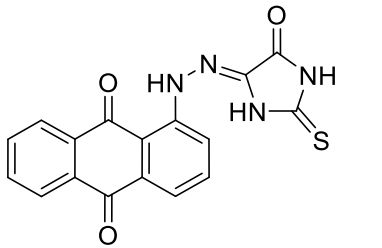
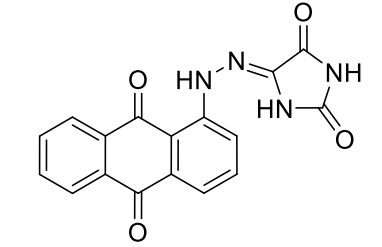
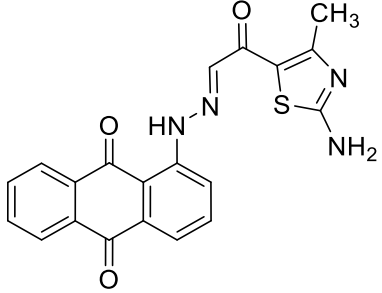
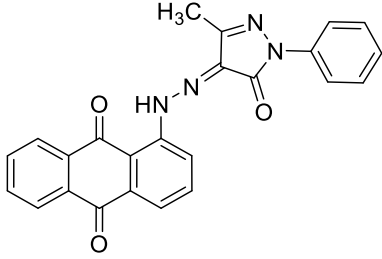


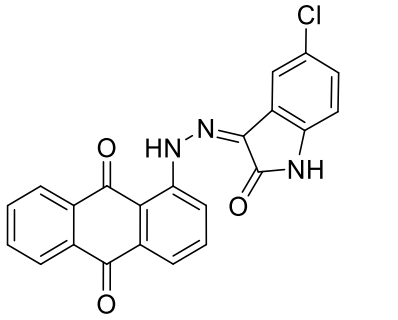
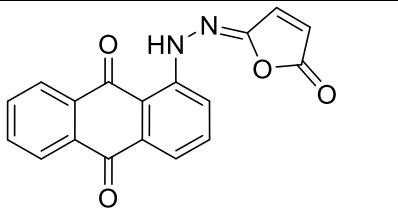
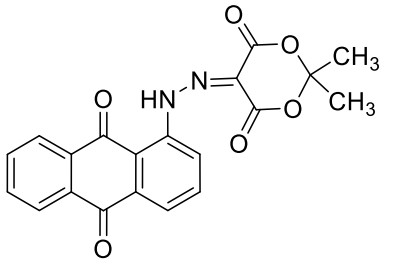
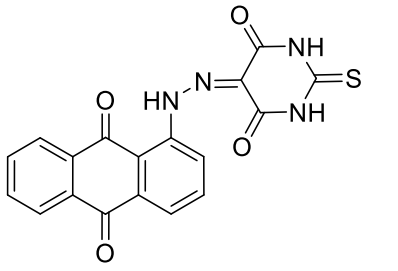
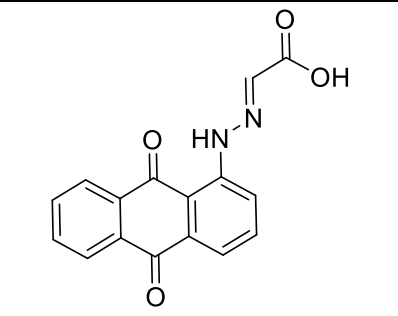
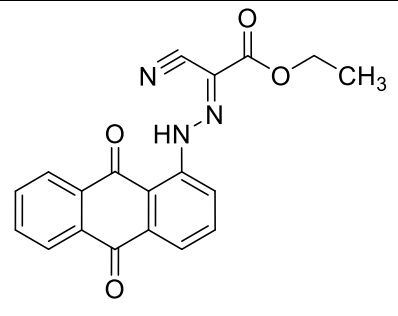
Синтезовані сполуки **7.1-7.21** – дрібнокристалічні порошки червоного, жовтого та коричневого кольорів, розчинні при нагріванні в ДМФА, нерозчинні у воді, оцтовій кислоті, спиртах та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 7.1.

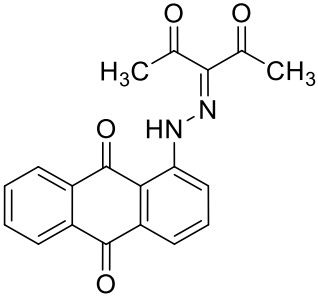
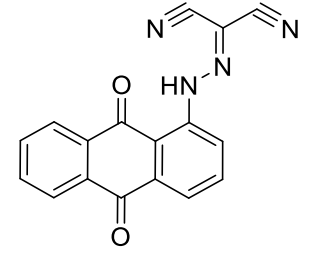
Таблиця 7.1

**Фізико-хімічні характеристики синтезованих гібридних молекул на основі  
1-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук**

Сполука	Структура	Вихід, %	T <sub>топл</sub> , °C	Брутто- формула	Вира- ховано, %	Знай- дено, %
7.1		87	305-307°	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	C, 58,12; H, 2,58; N, 11,96	C, 58,23; H, 2,47; N, 11,87
7.2		83	293-295	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	C, 55,58; H, 2,47; N, 11,44	C, 55,48; H, 2,40; N, 11,52
7.3		80	323-325	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	C, 55,58; H, 2,47; N, 11,44	C, 55,51; H, 2,44; N, 11,39
7.4		72	347-349	C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	C, 58,28; H, 2,88; N, 15,99	C, 55,41; H, 2,72; N, 15,87
7.5		74	303-305	C <sub>23</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	C, 60,12; H, 2,85; N, 9,14	C, 60,29; H, 2,75; N, 9,23
7.6		83	323-325	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	C, 54,66; H, 2,98; N, 9,56	C, 54,52; H, 2,87; N, 9,45

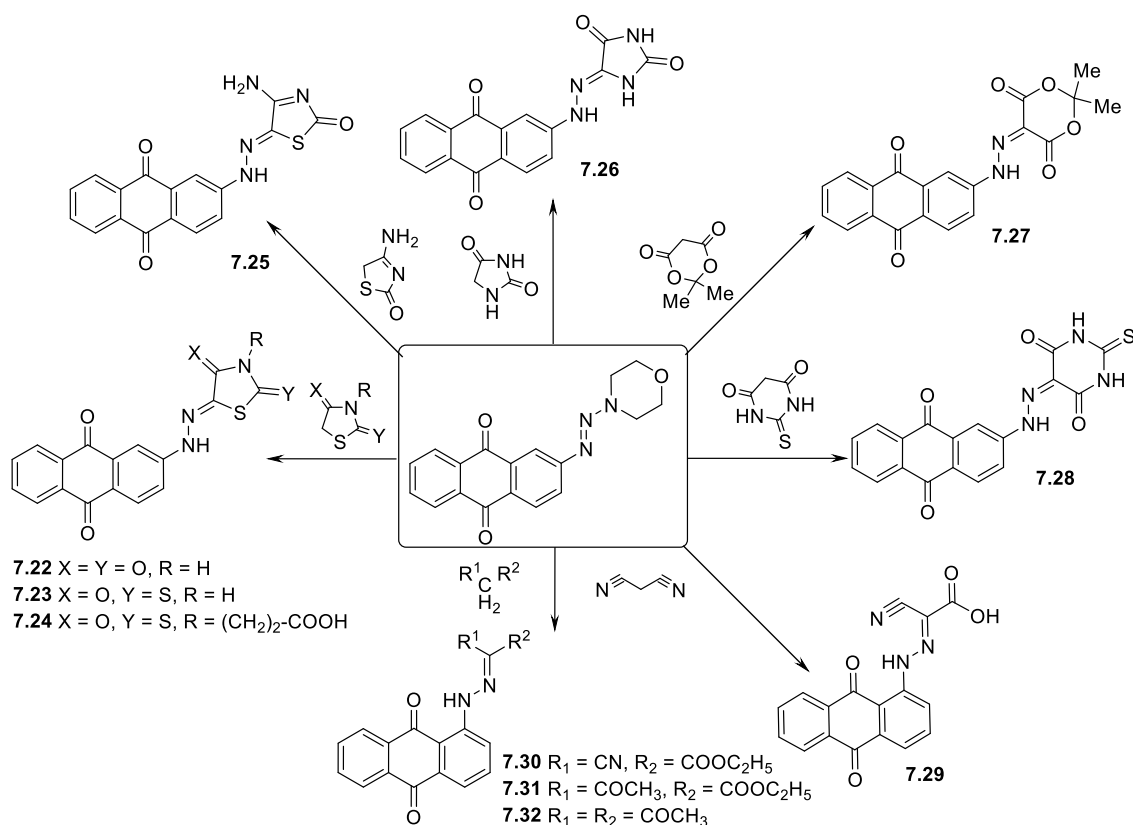
7.7		77	327-329	$C_{23}H_{13}ClN_4O_3S$	C, 59,94; H, 2,84; N, 12,16	C, 59,80; H, 2,71; N, 12,07
7.8		64	279-281	$C_{29}H_{18}N_4O_2S_2$	C, 67,93; H, 3,17; N, 8,80	C, 67,81; H, 3,09; N, 8,93
7.9		72	> 280	$C_{32}H_{20}ClN_5O_3S$	C, 65,14; H, 3,42; N, 11,87	C, 65,20; H, 3,35; N, 11,73
7.10		73	280-282	$C_{17}H_{10}N_4O_3S$	C, 58,28; H, 2,88; N, 15,99	C, 58,37; H, 2,75; N, 15,83
7.11		79	255-257	$C_{17}H_{10}N_4O_4$	C, 61,08; H, 3,02; N, 16,76	C, 61,14; H, 3,10; N, 16,88
7.12		62	192-194	$C_{20}H_{14}N_4O_3S$	C, 61,53; H, 3,61; N, 14,35	C, 61,40; H, 3,49; N, 14,22
7.13		68	241-243	$C_{24}H_{16}N_4O_3$	C, 70,58; H, 3,95; N, 13,72	C, 70,50; H, 3,89; N, 13,63

7.14		68	365-367	$C_{22}H_{12}ClN_3O_3$	C, 65,76; H, 3,01; N, 10,46	C, 65,61; H, 2,89; N, 10,33
7.15		61	255-257	$C_{18}H_{10}N_2O_4$	C, 67,93; H, 3,17; N, 8,80	C, 67,81; H, 3,09; N, 8,93
7.16		81	220-222	$C_{20}H_{14}N_2O_6$	C, 63,49; H, 3,73; N, 7,40	C, 63,57; H, 3,62; N, 7,53
7.17		90	>350	$C_{18}H_{10}N_4O_4S$	C, 57,14; H, 2,66; N, 14,81	C, 57,27; H, 2,52; N, 14,73
7.18		81	233-235	$C_{16}H_{10}N_2O_4$	C, 65,31; H, 3,43; N, 9,52	C, 65,19; H, 3,55; N, 9,41
7.19		89	265-267	$C_{19}H_{13}N_3O_4$	C, 65,70; H, 3,77; N, 12,10	C, 65,58; H, 3,65; N, 12,23

7.20		87	271-273	$C_{19}H_{14}N_2O_4$	C, 68,26; H, 4,22; N, 8,38	C, 68,40; H, 4,51; N, 8,29
7.21		87	269-271	$C_{17}H_8N_4O_2$	C, 68,00; H, 2,69; N, 18,66	C, 68,15; H, 2,57; N, 18,55

7.1.2. Синтез гібридних молекул на основі 2-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук.

Продовжуючи вивчення антрахінонгідразонових кон'югатів на основі 4-тіазолідинону та його структурних аналогів нами було апробовано взаємодію ізомерного 2-(морфолінодіазеніл)-антрацен-9,10-діону зі сполуками з активною метиленою групою з одержанням похідних **7.22-7.32** (Схема 7.3) [534, 535]. Реакцію проводять у середовищі оцтової кислоти та у випадку синтезу сполук **7.22**, **7.25** та **7.26** за використання тіазолідин-2,4-діону, 4-аміно-2-оксо-2H-тіазолу та імідазолідин-2,4-діону, які володіють слабкою СН кислотністю метиленої групи, додають каталітичну кількість ацетату натрію як основного каталізатора для кращого депротонування активної метиленої групи. Варто відзначити, що взаємодія морфолінітріазен-антрахінону з малондинітрилом за аналогічних реакційних умов супроводжується гідролізом нітрильної групи до карбоксильної з утворенням похідного **7.29**.



Синтезовані сполуки **7.22-7.32** – дрібнокристалічні порошки червоного, жовтого та коричневого кольорів, розчинні при нагріванні в ДМФА, нерозчинні у воді, оцтовій кислоті, спиртах та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 7.2.

Таблиця 7.2

### Фізико-хімічні характеристики синтезованих гібридних молекул на основі 2-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °C	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>7.22</b>	72	154-156	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	58,12	2,58	11,96	58,28	2,40	11,83
<b>7.23</b>	68	152-154	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	55,58	2,47	11,44	55,70	2,38	11,32
<b>7.24</b>	78	154-156	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	54,66	2,98	9,56	54,78	3,11	9,40
<b>7.25</b>	83	>240	C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	58,28	2,88	15,99	55,11	3,02	16,14
<b>7.26</b>	69	>240	C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	61,08	3,02	16,76	61,21	2,82	16,54
<b>7.27</b>	82	>240	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	63,49	3,73	7,40	63,61	3,52	7,54
<b>7.28</b>	84	>240	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	57,14	2,66	14,81	57,31	2,52	15,00
<b>7.29</b>	77	>240	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	63,95	2,84	13,16	63,81	2,99	13,30
<b>7.30</b>	70	158-160	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	65,70	3,77	12,10	65,87	3,98	11,99
<b>7.31</b>	72	160-162	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65,93	4,43	7,69	66,07	4,68	7,89
<b>7.32</b>	68	150-152	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	68,26	4,22	8,38	68,04	4,11	8,58



## 7.2. Спектральні характеристики синтезованих сполук.

Структура синтезованих антрахінонгідразонових кон'югатів на основі похідних 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук підтверджена елементним аналізом, методами  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії, мас-спектрометрії, а також ІЧ-спектроскопією. Спектральні характеристики сполук наведені у таблицях 7.3, 7.4.

Таблиця 7.3

## Спектральні характеристики синтезованих похідних на основі 1-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук

	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц); ІЧ (KBr), $\text{cm}^{-1}$	LC-MS, $m/z$
7.1	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,59 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,70 (т, 2H, $J = 7,2$ Гц, аром.) 7,86 (т, 1H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 8,00 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 8,24 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 10,88 (с, 1H, NH), 12,32 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 107,4, 114,2, 118,1, 122,7, 130,2, 130,4, 131,9, 134,8, 135,1, 136,2, 137,9, 147,6, 152,5, 158,7, 162,1, 181,5, 189,3. ІЧ (KBr): 3178 (NH), 3069, 1759 (C=O), 1729, 1668, 1633, 1587 (C=N)	352 (M+H) <sup>+</sup>
7.2	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,87-7,94 (м, 2H, аром.), 7,70 (т, 2H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 8,01 (т, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 8,17 (д, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 8,25 (д, 1H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 11,11 (с, 1H, NH), 12,35 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 111,3, 115,7, 117,8, 120,1, 121,5, 125,6, 128,0, 129,7, 132,1, 135,1, 139,1, 148,7, 160,7, 177,1, 183,0, 189,1, 193,3. ІЧ (KBr): 3255 (NH), 1739 (C=O), 1660, 1628, 1573 (C=N)	368 (M+H) <sup>+</sup>
7.3	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,59 (д, 1H, $J = 7,0$ Гц, аром.), 7,70 (т, 2H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,86 (т, 1H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 8,0 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 8,17 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 10,88 (с, 1H, NH), 12,32 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 109,5, 116,7, 120,1, 127,9, 129,1, 130,5, 134,1, 137,5, 139,5, 148,4, 152,5, 155,2, 161,9, 167,1, 179,3, 193,5, 194,9. ІЧ (KBr): 3213 (NH), 1733 (C=O), 1667, 1633, 1585 (C=N)	368 (M+H) <sup>+</sup>
7.4	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,84-7,95 (м, 3H, аром.), 8,20 (т, 1H, $J = 7,7$ Гц, аром.) 8,29 (д, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 8,51 (д, 1H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 9,60 (с, 2H, NH <sub>2</sub> ), 9,60 (с, 1H, NH), 12,17 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 112,6, 114,9, 119,3, 121,9, 124,3, 127,2, 127,3, 128,4, 130,7, 130,7, 134,4, 140,6, 146,9, 152,0, 169,3, 184,9, 187,6. ІЧ (KBr): 3377 (NH <sub>2</sub> ), 2971 (NH), 1729 (C=O), 1668, 1645, 1631 (C=N) $\text{cm}^{-1}$	351 (M+H) <sup>+</sup>
7.5	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 6,90 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,21 (д, 2H, $J = 8,7$ Гц, аром.), 7,91-7,96 (м, 3H, аром.), 8,10 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 8,20 (д, 2H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 8,31 (д, 1H, $J = 7,0$ Гц, аром.), 9,92 (с, 1H, OH), 12,61 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ NMR: 103,1, 103,6, 115,5, 116,3, 121,4, 122,4, 126,4, 128,2, 129,5, 130,2, 131,6, 135,2, 137,0, 139,2, 141,3, 148,7, 161,0, 165,0, 182,0, 182,5, 187,5. ІЧ (KBr): 3285 (NH), 1744 (C=O), 1652, 1623, 1597 (C=N)	460 (M+H) <sup>+</sup>
7.6	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,68 (т, 2H, $J = 7,2$ Гц, CH <sub>2</sub> ), 4,27 (т, 2H, $J = 7,2$ Гц, CH <sub>2</sub> ), 7,87 (т, 1H, $J = 8,3$ Гц, аром.), 7,90-7,93 (м, 2H, аром.), 8,00 (д, 2H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 8,16 (д, 1H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 8,22 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 12,52 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 31,2, 33,4, 109,8, 112,3, 119,3, 120,3, 121,1, 122,4, 127,4, 131,5, 132,8, 133,8, 135,2, 144,9, 150,3, 157,7, 172,1, 183,6, 187,5, 196,2. ІЧ (KBr): 3367 (NH), 1716 (C=O), 1666, 1630, 1587 (C=N)	440 (M+H) <sup>+</sup>
7.7	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,47-7,56 (м, 2H, аром.), 7,85 (т, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,94-7,99 (м, 2H, аром.), 8,04 (д, 2H, $J = 8,3$ Гц, аром.), 8,19 (д, 2H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 8,25-8,31 (м, 2H, аром.), 11,09 (с, 1H, NH), 12,20 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ NMR: 103,5, 116,6, 116,9, 119,3, 122,4, 124,1, 125,8, 126,7, 127,3, 128,8, 130,4, 133,7, 136,2, 136,9, 138,8, 140,0, 143,9, 149,0, 162,8, 184,0, 185,7. ІЧ (KBr): 3205 (NH), 3066, 1719 (C=O), 1667, 1633, 1593 (C=N)	460/462 (M+H) <sup>+</sup>

## Продовження табл. 7.3.

	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц); ІЧ (KBr), $\text{cm}^{-1}$	LC-MS, $m/z$
<b>7.8</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,04 (д, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,28 (т, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,49 (т, 2H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,53-7,65 (м, 5H, аром.), 7,84-7,95 (м, 4H, аром.), 8,06 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 8,15 (д, 2H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 12,48 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 108,9, 113,1, 116,9, 119,3, 120,8, 122,7, 124,9, 126,1, 127,1, 128,1, 129,2, 129,6, 129,9, 130,2, 132,8, 133,8, 135,1, 136,8, 144,5, 146,4, 148,8, 148,9, 161,0, 179,7, 180,1. IR (KBr): 3058 (NH), 1732 (C=O), 1633, 1587 (C=N), 1564	519 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.9</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 3,35 (м, 1H, CH <sub>2</sub> ), 4,04 (м, 1H, CH <sub>2</sub> ), 6,01 (м, 1H, CH), 7,35 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,44 (д, 2H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 7,63-7,66 (м, 2H, аром.), 7,88-7,97 (м, 5H, аром.), 8,00-8,05 (м, 2H, аром.), 8,17-8,21 (м, 2H, аром.), 8,35 (м, 1H, аром.), 10,39 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 51,7 (CH <sub>2</sub> ), 66,3 (CH), 122,1, 127,8, 128,1, 128,9, 130,5, 133,6, 135,7, 136,0, 136,7, 139,7, 140,9, 141,2 (C=N), 154,4, 163,6, 170,9 (C=O), 184,6 (C=O), 187,1 (C=O)	589/591 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.10</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,82 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 7,89 (т, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 8,01 (д, 2H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 8,18-8,26 (м, 3H, аром.), 9,46 (с, 1H, NH), 9,85 (с, 1H, NH), 12,20 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 115,4, 124,5, 125,6, 129,4, 133,3, 133,8, 133,9, 134,3, 135,7, 136,6, 137,3, 137,9, 145,5 (C=N), 155,6 (C=O), 179,3 (C=O), 182,9 (C=O), 184,9 (C=S)	351 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.11</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,59 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,83 (т, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,89-7,95 (м 5H, аром.), 9,31 (с, 1H, NH), 10,30 (с, 1H, NH), 12,06 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 111,5, 119,2, 120,7, 122,9, 123,0, 126,7, 127,2, 129,2, 131,3, 133,8, 135,0, 142,5 (C=N), 165,0 (C=O), 174,3 (C=O), 178,3 (C=O), 180,9 (C=O)	335 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.12</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,91 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,75 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,94 (т, 1H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,95 (с, 1H, CH), 8,15 (т, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 8,22 (с, 2H, NH <sub>2</sub> ), 8,33-8,38 (м, 3H, аром.), 11,97 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 27,6, 116,3, 117,0, 119,4, 121,4, 125,0, 126,9, 127,3, 127,4, 130,9, 133,5, 135,1, 135,9, 139,6, 149,7, 163,2, 168,6, 174,9, 185,7, 186,5. ІЧ (KBr): 3384 (NH <sub>2</sub> ), 2980 (NH), 1868 (C=O), 1675, 1634, 1591 (C=N)	391 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.13</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,36 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,50 (т, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,92-7,99 (м, 5H, аром.), 8,05 (дд, 1H, $J = 1,2,7,5$ Гц, аром.), 8,19 (д, 1H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 8,29 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 8,45 (д, 1H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 10,19 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 11,7 (CH <sub>3</sub> ), 117,8, 120,7, 123,2, 125,0, 126,5, 127,0, 129,0, 131,6, 132,3, 134,0, 134,6, 134,8, 135,7, 137,7, 143,5 (C=N), 148,7, 158,5 (C=O), 182,0 (C=O), 185,1 (C=O)	409 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.14</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 6,90 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,29 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,64 (с, 1H, аром.), 7,86-7,95 (м, 4H, аром.), 8,15 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 8,22 (д, 1H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 8,50 (т, 1H, $J = 7,0$ Гц, аром.), 11,14 (с, 1H, NH), 14,93 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 117,3, 118,1, 121,2, 121,6, 126,2, 127,0, 127,8, 127,9, 128,4, 129,4, 131,4, 131,9, 133,2, 133,8, 133,9, 134,1, 134,3, 141,4, 154,2, 170,4, 184,6, 187,5. ІЧ (KBr): 3190 (NH), 3070, 1706 (C=O), 1672, 1640, 1620 (C=N)	400/402 (M+H) <sup>+</sup>

## Закінчення табл. 7.3.

	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
<b>7.15</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,76 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 7,92-7,95 (м, 3H, 2CH, аром.), 8,02 (д, 1H, $J = 8,0$ Гц, аром.), 8,17 (т, 2H, $J = 7,1$ Гц, аром.), 8,26 (д, 2H, $J = 8,1$ Гц, аром.), 12,69 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ NMR: 112,3, 115,4, 117,8, 122,0, 124,0, 126,5, 127,6, 129,9, 133,4, 134,5, 135,6, 137,0, 139,3, 144,7, 158,7, 163,3, 180,7, 180,7. ІЧ (KBr): 3188 (NH), 1760 (C=O), 1658, 1629, 1573 (C=N)	319 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.16</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,65 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2,66 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,48 (д, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,55 (т, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,64-7,68 (м, 2H, аром.), 7,86 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 7,90 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц, аром.), 12,36 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 30,7 (CH <sub>3</sub> ), 35,7 (CH <sub>3</sub> ), 113,9, 119,6, 120,3, 126,4, 126,6, 132,3, 133,6, 133,9, 134,2, 134,6, 135,6, 146,0 (C=N), 164,6 (C=O), 182,1 (C=O), 184,9 (C=O)	379 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.17</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,94 (м, 2H, аром.), 8,01 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 8,11 (м, 2H, аром.), 8,47 (м, 2H, аром.), 12,45 (с, 1H, NH), 12,60 (с, 1H, NH), 14,10 (с, 1H, NH)	-
<b>7.18</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,72-7,75 (м, 2H, аром., CH), 7,81 (т, 1H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 7,90 (т, 2H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 8,10-8,18 (м, 3H, аром.), 12,62 (с, 1H, NH), 12,82 (шс, 1H, COOH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 114,5, 120,1, 120,8, 126,9, 127,1, 132,8, 134,1, 134,1, 134,3, 134,7, 135,1, 136,1, 146,6, 165,1, 182,7, 185,5. ІЧ (KBr): 3077 (NH), 1684 (C=O), 1666, 1638 (C=N)	367 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.19</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,34 (т, 3H, CH <sub>3</sub> , $J = 7,1$ Гц), 4,36 (кв, 2H, CH <sub>2</sub> , $J = 7,1$ Гц), 7,95-7,99 (м, 2H, аром.), 8,02 (т, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 8,10 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 8,21 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 13,72 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 10,9, 33,4, 110,8, 112,1, 115,3, 116,8, 118,1, 121,1, 123,3, 132,8, 132,9, 133,2, 134,4, 135,3, 136,2, 144,5, 167,5, 196,5, 196,8. ІЧ (KBr): 3097 (NH), 2230 (C $\equiv$ N), 1734 (C=O), 1668, 1639, 1586 (C=N)	349 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.20</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,33 (с, 6H, 2*CH <sub>3</sub> ), 7,93-8,05 (м, 3H, аром.), 8,22 (д, 2H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 8,29 (т, 2H, $J = 7,3$ Гц, аром.), 13,54 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 30,2, 113,4, 119,3, 119,7, 123,5, 125,0, 126,7, 127,8, 129,0, 130,8, 132,3, 133,5, 134,3, 155,7, 172,8, 177,5, 180,9, 187,3. ІЧ (KBr): 3326 (NH), 1673 (C=O), 1665, 1652, 1583 (C=N)	335 (M+H) <sup>+</sup>
<b>7.21</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,92-8,01 (м, 3H, аром.), 8,07 (д, 1H, $J = 7,0$ Гц, аром.), 8,12 (д, 1H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 8,20 (д, 2H, $J = 7,5$ Гц, аром.), 14,10 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: 93,8, 108,4, 109,2, 113,8, 114,1, 117,9, 123,8, 124,3, 127,7, 130,7, 131,6, 133,5, 135,4, 137,4, 160,0, 179,4, 180,2. ІЧ (KBr): 3104 (NH), 2236 (C $\equiv$ N), 2214, 1673 (C=O), 1639, 1585 (C=N)	301 (M+H) <sup>+</sup>

Таблиця 7.4

## Спектральні характеристики гібридних молекул на основі 2-антрахінонгідразону та метиленактивних сполук

	Спектр $^1\text{H}$ ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц); ІЧ (KBr), $\text{cm}^{-1}$	LC-MS, $m/z$
7.22	7,86-7,90 (м, 3H, аром.), 8,07-8,14 (м, 4H, аром.), 8,35 (с, 1H, NH), 12,00 (с, 1H, NH)	-
7.23	7,60 (м, 1H, аром.), 7,86 (м, 2H, аром.), 8,03 (с, 1H, аром.), 8,12 (м, 2H, аром.), 8,23 (м, 1H, аром.), 10,98 (с, 1H, NH), 12,93 (с, 1H, NH)	-
7.24	2,48 (м, 2H, $\text{CH}_2$ ), 3,29 (м, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7,89-7,91 (м, 2H, аром.), 7,90-7,93 (м, 2H, аром.), 8,08 (д, 1H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 8,13-8,17 (м, 2H, аром.), 8,20 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 9,31 (с, 1H, NH)	-
7.25	7,61 (д, 1H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,87 (м, 2H, аром.) 7,93 (с, 1H, аром.), 8,12-8,14 (м, 3H, аром.), 9,29 (с, 2H, $\text{NH}_2$ ), 10,81 (с, 1H, NH).	-
7.26	7,85-7,90 (м, 3H, аром.), 7,91 (д, 1H, $J = 8,9$ Гц, аром.), 8,10-8,20 (м, 3H, аром.), 8,32 (с, 1H, NH), 8,81 (с, 1H, NH), 10,54 (с, 1H, NH)	-
7.27	2,39 (с, 6H, $2^*\text{CH}_3$ ), 7,80-7,95 (м, 5H, аром), 8,23 (д, 2H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 10,18 (с, 1H, NH)	-
7.28	7,93-7,95 (м, 2H, аром.), 8,08 (дд, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Гц, аром.), 8,21-8,23 (м, 2H, аром.), 8,28 д, 1H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 8,37 (с, 1H, аром.), 12,55 (с, 1H, NH), 12,70 (с, 1H, NH), 14,13 (с, 1H, NH)	-
7.29	7,89-7,91 (м, 2H, аром.), 8,03 (с, 1H, аром.), 8,13 (д, 1H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 8,17-8,20 (м, 2H, аром.), 8,22 (д, 1H, $J = 8,6$ Гц, аром.), 12,20 (с, 1H, NH), 14,00 (с, 1H, $\text{COOH}$ ).	319 ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup>
7.30	1,33 (т, 3H, $J = 7,1$ Гц, $\text{CH}_3$ ), 4,33 (кв, 2H, $J = 7,3$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 7,90-7,91 (м, 3H, аром.), 8,18-8,20 (м, 3H, аром.), 8,34 (с, 1H, аром.), 9,46 (с, 1H, NH)	-
7.31	1,31 (т, 3H, $J = 7,0$ Гц, $\text{CH}_3$ ), 2,41 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,37 (кв, 2H, $J = 7,0$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 7,71 (д, 1H, $J = 8,1$ Гц, аром.), 7,85-7,86 (м, 2H, аром.), 7,93 (с, 1H, аром.), 8,07-8,10 (м, 3H, аром.), 11,63 (с, 1H, NH)	-
7.32	2,48 (с, 6H, $2^*\text{CH}_3$ ), 7,82 (д, 1H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,90-7,92 (м, 2H, аром.), 8,07 (с, 1H, аром.), 8,19-8,20 (м, 4H, NH, аром.)	335 ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup>

Так, у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР синтезованих сполук сигнали протону NH арилгідразонової групи спостерігались у ділянці 9,31-14,93 м.ч. Варто відзначити, що широкий діапазон хімічного зсуву протону NH групи є викликаний внутрішньомолекулярним водневим зв'язком (Resonance Assisted Hydrogen Bond (РАНВ)), що зумовлює активацію вуглецю у  $\alpha$  положенні карбонільної групи, регіоселективну активацію тіолів, тіокетонів [524] та динітрилів [536]. Характерні ароматичні протони антрахінонового фрагменту синтезованих сполук проявляються сигналами в межах 6,90-8,51 м.ч. У спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР синтезованих сполук спостерігаються характерні сигнали Карбону карбонільної групи (C=O) антрахінонового циклу у ділянці 179,43–196,76 м.ч. та сигнали азометинового вуглецю функціоналізованих арилгідразонів метиленових активних сполук в межах 144,46–161,91 м.ч. Важливо відзначити, що дещо по-іншому від інших метиленактивних сполук проходить взаємодія маленової кислоти та малонодинітрилу з 1(2)-(морфолінодіазеніл)-антрацен-9,10-діоном. Так, у випадку маленової кислоти одержано продукт реакції азосполучення, який піддався подальшому декарбоксілюванню з утворенням сполуки **7.18**. Для одержаного продукту спостерігається утворення молекулярного іону 295 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, а у спектрі ЯМР ідентифіковано сигнал протону іліденового фрагменту (=CH) у ділянці 7,72-7,75 м.ч. При дослідженні взаємодії малонодинітрилу з 2-(морфолінодіазеніл)-антрацен-9,10-діоном встановлено, що паралельно з утворенням цільового арилгідразону відбувається гідроліз нітрильної групи до карбоксильної з утворенням похідного **7.29**, що підтверджується у спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР появою сигналу карбоксильної групи у вигляді широкого синглету при 14,00 м.ч, а також утворенням молекулярного іону 319 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> у хромато-мас спектрі.

Приклад  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектрів 1-[N<sup>2</sup>-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліден)гідразино]антрахінону **7.2** представлено на рис. 7.2.

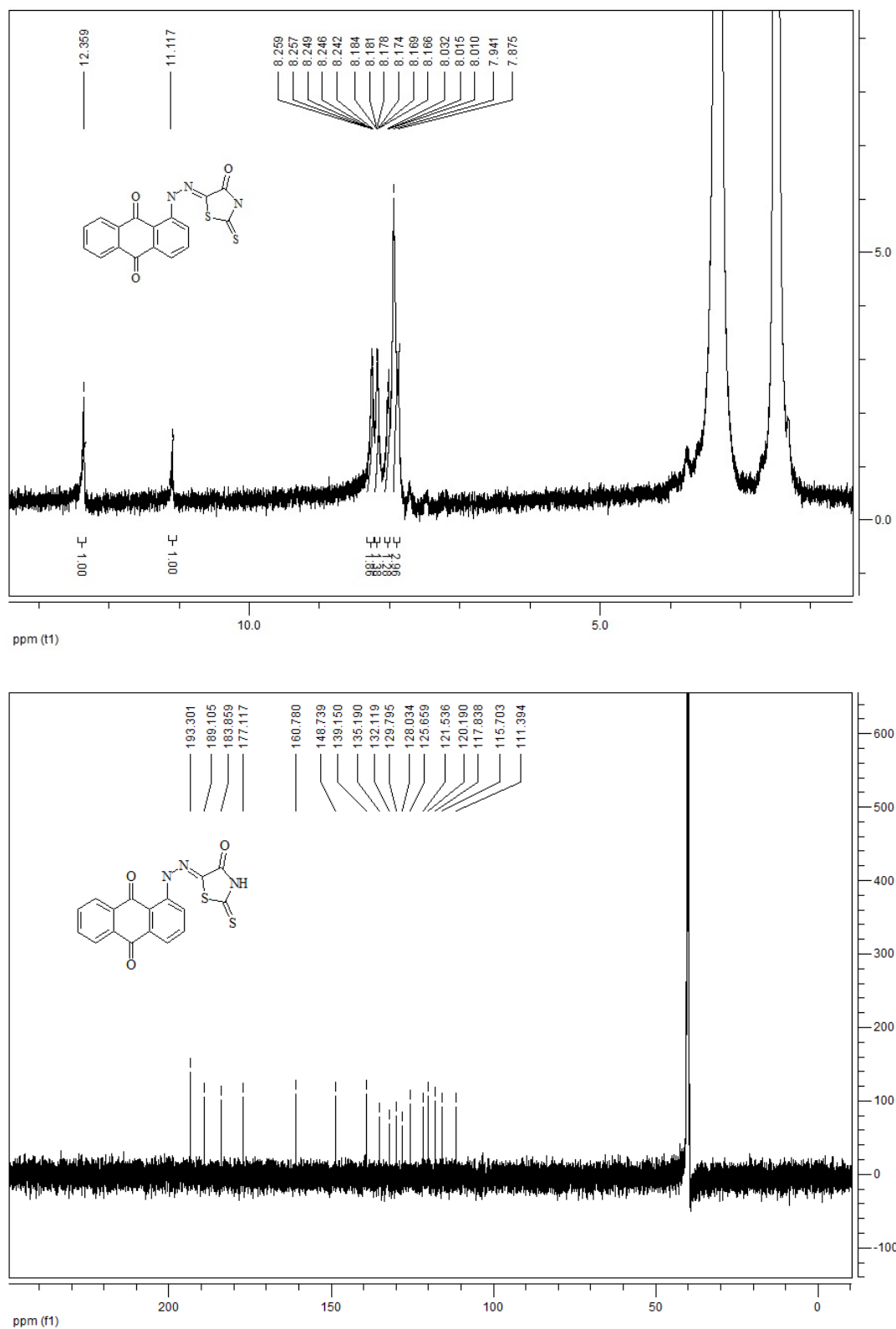


Рис. 7.2. Спектр  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР 1-[N'-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-ілден)гідразино]антрахінону **7.3**.

7.3. Біологічна активність антрахінонгідразонових кон'югатів на основі 4-тіазолідинону та його структурних аналогів.

7.3.1. Дослідження протипухлинної активності синтезованих сполук в рамках програми DTP NCI.

На першому етапі згідно стандартного протоколу програми Національного інституту раку США Developmental Therapeutic Program (DTP NCI) протипухлинну активність синтезованих сполук *in vitro* вивчали на 60 лініях клітин у концентрації  $10^{-5}$  моль/л. [233-236]. Кількісним критерієм активності гідразино-антрахінонових конюгатів був розрахований відсоток росту клітин ліній раку (GR, %) у порівнянні з контролем. Для скринінгу протипухлинної активності було протестовано сполуки **7.1-7.5, 7.7, 7.11, 7.13, 7.14, 7.16, 7.17** та **7.19-7.21, 7.26, 7.27**. Результати первинного скринінгу у концентрації  $10^{-5}$  моль/л наведені у таблиці 7.5 та додатках Д1-Д18.

Таблиця 7.5

**Сумарні результати прескринінгу протипухлинної активності антрахінонгідразонових кон'югатів на основі похідних 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук на 60 лініях клітин (концентрація  $10^{-5}$ М)**

\	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>7.1**</b>	98,79	84,71÷113,81	UACC-257, меланома / 84,74
<b>7.2**</b>	97,03	77,97÷113,00	CCF-CEM, лейкемія / 77,97 MOLT-4, лейкемія / 78,60
<b>7.3**</b>	97,42	72,04÷137,95	MCF7, рак молочної залози / 72,04
<b>7.4**</b>	96,99	80,72÷108,15	CCF-CEM, лейкемія / 80,72
<b>7.5</b>	62,94	13,25÷118,23	HOP-62, недрібноклітинний рак легень / 33,05 NCI-H226, недрібноклітинний рак легень / 32,33



			NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / 13,25 HCT-116, рак прямої кишки / 13,69 HCT-15, рак прямої кишки / 33,06 HT-29, рак прямої кишки / 32,98 SW-620, рак прямої кишки / 33,30 PC-3, рак простати / 36,47 DU-145, рак простати / 34,12 MCF7, рак молочної залози / 35,05 MDA-MB-468, рак молочної залози / 33,42
<b>7.7**</b>	100,26	80,22÷119,95	CCRF-CEM, лейкемія / 80,22
<b>7.10</b>	19,42	-67,70÷58,89	CCRF-CEM, лейкемія / 14,13 HL-60 (ТВ), лейкемія / -32,13 K-562, лейкемія / 9,57 MOLT-4, лейкемія / 16,01 RPMI-8226, лейкемія / -2,62 HOP-92, недрібноклітинний рак легень / 19,85 NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / 7,32 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -6,34 COLO 205, рак прямої кишки / -19,03 HT29, рак прямої кишки / 9,93 KM12, рак прямої кишки / 17,02 SW-620, рак прямої кишки / 18,01 SF-295, рак ЦНС / 7,45 SF-539, рак ЦНС / -32,34 SNB-75, рак ЦНС / -20,21 U251, рак ЦНС / 12,76

			M14, меланома / -15,77 MDA-MB-435, меланома / -67,70 SK-MEL-5, меланома / 13,79 OVCAR-3, рак яйників / 1,75 A498, рак нирок / -6,10 RXF 393, рак нирок / -22,41 DU-145, рак простати / 16,32 MCF7, рак молочної залози / 18,73 HS 578T, рак молочної залози / 5,86 MDA-MB-468, рак молочної залози / -4,90
<b>7.11**</b>	99,95	72,97÷120,30	MCF7, рак молочної залози / 72,97
<b>7.13**</b>	100,05	71,68÷127,44	HS 578T, рак молочної залози / 71,68
<b>7.14**</b>	100,83	71,85÷150,90	IGROV1, рак яйників / 71,85
<b>7.16**</b>	85,51	52,52÷108,96	SNB-75, рак ЦНС / 52,52
<b>7.17**</b>	105,48	79,72÷133,27	NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 79,72
<b>7.19**</b>	99,53	66,91÷114,89	HCT-116, рак прямої кишки / 66,91
<b>7.20**</b>	102,88	84,93÷125,48	HCT-116, рак прямої кишки / 84,93
<b>7.21**</b>	98,54	68,10÷118,65	HCT-116, рак прямої кишки / 68,10
<b>7.22**</b>	106,97	88,10÷149,55	MCF7, рак молочної залози / 88,10
<b>7.26**</b>	107,49	83,92÷143,17	SAKI-1, рак нирок / 83,92
<b>7.27**</b>	93,79	59,56÷127,66	HOP-62, лейкемія / 59,56
<b>7.32</b>	87,53	49,14÷113,91	UO-31, рак нирок / 49,14

\* Для окремих ліній наведені дані з GP% ≤ 50%.

\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результат мітотичної активності однієї найбільш чутливої лінії

За результатами скринінгу гідразино-антрахінонові конюгати виявили протипухлинну активність різного ступеня із діапазоном значень відсотків росту клітин в межах -67,70-150,90%. Так, серед досліджуваних сполук можна виділити похідне антрахінонгідразону з фрагментом 4-тіазолідинону **7.5** з помітним рівнем протипухлинної активності. Сполука **7.5** характеризувалася активністю відносно ліній недрібноклітинного раку легень (HOP-62, GP = 33,05%; NCI-H226, GP = 32,33 %; NCI-H460, GP = 13,25%), раку прямої кишки (HCT-116, GP = 13,69%; HCT-15, GP = 33,06 %; HT-29, GP = 32,98 %; SW-620, GP = 33,30 %), раку простати (PC-3, GP = 36,47%; DU-145, GP = 34,12%) та ліній раку молочної залози (MCF7, GP = 35,05 %; MDA-MB-468, GP = 33,42 %). Варто відзначити, що сполука **7.5** відносяться до групи молекул, які поєднують у своїй структурі декілька фармакофорних фрагментів, зокрема функціонально-заміщене похідне 4-тіазолідинону, а саме 3-фенілроданін та фрагмент антрахінону що, правдоподібно, може свідчити про групову протиракову активність зазначеного класу сполук. Зокрема серед похідних з фрагментом 3-феніл-2-тіоксо-1,3-тіазолідин-4-ону як потенційних протипухлинних агентів було ідентифіковано ряд потужних інгібіторів сфінгозинкінази (SK) [537] та JNK-стимулюючої фосфатази-1 (JSP-1) [186] (рис 7.3).

Проведення SAR-аналізу для поліфункціональних 1-гідразиноантрахінонів показало, що рівень протипухлинної активності у значній мірі залежав від структури фрагменту метиленактивних сполук. Окрім того, у випадку використання різних похідних тіазолідинону як метиленактивних сполук рівень протипухлинної активності суттєво залежав від замісників у положеннях C2, C4 та N-3 базового гетероциклу. Цікаво, що наявність роданінового фрагменту значно покращувала антипроліферативну активність порівняно з іншими похідними на основі 4-тіазолідинону, а також функціоналізованими фрагментами аліциклічних та більшості гетероциклічних метиленактивних сполук. Варто зазначити, що ізомерні похідні 2-гідразиноантрахінону з фрагментами метиленактивних сполук, а саме похідні

7.22, 7.26, 7.27 та 7.32 проявили слабку протиракову активність, а загалом невелика кількість сполук з даного класу, які були відібрані в рамках DTP NCI, не дозволила провести чіткий SAR-аналіз з метою ідентифікації тих молекулярних фрагментів, які можуть бути сприятливими на прояв антипроліферативного ефекту.

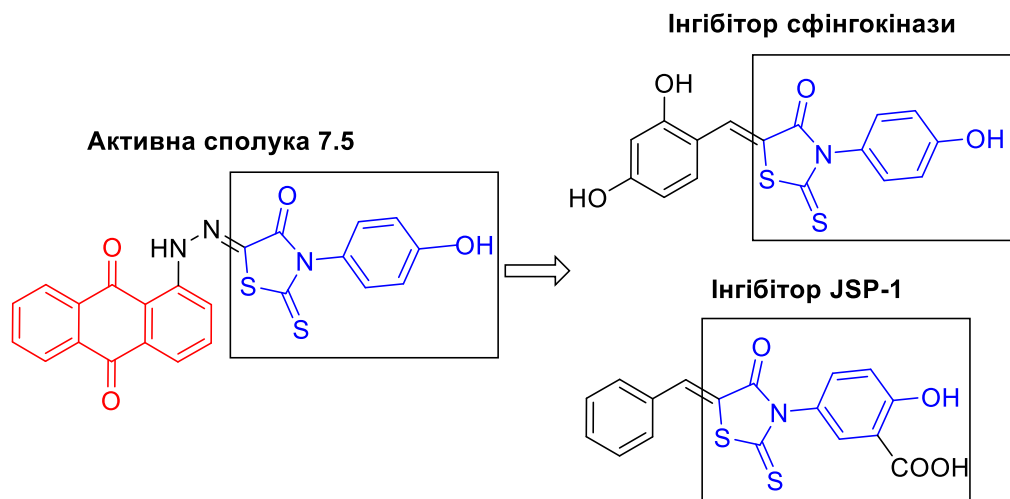


Рис. 7.3. Структура активного гідразино-антрахінонового конюгату **7.5** та відомих антипроліферативних агентів.

Слід зазначити, що структурно споріднена до 4-тіазолідинону гетероциклічна система, а саме похідне 2-тіоксо-4-імідазолідинону з 1-гідразиноантрахіноновим фрагментом проявило найвищий рівень протиракової активності серед усіх синтезованих антрахінонгідразонових кон'югатів рамках програми DTP NCI. Так, встановлено, що 1-[N'-(5-оксо-2-тіоксоімідазолідин-4-іліден)-гідразино]-антрахінон (сполука **7.10**) виявила протипухлинну активність із середнім відсотком росту клітин ( $GP_{mean}$ ) 19,42% (таблиця 7.5). Зокрема, сполука **7.10** продемонструвала високий цитотоксичний ефект відносно ліній лейкемії HL-60(TB) ( $GP = -32,13\%$ ), раку ЦНС SF-539 та SNB-75 ( $GP = -32,34$  та  $-20,21\%$ , відповідно), меланоми MDA-MB-435 ( $GP = -67,70\%$ ) та ліній клітин раку нирок RXF 393 ( $GP = -22,41\%$ ).

На основі результатів прескринінгу проведено ґрунтовний протипухлинний *in vitro* скринінг даної високоактивної сполуки, який полягав у

тестуванні сполуки, на лініях людських ракових клітин у 5 концентраціях при 10-кратному розведенні.

В умовах експерименту 1-[N<sup>7</sup>-(5-оксо-2-тіоксоімідазолідин-4-іліден)-гідразино]-антрахінон **7.10** прояв високу протипухлинну активність на другому етапі при тестуванні на лініях пухлинних клітин в інгредієнті концентрацій 10<sup>-4</sup>-10<sup>-8</sup> моль/л, як наведено в Таблиці 7.6.

Таблиця 7.6

**Протипухлинна активність 1-[N<sup>7</sup>-(5-оксо-2-тіоксоімідазолідин-4-іліден)-гідразино]-антрахінону 7.10 у 5 концентраціях при 10-кратному розведенні**

Лінія клітин раку		GI <sub>50</sub> , мкМ	SI (GI <sub>50</sub> )	TGI, мкМ	SI (TGI)	LC <sub>50</sub> , мкМ	SI (LC <sub>50</sub> )
Лейкемія	CCRF-CEM	0,69	5,88	>100,0	-	>100,0	-
	HL-60(TB)	2,12	1,91	>100,0	-	>100,0	-
	K-562	0,52	7,81	>100,0	-	>100,0	-
	MOLT-4	1,52	2,67	>100,0	-	>100,0	-
	RPMI-8226	2,82	1,43	>100,0	-	>100,0	-
	SR	0,47	8,63	>100,0	-	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>1,35</b>	<b>3,00</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Недрібнок літинний рак легень	A549/ATCC	4,26	0,95	>100,0	-	>100,0	-
	EKVX	3,49	1,16	>100,0	-	>100,0	-
	HOP-62	3,98	1,02	>100,0	-	>100,0	-
	HOP-92	0,62	6,54	32,7	2,40	>100,0	-
	NCI-H266	2,07	1,96	32,4	2,42	>100,0	-
	NCI-H23	3,39	1,19	88,9	0,88	>100,0	-
	NCI-H322M	2,29	1,77	>100,0	-	>100,0	-
	NCI-H460	1,83	2,21	>100,0	-	>100,0	-
	NCI-H522	0,79	5,13	>100,0	-	>100,0	-
<b>MG_MID</b>	<b>2,52</b>	<b>1,61</b>	<b>83,77</b>	<b>0,93</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>	
Епітеліаль ний рак	HCC-2998	2,64	1,53	>100,0	-	>100,0	-
	HCT-116	0,49	8,28	>100,0	-	>100,0	-
	HCT-15	1,10	3,69	>100,0	-	>100,0	-
	HT29	3,95	1,02	>100,0	-	>100,0	-
	KM12	0,45	9,02	>100,0	-	>100,0	-
	SW-620	0,58	7,00	>100,0	-	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>1,53</b>	<b>2,65</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Рак ЦНС	SF-268	2,16	1,87	97,8	0,80	>100,0	-
	SF-295	1,19	3,41	15,6	5,03	>100,0	-
	SF-539	0,65	6,24	6,50	12,08	73,7	1.33
	SNB-19	1,45	2,80	56,0	1,40	>100,0	-
	SNB-75	0,65	6,24	11,5	6,82	53,0	1.86
	U251	0,84	4,83	55,7	1,40	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>1,15</b>	<b>3,53</b>	<b>40,51</b>	<b>1,93</b>	<b>87,78</b>	<b>1.12</b>

Меланома	LOX IMVI	0,83	5,48	>100,0	-	>100,0	-
	MALME-3M	0,97	4,18	>100,0	-	>100,0	-
	M14	0,78	5,20	>100,0	-	>100,0	-
	MDA-MB-435	0,29	14,00	0,98	80,12	>100,0	-
	SK-MEL-2	3,11	1,30	>100,0	-	>100,0	-
	SK-MEL-28	12,0	0,33	>100,0	-	>100,0	-
	SK-MEL-5	1,05	3,86	>100,0	-	>100,0	-
	UACC-257	>100,0	-	>100,0	-	>100,0	-
	UACC-62	0,75	5,41	>100,0	-	>100,0	-
<b>MG_MID</b>	<b>13,30</b>	<b>0,30</b>	<b>88,99</b>	<b>0,88</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>	
Рак яєчників	IGROV1	1,63	2,49	>100,0	-	>100,0	-
	OVCAR-3	0,36	11,27	3,58	21,93	>100,0	-
	OVCAR-4	5,68	0,71	>100,0	-	>100,0	-
	OVCAR-5	3,82	1,06	>100,0	-	>100,0	-
	OVCAR-8	5,77	0,70	>100,0	-	>100,0	-
	NCI/ADR-RES	2,95	1,37	>100,0	-	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>3,36</b>	<b>1,20</b>	<b>83,93</b>	<b>0,93</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Рак нирок	786-0	2,68	1,51	>100,0	-	>100,0	-
	ACHN	6,26	0,64	>100,0	-	>100,0	-
	CAKI-1	0,80	5,07	56,2	1,39	>100,0	-
	RXF 393	0,87	4,66	5,64	13,92	>100,0	-
	SN12C	4,05	1,00	>100,0	-	>100,0	-
	TK-10	13,8	0,29	>100,0	-	>100,0	-
	UO-31	1,15	3,53	4,59	17,10	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>4,23</b>	<b>0,95</b>	<b>66,63</b>	<b>1,17</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Рак простати	PC-3	1,72	2,36	>100,0	-	>100,0	-
	DU-145	2,15	1,88	17,9	4,38	>100,0	-
	<b>MG_MID</b>	<b>1,93</b>	<b>2,10</b>	<b>58,95</b>	<b>1,33</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>
Рак молочної залози	MCF7	0,38	10,68	>100,0	-	>100,0	-
	MDA-MB-231/ATCC	2,79	1,45	59,5	1,31	>100,0	-
	HS 578T	0,63	6,44	60,1	1,30	>100,0	-
	BT-549	1,49	2,72	48,9	1,60	>100,0	-
	BT-549	5,11	0,79	>100,0	-	>100,0	-
	T-47D	0,52	7,80	21,4	3,66	>100,0	-
	MDA-MB-468						
<b>MG_MID</b>	<b>1,82</b>	<b>2,23</b>	<b>64,98</b>	<b>1,20</b>	<b>&gt;100</b>	<b>-</b>	
<b>MG_MID</b>	<b>4,06</b>		<b>78,52</b>		<b>98,71</b>		

На основі аналізу результатів на лініях пухлинних клітин в градієнті концентрацій  $10^{-4}$ – $10^{-8}$  моль/л сполука **7.5** продемонструвала широкий спектр показників пригнічення росту відносно досліджуваних ліній із середніми значеннями  $GI_{50}$  та TGI 4,06 та 78,52 мкМ. (Таблиця 7.6). Індекс селективності (SI) сполуки **7.5** отриманий шляхом відношення величини MG-MID (мкМ) до

окремої субпанелі MG-MID клітинної лінії (мкМ), розглядався як міра селективності сполуки. Виявлено, що сполука **7.5** у цьому дослідженні була неселективною як на рівнях  $GI_{50}$ , так і на рівні TGI (індекси селективності 0.29-14.00 та 0.88-80.12, відповідно). Однак, дане похідне продемонструвало певний профіль селективності щодо деяких окремих клітинних ліній на рівні TGI. Так, показники селективності сполуки **7.5** становили 12.08 для лінії SF-539 (рак ЦНС), 80.12 для MDA-MB-435 (меланома), 21.93 для OVCAR-3 (рак яєчників), 13.92 та 17.10 для ліній RXF 393 та UO-31 (рак нирок).

### 7.3.2. Дослідження протимікробної та протигрибкової активності антрахінонгідразонових кон'югатів.

Наявність у структурі антрахінонгідразонів декількох фармакофорних фрагментів зумовлює можливість прояву поліфармакологічного ефекту даного класу сполук та відповідно, необхідність вивчення інших видів біологічної активності та встановлення ймовірної їхньої кореляції. Так, для похідних 1-антрахінонгідразону з фрагментами 4-тіазолідинону та інших метиленактивних сполук (сполуки **7.1**, **7.2**, **7.9**, **7.13**, **7.14**, **7.16**, **7.21**) визначали мінімальну інгібувальну концентрацію (МІК) стандартним методом мікророзведення у агарі Мюллера-Хінтона (МНВ, Becton-Dickinson, Germany) відповідно до рекомендацій Інституту клінічних та лабораторних стандартів (CLSI). Досліджувані сполуки оцінювали на їх протимікробну та протигрибкову активності щодо грамнегативних бактерій *E. coli*, грампозитивних бактерій роду *Lactobacillus* та дріжджів *C. albicans*. Значення МІК сполук реєстрували через 20 та 24 год інкубації для бактерій та дріжджів, відповідно. Експерименти проводились у трьох повторах та при трьох різних вимірах (дев'ять повторень для кожного окремого вимірювання). Антимікробну активність для синтезованих 1-гідразино-антрахінонових кон'югатів оцінювали на основі значень МІК, які порівнювали із стандартними еталонними антимікробними препаратами ампіциліном та флуконазолом (таблиця 7.7).

Таблиця 7.7

Значення МІК сполук **7.1, 7.2, 7.9, 7.13, 7.14, 7.16, 7.21**

Сполука/ Мікроорганізм	<i>E.coli</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>C. albicans</i>
<b>7.1</b>	2,5 мМ	>2,5 мМ	>2,5 мМ
<b>7.2</b>	>2,5 мМ	>2,5 мМ	2,5 мМ
<b>7.9</b>	>2,5 мМ	>2,5 мМ	>2,5 мМ
<b>7.13</b>	>2,5 мМ	1,25 мМ	>2,5 мМ
<b>7.14</b>	2,5 мМ	>2,5 мМ	>2,5 мМ
<b>7.16</b>	>2,5 мМ	0,625 мМ	0,625 мМ
<b>7.21</b>	>2,5 мМ	1,25 мМ	0,3125 мМ
<b>Препарати порівняння<sup>a,b</sup></b>	36,5 мкМ <sup>a</sup>	39,8 мкМ <sup>a</sup>	38,96 мкМ <sup>b</sup>

<sup>a</sup> – Ампіцилін<sup>b</sup> – Флуконазол

Так, досліджувані сполуки виявляли інгібувальну активність щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів із значеннями величин МІК в межах >2,5-0,3125 мМ. Зокрема сполука **7.16** виявила помірну активність щодо *Candida albicans* і бактерій роду *Lactobacillus* із величиною МІК 0,625 мМ. Сполука **7.21** показала хорошу протигрибкову активність щодо *Candida albicans* із значенням МІК 0,3125 мМ.

У продовження цієї теми, нами було вивчено протимікробну та протигрибкову активність для поліфункціональних 2-гідразиноантрахінонів з фрагментами тіазолідинону та інших метиленактивних сполук **7.22-7.32** методом дифузії в агар (метод «колодязів») та методом серійних розведень (розщеплення резазурину в бульйоні), використовуючи референс-культури та клінічні ізоляти мікроорганізмів. За результатами скринінгу протимікробної активності 2-гідразино-антрахінонових кон'югатів найвищий рівень активності проявили сполуки **7.24-7.26, 7.28 та 7.32** (табл. 7.8).



Таблиця 7.8

## Результати дослідження протимікробної та протигрибкової дії антрахінонгідразонових кон'югатів

Сполука	Діаметри зон пригнічення росту, мм*									
	Грамм-негативні					Грамм-позитивні			Грибки	
	Референс штами		Клінічні штами			Референс штама	Клінічні штами		Референс штама	Клінічний штама
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853 (F-51))	<i>Raoultella terrigena</i> (ATCC 33257)	<i>Pseudomonas putida</i> N 182	<i>Escherichia coli</i> N 168	<i>Proteus mirabilis</i> N 113	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923 (F-49))	<i>Staphylococcus aureus</i> N 23	<i>Enterococcus faecalis</i> N 26	<i>Candida albicans</i> (ATCC 885-653)	<i>Candida albicans</i> N 139
7.22	00	00	00	00	00	00	6,9± 0,3	00	00	00
7.23	00	00	00	00	00	00	00	00	00	7,1±0,3
7.24	00	00	00	12,2± 0,2	00	00	00	00	00	11,2± 0,3
7.25	00	00	12,1± 0,2	00	00	00	00	00	00	00
7.26	00	00	12,2± 0,2	00	00	00	00	00	00	11,2± 0,3
7.27	00	00	00	00	00	00	6,4± 0,3	00	00	00
7.28	00	00	00	9,9± 0,3	00	00	00	10,2 ± 0,4	00	00
7.29	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
7.30	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
7.31	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
7.32	00	00	00	00	00	00	00	00	00	11,4±0,2
ДМСО	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Ванкоміцин	-	-	-	-	-	32,0 ± 0,5	11,4 ± 0,3	12,0 ± 0,2	-	-
Ципрофлоксацин	35,0 ± 0,3	30,0 ± 0,5	20,0 ± 0,2	14,0 ± 0,4	16,0 ± 0,3	35,0 ± 0,5	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2	-	-
Клотримазол	-	-	-	-	-	-	-	-	18,0 ± 0,5	11,0 ± 0,3

\*Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ)

Так, сполука **7.26** виявилась найактивнішою щодо збудників *P. putida* N182 та антибіотикорезистентного штаму *C. albicans* N139. Сполука **7.24** проявила активність щодо резистентних до антибіотиків штамів *E. coli* N168 і *C. albicans* N139, сполука **7.28** виявила подібним чином активність відносно *E. coli* N168 та *E. faecalis* N26. Активність щодо збудника *P. putida* N182 проявила сполука **7.25**. Селективну активність щодо *C. albicans* N139 проявила сполука **7.32**. Значної антимікробної активності щодо грампозитивних мікроорганізмів досліджуваних сполук не проявили, за винятком похідного **7.28** з активністю щодо збудника *E. faecalis* N26.

Для п'ятьох високоактивних сполук (**7.24-7.26, 7.28 та 7.32**) було визначено мінімальну інгібуючу концентрацію (табл. 7.9). Найкращу активність відносно збудника *C. albicans* N139 проявили сполуки **7.26** і **7.32** із значенням з величин МІК 187,1 мкМ, сполука **7.26** проявила активність щодо *P. putida* N182 із величиною МІК 374,3 мкМ.

Таблиця 7.9

**Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) розраховані для сполук-хітів 7.24-7.26, 7.28, 7.32**

Штам/Сполука	мкМ						
	7.24	7.25	7.26	7.28	7.32	Ципрофлоксацин	Клотримазол
<i>Pseudomonas putida</i> N 182	00	00	<374,3	-	-	<23,5	-
<i>Escherichia coli</i> N 168	00	-	-	00	-	<11,8	-
<i>Enterococcus faecalis</i> N 26	-	-	-	00	-	<23,5	-
<i>Candida albicans</i> N 139	00	-	<187,1	-	<187,1	-	<22,6

«00» – Результати з відсутньою істотною різницею з контрольним розчинником (ДМСО)

«-» – Не тестовано

Загалом при аналізі результатів протимікробної активності одержаних гідразино-антрахінонових конюгатів не спостерігалось чіткої залежності даного виду біологічної активності від структури вихідних СН-кислот. Зокрема антрахінонгідразонові кон'югати на основі 4-тіазолідинону та його структурних аналогів не проявили помітної протимікробної активності за винятком сполуки

**7.26**, що вміщує фрагмент гідантоїну. З іншого боку ряд поліфункціональних антрахінонгідразонів на основі деяких гетероциклічних сполук, зокрема кислоти Мельдрума (сполука **7.16**) та окремих аліциклічних метиленактивних сполук (сполуки **7.21** та **7.32**) проявляють помірний рівень протимікробної активності щодо деяких референс-культур та клінічних ізолятів мікроорганізмів, що може частково мати потенціал для поглибленого дослідження окремих сполук з даного класу.

7.3.3. Дослідження антиоксидантної активності антрахінонгідразонових кон'югатів.

Гібридні молекули на основі 2-антрахінонгідразону **7.1**, **7.6**, **7.9**, **7.14**, **7.16** та **7.21** були протестовані в концентрації 4 мМ (стоковий розчин метанолу, сольовий буфер Трис-НСІ (рН=7.4)) на їх *in vitro* антиоксидантну активність на основі інгібування 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (ДФПГ). Похідні продемонстрували різний рівень активності та % інгібування радикалів ДФПГ, зокрема **7.1** (27,5%), **7.6** (38,6%), **7.9** (45,7%), **7.14** (31,0%), **7.16** (62,8%) та **7.9** (35,1%). Розчин аскорбінової кислоти концентрацією 9 мг у 10 мл використовувався як контроль, який в умовах експерименту пригнічував інгібування радикалів ДФПГ на 94,3 %. Для досліджуваних гібридних молекул на основі 2-антрахінонгідразону були визначені значення ІС<sub>50</sub>, які становили 12,451 мМ (**7.1**), 8,245 мМ (**7.6**), 6,893 мМ (**7.9**), 10,936 мМ (**7.14**), 3,715 мМ (**7.16**) та 9,613 мМ (**7.21**), відповідно. Значення ІС<sub>50</sub> для аскорбінової кислоти становило 0,045 мМ. На основі отриманих результатів встановлено, що серед досліджуваних похідних лише 1-[N'-(3-метил-5-оксо-1-феніл-1,5-дигідропіразол-4-іліден)гідразино]антрахінон (сполука **7.16**) володіла помірною антиоксидантною активністю зі значенням ІС<sub>50</sub> нижче 10 мг/мл. Варто відзначити, що сполука **7.16** містить у структурі фрагмент кислоти Мельдрума, яка володіє антиоксидантною активністю, особливо у випадку її ариліденових аналогів [537].

#### 7.4. Експериментальна частина.

##### *Загальна методика синтезу 1(2)-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону.*

До водного розчину 14 ммоль морфоліну при енергійному перемішуванні додають водну суспензію 10 ммоль 9,10-діоксо-9,10-дигідро-1(2)-антраценедіазонію гідроген сульфату підтримуючи рН розчину в межах 7,8–8,2. Реакційну суміш перемішують протягом 2 год при 20 °С, утворений осад відфільтровують, промивають водою, висушують у вакуумі та очищають перекристалізацією з толуолу.

##### *Загальна методика синтезу поліфункціональних 1-гідразиноантрахінонів (7.1-7.21)*

До 10 ммоль відповідної метиленактивної сполуки суспендованої у 20 мл оцтової кислоти додають 10 ммоль 1-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону. Реакційну суміш нагрівають зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують, і отриманий осад відфільтровують, промивають водою, етанолом і діетиловим ефіром, висушують і перекристалізують із суміші ДМФ: оцтова кислота (1:2) або етанолу.

##### *Загальна методика синтезу поліфункціональних 2-гідразиноантрахінонів (7.22-7.32)*

У колбу поміщають 10 ммоль 2-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону, 10 ммоль відповідної метиленактивної сполуки та у випадку синтезу сполук **7.22**, **7.25** та **7.26** додають 10 ммоль безводного ацетату натрію у 10 мл оцтової кислоти нагрівають та протягом 30 хвилин у колбі із зворотнім холодильником. Утворений осад відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та діетиловим етером і перекристалізують з суміші ДМФА-етанол (1:2).

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено методики синтезу поліфункціональних 1(2)-гідразиноантрахінонів за реакцією азосполучення 1(2)-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону та деяких метиленактивних сполук, зокрема похідних тіазолідинону, їх структурних аналогів, а також відповідних аліциклічних похідних.

2. Структура та чистота синтезованих сполук підтверджено методами елементного аналізу,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії.

3. Досліджено протипухлинну та антимікробну активність синтезованих сполук. Серед ряду поліфункціональних 1-гідразиноантрахінонів на основі похідних 4-тіазолідинону було виділено сполуку хіт **7.5** із високими показниками пригнічення росту ракових клітин основних онкозахворювань.

4. За результатами дослідження протипухлинної дії ідентифіковано високоактивне похідне 1-гідразиноантрахінону з 2-тіоксо-4-імідазолідиноновим фрагментом у молекулі **7.10**, що проявило суттєву антимітотичну дію відносно більшості ліній ракових клітин людини з середніми значеннями показників  $\text{GI}_{50}/\text{TGI}$  на рівні 4,06/78,52 мкМ.

5. Пошук протимікробних агентів серед поліфункціональних 1-гідразиноантрахінонів дозволив ідентифікувати молекулу **7.21**, що показала хорошу протигрибкову активність щодо збудника *Candida albicans* із величиною МІК 0,3125 мМ. За результатами скринінгу 2-гідразиноантрахінонів ідентифіковано сполуки **7.26** і **7.32**, що проявили високу активність проти клінічного штаму *Candida albicans* N 139 із значенням величин МІК 0,1875 мМ.

6. За результатами дослідження антиоксидантної дії було ідентифіковано похідне 1-гідразиноантрахінону з фрагментом кислоти Мельдрума у структурі **7.16** з помірним профілем активності, що проявило інгібування радикалів ДФПГ в межах 62,8% та значенням  $\text{IC}_{50}$  3,715 мМ.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [530,531, 534, 535]*

## РОЗДІЛ 8

### СИНТЕЗ І ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИХ НЕКОНДЕНСОВАНИХ ПОХІДНИХ НА ОСНОВІ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ

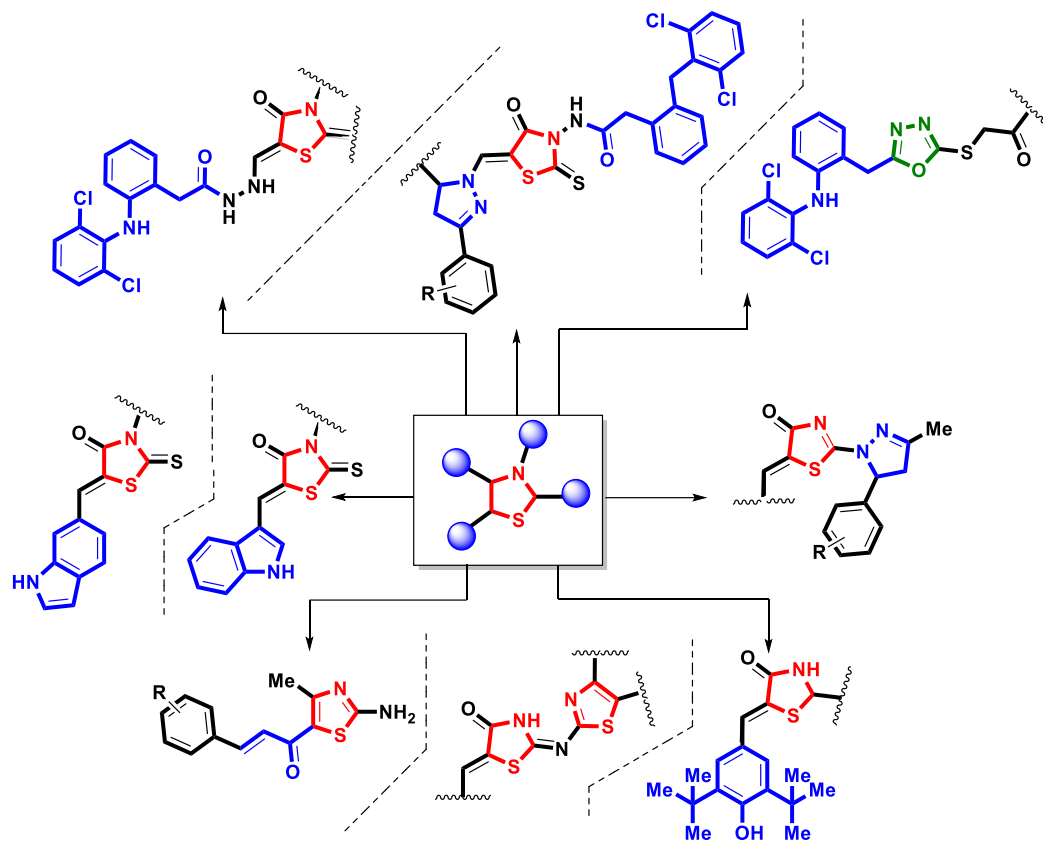
Високий рівень біологічної активності похідних 4-тіазолідинону чи тіазолу, які лежать в основі численних лікарських засобів та біологічно активних сполук зумовлений не тільки наявністю згаданих гетероциклічних систем у структурі, але й інших молекулярних фрагментів без яких фармакологічний ефект здебільшого був би неможливим. У попередніх розділах нашої роботи було детально охарактеризовано гібрид-фармакофорний підхід у процесі конструювання потенційних лікоподібних молекул, особливо при одержанні різних функціоналізованих конденсованих похідних на основі 4-тіазолідинону. Як продовження реалізації даної стратегії нами було проведені синтетичні дослідження, що включали одержання різних класів неконденсованих похідних тіазолідинону/тіазолу, які містили ряд додаткових фармакофорних груп для імовірного підвищення рівня фармакологічної активності цільових сполук. Нами було обрано певні фармакофорні групи, які в умовах використання різних типів хімічних перетворень, дозволили ввести їх у структуру похідних тіазолідинону/тіазолу з одержанням серії гібридних молекул для подальшого дослідження біологічної активності (Схема 8.1). Критерії вибору даних фармакофорних угруповань базувались не тільки на детальному аналізі літературних даних, а й також на певній логічній схемі, яка корелює із попередніми розділами нашої роботи, особливо що стосується конденсованих гібридних молекул на основі тіазолу/тіазолідинону.

Відповідно, нами було одержано серію тіазолвмісних гібридних молекул, які містять еноновий фрагмент у структурі, який як відомо лежить в основі численних біологічно активних сполук, зокрема куркуміну чи халконів як представників сполук з класу флавоноїдів [538-541]. З іншого боку, наявність двох електрофільних центрів та високополярного зв'язку C=O надає сполукам з

еноновим фрагментом високої хімічної активності при взаємодії з диполярними реагентами з утворенням ряду нітрогенвмісних гетероциклів, зокрема заміщених похідних піразоліну або конденсованих похідних тiazолопіридину [332, 542]. Окрім того, нами було одержано похідні на основі тiazолідинону з індольним ядром у структурі, останній як відомо є фрагментом триптофану, серотоніну, мелатоніну, буфотеніну, інших сполук природнього походження, а також великої кількості лікарських засобів [543,544].

Особливої уваги заслуговує також введення у структуру похідних тiazолідинону фрагментів існуючих лікарських засобів. Так, введення фрагментів на основі просторово-екранованих фенолів, в тому числі 2,6-ди-*трет*-бутил-фенільного замісника, який лежить в основі ряду лікарських засобів [545, 546], зокрема інгібітора вільнорадикальних реакцій дибунолу та селективного інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону дозволить нам у даній роботі оцінити рівень збереження зазначених видів біологічної активності чи появу нових ефектів у синтезованих гібридних молекулах. Окрім того, нами також було досліджено гібридні молекули на основі 4-тiazолідинону з фрагментом диклофенаку на прояв не тільки очікуваної протизапальної, а й інших видів активності, оскільки відомо, що сполуки з 2-(2,6-дихлорофеніламіно)-фенілацетамідним фрагментом у структурі проявляють виражений поліфармакологічний ефект [547-550].

Відповідно, метою даного розділу нашої роботи є одержання нових класів гібридних молекул на основі неконденсованих похідних тiazолу/тiazолідинону з іншими фармакофорними фрагментами у структурі, дослідження їх біологічної активності та встановлення деяких механізмів її реалізації.



### 8.1 Синтез та дослідження протимікробної та імунотропної активності тiazолідин-індольних гібридних молекул.

В епоху швидко зростаючої кількості пацієнтів, які страждають різними інфекційними захворюваннями, пошук нових сполук з антибіотичною активністю є однією з глобальних проблем подолання антибіотикорезистентності [551]. У цьому контексті значний інтерес належать гетероциклічним сполукам, які є одним з найцінніших джерел нових хімічних агентів з різноманітною біологічною активністю завдяки унікальній здатності імітувати структуру пептидів і зворотно зв'язуватися з різноманітними біомішенями [552].

Серед провідних стратегій створення потенційних «лікоподібних» молекул значний інтерес приділяється гетероциклам на основі тiazолу. Похідні тiazолу/тiazолідинону є важливим класом сполук в сучасній медичній хімії [553-

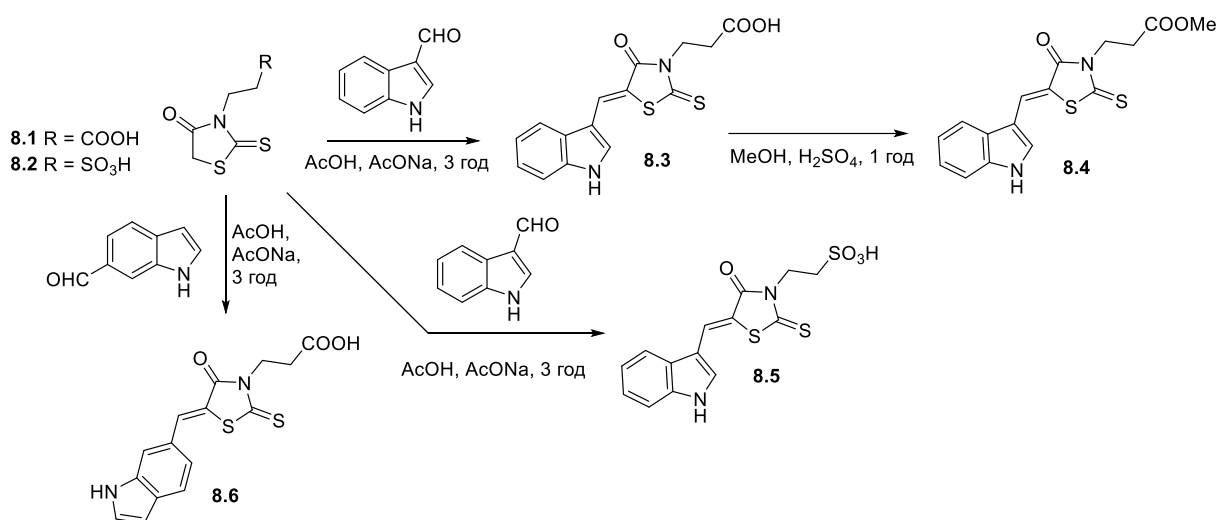


555], які проявляють антитрипаносомну [556], протівірусну [557], протипухлинну [558], антиоксидантну [559], протизапальну дію [560], а також відіграють ключову роль як потужні протимікробні та протигрибкові агенти [561, 562]. Окрім того, тiazольний цикл присутній в багатьох лікарських засобах, таких як пеніциліни, монобактамні антибіотики, сульфаніламідний препарат сульфатіазол, тіабендазол, нізатидин, що підтверджує важливість даного гетероциклічного фрагменту як ідеальної основи для побудови більш активних та безпечних кандидатів у лікарські засоби, особливо в терапії інфекційних захворювань. Окрім того, на основі багатьох літературних даних, серед похідних тiazолідинону, було виділено ряд високоактивних інгібіторів широкого спектру бактеріальних ферментних систем, зокрема – лактамази [216], сортази A (SrtA) [218], пептидної деформілази [220], маннозил-трансферази 1 [563], UDP-галактопіранозил мутази (UGM) [563], UDP-N-ацетилмурамат/L-аланін-лігази (MurC) [215] та доліхолфосфат маннози [564].

На основі попередніх наукових досліджень багатьох наукових груп встановлено, що поєднання тiazолідинового фрагменту з іншими фармакофорними групами, особливо з фрагментом індолу, дає змогу до створення гібридних молекул з новим фармакологічним профілем та низькою токсичністю [561]. Так, серед похідних на основі індолу виявлено ряд високоактивних фітогормонів, незамінних амінокислот, нейромедіаторів, а також великої кількості комерційних лікарських засобів та біологічно активних сполук [543, 544]. На продовження цієї теми метою даного фрагменту нашої роботи був дизайн та синтез ряду нових неконденсованих гетероциклічних сполук, що містять фрагмент 2-тіоксо-4-тіазолідинону (роданіну), що поєднаний із іншим фармакофорним фрагментом, а саме індольним ядром. Для синтезованих сполук було проведено оцінку антимікробної та протигрибкової активностей *in vitro* відносно ряду музейних та клінічних штамів мікроорганізмів, а для однієї сполуки, що володіла найвищою активністю було проведено поглиблене вивчення імунотропної активності на лабораторних тваринах.

Синтез цільових індолін-заміщених роданінів відображено на схемі 8.2. Вихідні роданін-3-пропіонова/етансульфонова кислоти були синтезовані відповідно до повідомлених раніше методик [561, 565]. Цільові 5-індолілметилени похідних роданін-3-пропіон/етансульфонові кислоти були отримані виходячи з 3-заміщених похідних роданіну та індолкарбальдегідів в умовах реакції Кньюенагеля в середовищі оцтової кислоти в присутності ацетату натрію як каталізатора. Окрім того, 5-індолілметиленироданін-3-пропіонова кислота **8.3** була трансформована у відповідний естер **8.4** шляхом нагрівання з метанолом в присутності сірчаної кислоти як каталізатора [566].

Схема 8.2



Отримані сполуки **8.3-8.6** – кристалічні порошки червоного кольору, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті, нерозчинні в ацетонітрилі, толуолі, спиртах, бензолі, воді та ефірі. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 8.1.

Таблиця 8.1

### Фізико-хімічні характеристики 5-індолілметилени-3-заміщених роданінів

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>8.3</b>	96	256-257	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	54,04	3,93	8,40	54,08	3,85	8,51
<b>8.4</b>	81	245-247	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	55,47	4,07	8,09	55,38	4,12	8,14
<b>8.5</b>	71	>260	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	45,64	3,28	7,60	45,58	3,22	7,54
<b>8.6</b>	74	>260	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	54,20	3,64	8,43	54,28	3,55	8,40

Структура синтезованих сполук була підтверджена методами  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії. Спектральні характеристики сполук наведені у таблиці 8.2. Так, у спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сполук **8.3-8.6**  $\text{CH}_2$  протони алкільного фрагмента в положенні *N*-3 проявляються у вигляді триплетів при  $\delta$  2,63-2,77 та 4,24-4,30 м.ч., відповідно. Хімічний зсув метиленової групи ( $=\text{CH}$ ) синтезованих 5-індолілметилени похідних незначно зміщений у слабке магнітне поле  $\delta = 7,93-8,09$  м.ч., і чітко вказує, що при конденсації Кньюенагеля похідних роданін-3-пропіонових/етансульфононих кислот з індол-карбальдегідами були отримані лише *Z*-ізомери. Сигнали NH групи індольного фрагменту проявляється у вигляді синглету у ділянці слабого магнітного поля при  $\delta = 11,46-12,41$  м.ч. У спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР спостерігаються характерні сигнали (тіо)карбонільної групи при  $\sim 166,3-193,1$  м.ч. та сигнали метиленової групи при  $\delta$  130,3-135,6 м.ч., відповідно. Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР спектру сполуки **8.3** представлено на рис. 8.1.

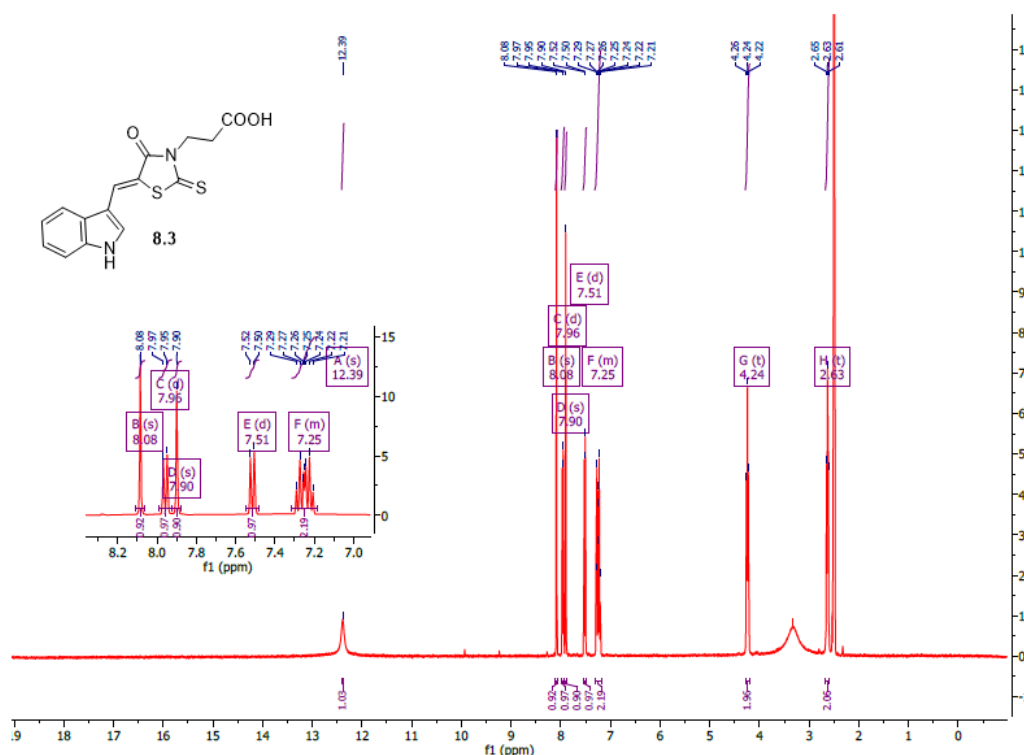


Рис. 8.1. Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки **8.3**.

**Спектральні характеристики 5-індолілметилен похідних роданін-3-пропіон/етансульфонових кислот**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
<b>8.3</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,63 (т, 2H, $J = 7,8$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 4,24 (т, 2H, $J = 7,8$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 7,20-7,29 (м, 2H, аром.), 7,51 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,89 (с, 1H, аром.), 7,75 (д, 1H, $J = 7,7$ Гц, аром.), 8,08 (с, 1H, =CH), 12,38 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 42,9, 45,5, 111,3, 113,5, 114,7, 118,9, 122,1, 123,1, 125,4, 126,7, 130,3, 136,9, 166,7, 191,3	334 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.4</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,53 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,77 (т, 2H, $J = 8,1$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 4,30 (т, 2H, $J = 8,2$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 7,20-7,29 (м, 2H, аром.), 7,51 (д, 1H, $J = 7,9$ Гц, аром.), 7,88 (с, 1H, аром.), 7,96 (д, 1H, $J = 7,7$ Гц, аром.), 8,07 (с, 1H, =CH) 12,31 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 41,1, 47,3, 54,5, 110,0, 112,5, 114,6, 118,5, 121,4, 123,3, 125,9, 126,7, 130,4, 136,3, 166,4, 192,0	347 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.5</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,72 (т, 2H, $J = 7,6$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 4,27 (т, 2H, $J = 7,5$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 7,20-7,29 (м, 2H, аром.), 7,51 (д, 1H, $J = 7,8$ Гц, аром.), 7,91 (с, 1H, аром.), 7,96 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 8,09 (с, 1H, =CH), 12,38 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 30,7, 51,6, 110,0, 112,5, 114,2, 118,4, 121,5, 123,3, 126,3, 126,7, 130,6, 136,3, 166,3, 170,6, 192,1	369 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.6</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,65 (т, 2H, $J = 7,0$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 4,27 (т, 2H, $J = 7,0$ Гц, $\text{CH}_2$ ), 6,54 (с, 1H, аром.), 7,27 (д, 1H, $J = 7,7$ Гц, аром.), 7,59 (м, 1H, аром.), 7,70 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц, аром.), 7,76 (м, 1H, аром.), 7,93 (с, 1H, =CH), 11,46 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 30,8, 40,4, 101,9, 115,2, 118,1, 121,0, 121,6, 125,6, 129,8, 130,1, 135,6, 136,0, 166,7, 171,7, 193,1	333 (M+H) <sup>+</sup>

Синтезовані сполуки **8.3-8.6** досліджували на антибактеріальну та протигрибкову активність *in vitro* методом дифузії в агар [566-568]. На даний вид активності було досліджено 15 видів мікроорганізмів, серед яких одинадцять штамів бактерій, три види дріжджів та один грибок. Окрім того, досліджувані клінічні штами мікроорганізмів проявляли резистентність відносно широкого спектру антибіотиків [569,570] та були виділені від пацієнтів інфікованих внутрішньолікарняними інфекціями. Усі синтезовані сполуки виявляли різну ступінь інгібуючого впливу на ріст досліджуваних мікроорганізмів у дозі 50 мкг

(табл. 8.3 та рис. 8.1) із зоною пригнічення росту в діапазоні 00-19.4 мм щодо випробуваних мікроорганізмів. ДМСО використовували в якості контролю. Серед тестованих сполук, з'єднання **8.3** та **8.4** продемонстрували хорошу протигрибкову активність щодо *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Aspergillus niger* і не мали значної антибактеріальної активності. Сполука **8.5** виявила найвищу активність щодо *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*. Сполука **8.6** проявила помірну активність щодо *Raoultella terrigena*. Значної протигрибкової активності для сполук **8.5** та **8.6** не спостерігалось.

Таблиця 8.3

**Антибактеріальна та протигрибкова активності 5-індолілметилен похідних  
роданін-3-пропіон/етансульфонових кислот**

№	Тип штаму		Вид бактерій/грибів	Діаметри зон пригнічення росту (мм ± СВ)				
				<b>8.3</b>	<b>8.4</b>	<b>8.5</b>	<b>8.6</b>	ДМСО
1	Грам негативні бактерії	Музейні штами	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853 (F-51))	7,2 ± 0,3	00	8,5 ± 0,5	00	00
2			<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	00	00	15,2 ± 0,4	00	00
3		Клінічні штами	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №7 (n=4)	7,0 ± 0,3	00	7,5 ± 0,5	00	00
4			<i>Escherichia coli</i> №5 (n=4)	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	15,4 ± 0,6	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
5	Рідкісні клінічні штами	<i>Raoultella terrigena</i> № 1 (n=4)	00	00	6,6 ± 0,2	8,0 ± 0,3	00	
6		<i>Brevundimonas vesicularis</i> № 111 (n=4)	00	00	00	00	00	
7	Грам позитивні бактерії	Музейні штами	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923 (F-49))	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,8 ± 0,4	6,8 ± 0,4	6,8 ± 0,4
8			<i>Bacillus licheniformis</i> (BKПМ-7038)	7,0 ± 0,3	00	9,5 ± 0,5	00	00
9		Клінічні штами	<i>Staphylococcus aureus</i> 120	00	00	12,2 ± 0,4	00	00

			(n=4)					
10		Рідкісні клінічні штами	<i>Staphylococcus lentus</i> № 21 (n=4)	00	00	10,3 ± 0,5	00	00
11			<i>Staphylococcus lugnuniensis</i> 142	00	00	9,5 ± 0,5	00	00
12	Гриби/дріжджі	Музейні штами дріжджів	<i>Candida albicans</i> (ATCC 885-653)	19,4 ± 0,5	15,4 ± 0,6	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,2
13		Клінічні штами дріжджів	<i>Candida dubliniensis</i> №67 (n=4)	14,5 ± 0,6	10,5 ± 0,6	00	00	00
14			<i>Candida albicans</i> №60 (n=4)	12,5 ± 0,6	11,5 ± 0,6	00	00	00
15		Музейні штами грибів	<i>Aspergillus niger</i> № 162	15,5 ± 0,5	14,5 ± 0,5	00	00	00

00: відсутність активності; діаметри зон пригнічення росту (мм); дані представлені як середнє значення ±СВ (n = 3)

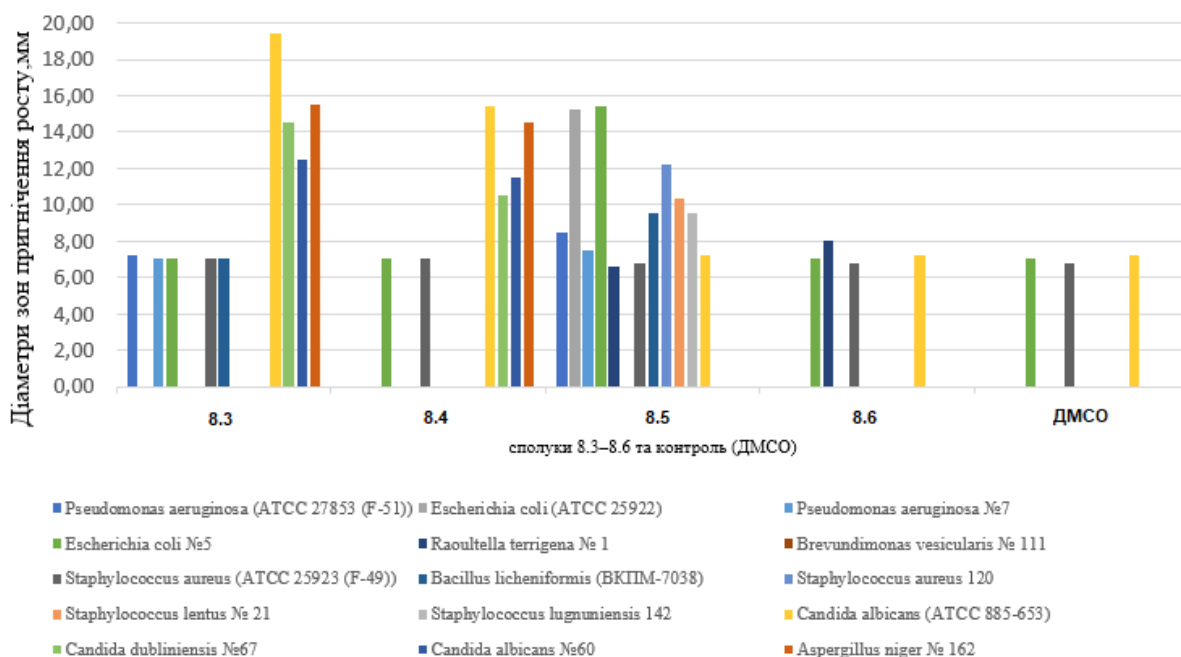


Рис. 8.2. Графічне порівняння антибактеріальної та протигрибкової активності сполук 8.3-8.6.

Для сполук **8.3-8.6** була також визначена мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) щодо найбільш чутливих штамів мікроорганізмів використовуючи метод мікророзведення (аналіз на основі відновлення

ресазурину) [571, 572] (Таблиця 8.4). Досліджувані сполуки проявляли інгібуючу активність щодо клінічних штамів *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus* та *Candida albicans* із величиною МІК в межах 00-50 мкг/мл. Дві сполуки володіли помірною активністю у розведенні 1:4 стосовно *Candida albicans* (сполука **8.3**), *Escherichia coli* та *Staphylococcus lentus* (сполука **8.5**) з величиною МІК 25.0 мкг/мл. Сполука **8.4** виявила при аналогічному розведенні дещо нижчу інгібуючу активність відносно *Candida albicans* з величиною МІК 50 мкг/мл. Сполука **8.6** була неактивною щодо досліджуваних мікроорганізмів. Цікаво, що випробувані сполуки при розведенні 1:1 мали незначну інгібуючу активність з величиною МІК 50.0 мкг/мл.

Таблиця 8.4

**Мінімальна інгібуюча (МІК) та Бактерицидна /Фунгіцидна концентрації (МБК/МФК) сполук 8.3-8.6**

№	Тип штаму	Вид бактерій/грибів	Мінімальна інгібуюча (МІК) and Бактерицидна /Фунгіцидна концентрації (МБК/МФК)							
			Сполука 8.3		Сполука 8.4		Сполука 8.5		Сполука 8.6	
			МІК (мкг/мл)	МБК/МФК (мкг/мл)	МІК (мкг/мл)	МБК/МФК (мкг/мл)	МІК (мкг/мл)	МБК/МФК (µg/mL)	МІК (мкг/мл)	МБК/МФК (мкг/мл)
1	Грам негативні бактерії	<i>Escherichia coli</i> №5	0	0	0	0	1:4 (25 мкг/мл)	1:1 (50 мкг/мл)	0	0
2	Грам позитивні бактерії	<i>Staphylococcus lentus</i> № 21	0	0	0	0	(1:4 25 мкг/мл)	(1:1 50 мкг/мл)	0	0
3	Гриби	<i>Candida albicans</i> №60	1:4 (25 мкг/мл)	1:1 (50 мкг/мл)	1:1 (50 мкг/мл)	1:1 (50 мкг/мл)	0	0	0	0

При оцінці SAR синтезованих сполук було встановлено, що антибактеріальний ефект синтезованих сполук **8.3-8.6** суттєво залежить від замісників у положенні С-5 та N-3 у 2-тіоксо-4-тіазолідиноновому (роданіновому) ядрі. Так, 5-іліден-роданін-3-пропіонова кислота **8.3** з індол-3-ілметиленовим фрагментом у молекулі виявляла еквівалентну протимікробну активність до її естеру **8.4**. Сполука **8.5** з фрагментом етаносульфонової кислоти, у положенні N-3 роданінового ядра та індол-3-ільним фрагментом у положенні

C-5 проявила найвищу активність щодо усіх випробуваних штамів бактерій та грибів з величиною МІК в межах 25 мкг/мл. Цікаво, що введення індол-6-ілметиленового фрагменту в положенні C-5 роданін-3-пропіонової кислоти призводить до втрати антибактеріальної та протигрибкової активності.

Для синтезованих сполук було також досліджено гостру токсичність на білих мишах обох статей масою 20-27 г з метою визначення середньої летальної дози ( $LD_{50}$ ). Розчини досліджуваних сполук у даному дослідженні готували безпосередньо перед використанням у зростаючих концентраціях від 100 до 1000 мг/кг і вводили внутрішньочеревно. Значення  $LD_{50}$  визначали за методом Літчфілда та Вілкоксона. Синтезовані сполуки показали низьку гостру токсичність на мишах із значеннями  $LD_{50}$  у межах 300–350 мг/кг, що свідчить про відносну безпечність тестованих сполук (табл. 8.5).

Таблиця 8.5

#### Гостра токсичність сполук 8.3-8.6

Сполука	$LD_{50}$ , мг/кг
<b>8.3</b>	960,0 ± 64,5
<b>8.4</b>	1005,0 ± 67,0
<b>8.5</b>	1050,6 ± 67,5
<b>8.6</b>	900,0 ± 57,0

Для 3-[5-(1*H*-індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-пропіонової кислоти (сполука **8.3**), що володіла високим рівнем протигрибкової активності було проведено поглиблене вивчення імунотропної активності на мурчаках [573]. Зокрема при проведенні сполукою **8.3** аплікацій на шкіру та після внутрішньошкірних проб в дозах 1:10 і 1:100 не спостерігалися зміни на шкірі у досліджуваних тварин.

При оцінці показників лейкоцитарної формули периферичної крові досліджуваних тварин спостерігалися чіткі зміни у досліджуваній групі у порівнянні з контролем (табл. 8.6.). Так, загальна кількість лейкоцитів зросла на 21,76 %, окрім того спостерігалось також збільшення кількості еозинофілів. Фіксувалось також суттєве зростання кількості моноцитів на 52,09%, а також відносне та абсолютне збільшення кількості лімфоцитів на 5,02% та 26,87%,



відповідно на тлі зниження кількості нейтрофільних гранулоцитів. Індекс співвідношення рівня нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ) зменшився на понад 35 %. Інші показники крові суттєво не зазнали змін на фоні сенсibilізації сполукою 8.3

Таблиця 8.6

**Показники лейкоцитарної формули крові мурчаків після епікутанної сенсibilізації сполукою 8.3,  $M \pm m$**

Показник	Контроль	Сенсibilізація сполукою 8.3	Зміна відносно контролю, %	Достовірність*
Лейкоцити, г/л	13,79±0,49	16,79±1,16	21,76	p<0,05
Лейкоцитарна формула:				
Базофіли, %	0,25±0,16	0,25±0,16	0,00	
Базофіли, г/л	0,03±0,02	0,04±0,03	35,69	
Еозинофіли, %	2,63±0,18	2,88±0,23	9,52	
Еозинофіли, г/л	0,36±0,02	0,49±0,05	35,38	p<0,05
Нейтрофіли, %	24,63±1,34	20,13±0,79	-18,27	p<0,05
Нейтрофіли, г/л	3,39±0,23	3,43±0,35	1,11	
Моноцити, %	2,75±0,25	3,50±0,42	27,27	
Моноцити, г/л	0,38±0,04	0,58±0,07	52,09	p<0,05
Лімфоцити, %	69,75±1,22	73,25±1,03	5,02	p<0,05
Лімфоцити, г/л	9,68±0,40	12,28±0,77	26,87	p<0,05

\*Достовірність зазначена тільки для p<0,05 та p<0,001, всі інші показники мають p≥0,05

При аналізі кількісних параметрів клітинного адаптивного імунітету в тваринах контрольної групи спостерігалось збільшення кількості Т-лімфоцитів CD3 та Т-супресорів CD8 на понад 21% та 2%, а також помітне зменшення кількості NK-клітин CD16 та В-лімфоцитів CD22 на понад 11% та 23%. Інші показники клітинного імунітету не зазнали суттєвих змін (табл. 8.7).

Таблиця 8.7.

**Субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові мурчаків після епікутанної сенсibiliзації споукою 8.3,  $M \pm m$**

Показник	Контроль	Досліджувана речовина	Зміна відносно контролю, %	Достовірність*
Показники клітинного імунітету				
Т-лімфоцити CD3, %	49,75±1,10	47,50±0,93	-4,52	
Т-лімфоцити CD3, г/л	4,81±0,20	5,84±0,38	21,46	p<0,05
Т-хелпери CD4, %	30,25±0,96	28,00±0,80	-7,44	
Т-хелпери CD4, г/л	2,93±0,15	3,44±0,23	17,52	
Т-супресори CD8, %	19,50±0,63	19,50±0,38	0,00	
Т-супресори CD8, г/л	1,89±0,09	2,40±0,15	27,15	p<0,05
НК-клітини CD16, %	15,13±0,79	13,38±0,38	-11,57	p<0,05
НК-клітини CD16, г/л	1,48±0,11	1,65±0,11	11,77	
В-лімфоцити CD22, %	22,75±1,08	17,50±0,5	-23,08	p<0,001
В-лімфоцити CD22, г/л	2,21±0,17	2,16±0,17	-1,98	
Імунорегуляторний індекс, (CD4/CD8)	1,56±0,08	1,43±0,05	-8,47	

\*Достовірність зазначена тільки для p<0,05 та p<0,001, всі інші показники мають p≥0,05

Варто відзначити, що при оцінці показників імунного статусу спостерігалось чітке збільшення фагоцитарного числа (ФЧ) (120-та хв, на 439,87%), фагоцитарного індексу (ФІ12) (120-та хв, на 62,73%) при зменшенні даних показників на 30-ту хв ФЧ12 на 28,3% та ФІ12 на 27,21%, а також індексу завершення фагоцитозу (ІЗФ) (на 78,72%) та індексу співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ) (на 35,43%). Індекс співвідношення нейтрофілів до еозинофілів (ІСНЕ) та индекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ) не зазнали змін (табл. 8.8.).

Таблиця 8.8

Індексні показники імунного статусу організму лабораторних тварин,  $M \pm m$ 

Показник	Контроль	Досліджуваний показник	Зміна відносно контролю, %	Достовірність*
ФЧ12 (фагоцитарне число), 30-та хв, ум.од.	60,20±2,63	43,16±3,81	-28,30	p<0,001
ФЧ12 (фагоцитарне число), 120-та хв, ум.од.	13,00±1,39	70,18±2,91	439,87	p<0,001
ФІ12 (фагоцитарний індекс), 30-та хв, %	5,89±0,17	4,29±0,30	-27,21	p<0,001
ФІ12 (фагоцитарний індекс), 120-та хв, %	3,07±0,12	4,99±0,41	62,73	p<0,001
ІЗФ (індекс завершеності фагоцитозу)	3,47±0,32	0,74±0,03	-78,72	p<0,001
Індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ)	9,21±1,15	5,95±0,76	-35,43	p<0,05
Індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ)	9,66±1,32	7,11±0,76	-26,33	
Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ)	25,86±2,67	21,44±3,18	-17,09	

\*Достовірність зазначена тільки для p<0,05 та p<0,001, всі інші показники мають p≥0,05

Відомо що, нейтрофільні гранулоцити є ключовим елементом клітинного імунітету, які здатні завдяки рецепторам клітинної поверхні виявляти хімічні градієнти багатьох сполук, а також мігрувати в напрямку вогнищ інфекції або запалення, що відповідно корелює зі зростанням загальної кількості лейкоцитів на 21,76% на фоні впливу сполуки **8.3**. Окрім того імунотропний вплив

досліджуваної сполуки **8.3** проявляється також шляхом збільшення кількості еозинофілів на 35,38%, моноцитів на 52,09%, а також абсолютним та відносним лімфоцитозом на 26,87% та 5,02%. Варто відзначити, що показники лейкограми на фоні дії сполуки **8.3**, а також значення лейкограми контрольної групи у досліджуваних тварин залишилися в межах норми. Цікаво, що сполука **8.3** зумовлює зростання активності макрофагальної фагоцитарної системи, що супроводжується збільшенням фагоцитарного числа на 439,87 % на 120 хв. та вказує на збільшення поглинальної здатності нейтрофілів та пригнічення активності фагосом. Зменшення фагоцитарного індексу на 27,21% на 30-ту хвилину з подальшим збільшенням на 62,73 % на 120-ту хвилину вказує на початкове зменшення кількості нейтрофілів, яке через деякий час супроводжується суттєвим збільшенням внаслідок їх посиленого виходу з кісткового мозку на фоні впливу досліджуваної сполуки.

Вплив досліджуваної сполуки **8.3** на іншу ланку імунітету, а саме на рівень імуноглобулінів та інтерлейкінів у сироватці крові досліджуваних тварин засвідчив суттєве зменшення рівня IgA на 21,4% та збільшення рівня IgG на 21,2%. Рівні інших імуноглобулінів на фоні дії сполуки **8.3** зазнали також змін, особливо рівень IgE, який зменшився на 86,8%. (Таблиця 8.9.)

Таблиця 8.9

**Кількісні показники рівнів імуноглобулінів та інтерлейкінів у сироватці лабораторних тварин за умов дії сполуки 8.3**

Показник	Контроль	25 per	75 per	Сполука 8.3	25 per	75 per	Зміна %	p за t-критерієм
Імуноглобулін E, нг/мл	173,7	21,60	183,80	22,9	-4,10	40,80	-86,82	
Імуноглобулін E, нг/мл (повтор)	244,6	200,4	302,7	161,6	103,4	144,1	-33,93	
Імуноглобулін A, г/л	1,4			1,1			-21,43	p<0.05
Імуноглобулін M, г/л	0,55			0,48			-12,73	p>0.05
Імуноглобулін G, г/л	8,5			10,3			21,18	p<0.05
ІЛ-2, пг/мл	115,7	100,7	144	76,9	7,1	106	-33,54	
ІЛ-6, пг/мл	257,6	240,8	285,2	276,11	249,5	296,8	7,19	
TNF- $\alpha$ , пг/мл	44,5	28,6	58,2	26,2	21,1	27,6	-41,12	

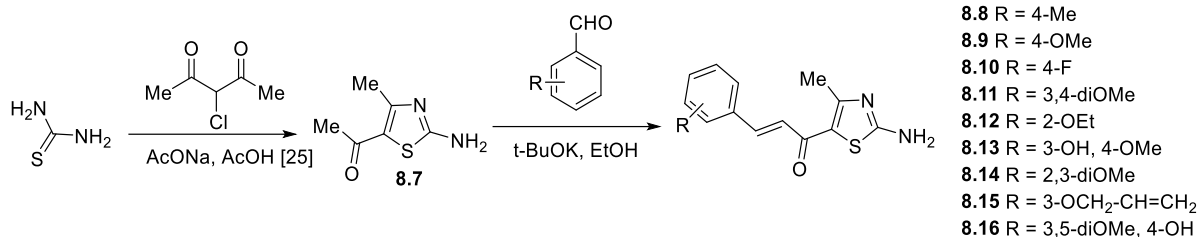
## 8.2. Синтез та перетворення похідних 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанону як потенційних біологічно активних сполук.

Серед різних похідних на основі тіазолу особливий увагу заслуговують похідні амінотіазолу, які виступають у якості активних бінуклеофілів в реакціях з електрофілами та дозволяють одержати різноманітні гетероциклічні системи [574]. Однієї із найбільш досліджених напрямків хімії амінотіазолу є реакції конденсації, зокрема конденсація Клайзена-Шмідта, реакція Манніха тощо, а також реакції гетероциклізації з  $\alpha,\beta$ -ненасиченими кетонами або  $\alpha$ -кетокислотами з утворенням конденсованих азолазінів [315, 332]. Відповідно, метою даного фрагменту нашої роботи став синтез похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону, а також дослідження їх на предмет протипухлинної та протимікробної активності.

Вихідну тіосечовину апробовано в реакції [2+3]-циклоконденсації як S,N-бінуклеофіл з 2-хлороацетилацетоном як еквівалентом діелектрофільного синтону  $[C_2]^{2+}$ , що дозволило одержати з задовільними виходами 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанон **8.7**. Реакції проводили в середовищі льодяної оцтової кислоти та присутності безводного ацетату натрію.

Для отримання потенційно біологічно активних сполук на основі тіазолу нами був здійснений синтез 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенонів **8.8-8.16** в умовах реакції альдольно-кротонової конденсації (реакція Кляйзена – Шмідта) в середовищі абсолютного етанолу та присутності основи як каталізатора (схема 8.2) [575]. Як вихідні речовини для синтезу було використано 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанон **8.1** який виявився ефективним реагентом в реакціях з ароматичними альдегідами, що дозволило модифікувати іліденовими субституентами положення 3 пропенонового фрагменту з утворенням сполук **8.8-8.16**. Встановлено, що найбільш дієвим є використання *трет*-бутилату калію як каталізатора в середовищі етанолу, що забезпечує кращі виходи і чистоту продукту в порівнянні з етанольним розчином гідроксиду калію.

Схема 8.2



Синтезовані сполуки **8.8-8.16** – дрібнокристалічні порошки світло-жовтого або оранжевого кольорів, розчинні при нагріванні в ДМФА, оцтовій кислоті, спиртах, нерозчинні у воді та діетиловому етері. Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук наведено в таблиці 8.10.

Таблиця 8.10

**Фізико-хімічні характеристики похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	N, %	С, %	Н, %	N, %
<b>8.8</b>	72	264-266	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OS	65,09	5,46	10,84	65,11	5,45	10,83
<b>8.9</b>	88	288-290	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	61,29	5,14	10,21	61,30	5,12	10,22
<b>8.10</b>	84	277-279	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OS	59,33	4,23	10,68	59,32	4,22	10,70
<b>8.11</b>	75	255-257	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	59,15	5,30	9,20	59,16	5,31	9,19
<b>8.12</b>	89	225-227	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	62,48	5,59	9,71	62,47	5,57	9,72
<b>8.13</b>	77	232-234	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	57,92	4,86	9,65	57,91	4,87	9,64
<b>8.14</b>	75	246-248	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	59,19	5,30	9,20	59,20	5,32	9,18
<b>8.15</b>	55	222-224	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	63,98	5,37	9,33	63,99	5,35	9,34
<b>8.16</b>	58	212-214	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	56,24	5,03	8,74	56,25	5,02	8,75

Структура та індивідуальність одержаних похідних **8.8-8.16** підтверджена методами <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії. Для синтезованих 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенонів характерними є сигнал метильної групи в положенні 4 у вигляді трьохпротонного синглету при 2,23-2,66 м.ч. Важливо відзначити, що для 3-ариліден-1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанонів **8.8-8.16** еноновий фрагмент проявляється у вигляді двох дублетів при 7,50-7,70 м.ч. з константою спінової взаємодії (KCCB) 15,0-15,6 Гц, що свідчить про його *транс*-

конфігурацію. Детальні спектральні характеристики сполук **8.8-8.16** наведені у таблиці 8.11. Приклад  $^1\text{H}$  ЯМР спектру сполуки **8.14** представлено на рис. 8.3.

Таблиця 8.11

**Спектральні характеристики похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
<b>8.8</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,33 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,65 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7,23 (д, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,50 (д, 1H, $J = 15,6$ Гц, =CH), 7,61 (д, 2H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 7,90 (д, 1H, $J = 15,6$ Гц, =CH), 9,12 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	259 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.9</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,10 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,80 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 6,98 (д, 2H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,11 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, =CH), 7,50 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, =CH), 7,68 (д, 2H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 7,90 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	275 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.10</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,65 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 6,93 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,21 (д, 1H, $J = 16,1$ Гц, =CH), 7,52 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, =CH), 7,69 (д, 2H, $J = 8,4$ Гц, аром.), 7,93 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	244 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.11</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,60 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,71 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3,92 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 7,13 (д, 1H, $J = 16,1$ Гц, =CH), 7,44 (д, 1H, $J = 16,1$ Гц, =CH), 7,60 (с, 1H, аром.), 7,88 (м, 2H, аром.), 7,90 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	305 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.12</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,28 (т, 3H, $J = 7,1$ Гц, $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 2,52 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,23 (кв, 2H, $J = 7,1$ Гц, $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 7,28-7,40 (м, 2H, аром.), 7,48-7,56 (м, 2H, аром., =CH), 7,69 (д, 1H, $J = 15,6$ Гц, =CH), 7,96 (т, 1H, $J = 7,4$ Гц, аром.), 8,96 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	289 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.13</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,90 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,80 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 5,88 (с, 1H, OH), 6,99 (д, 2H, $J = 8,1$ Гц, аром.), 7,22 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, =CH), 7,54 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, =CH), 7,68 (с, 1H, аром.), 7,90 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	291 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.14</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,40 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,80 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3,83 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 6,94-7,30 (м, 3H, аром., =CH), 7,67-7,91 (м, 2H, аром., =CH), 8,90 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	305 (M+H) <sup>+</sup>
<b>8.15</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,65 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 4,63 (шс, 2H, $\text{OCH}_2$ ), 5,29 (м, 1H, = $\text{CH}_2$ ), 5,42 (м, 1H, = $\text{CH}_2$ ), 6,07 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 7,00 (д, 1H, $J = 8,2$ Гц, аром.), 7,23-7,36 (м, 3H, =CH, аром.), 8,88 (д, 1H, $J = 15,3$ Гц, =CH), 7,90 (с, 1H, аром.), 9,02 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	301 (M+H) <sup>+</sup>

<b>8.16</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 2,65 (с, 3H, $\text{CH}_3$ ), 3,77 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3,82 (с, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 7,27 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, $=\text{CH}$ ), 7,64 (д, 1H, $J = 15,1$ Гц, $=\text{CH}$ ), 7,88 (с, 1H, аром.), 7,91 (с, 1H, аром.), 9,02 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	321 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$
-------------	---	-------------------------------------

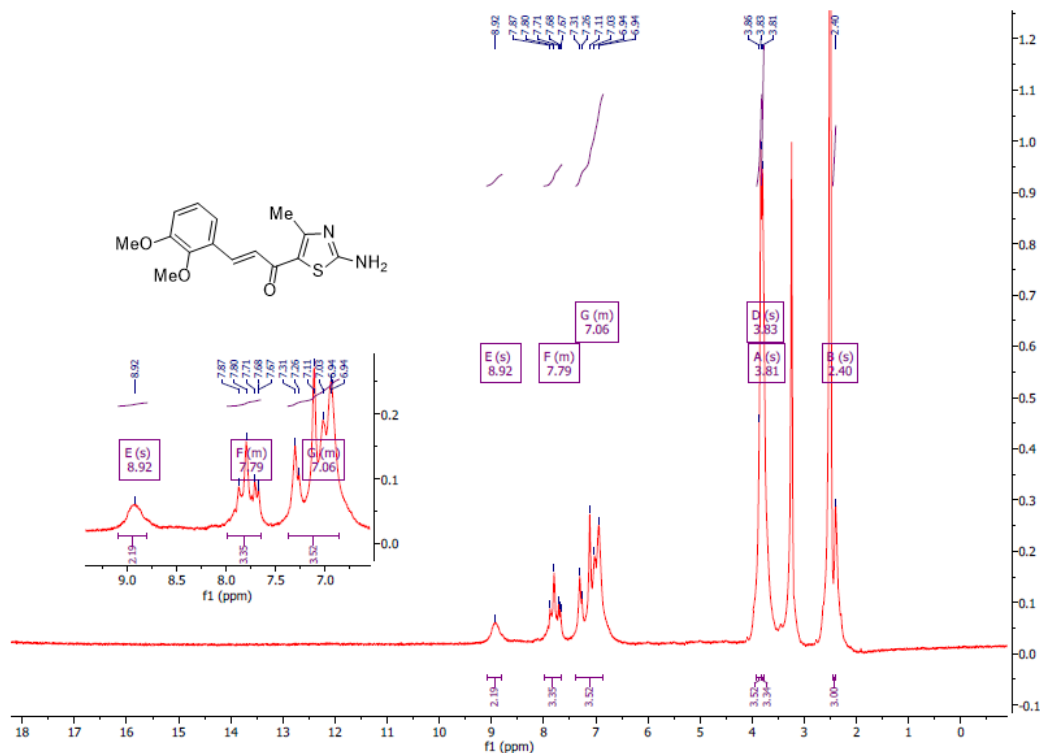


Рис. 8.3. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР сполуки **8.14**.

Варто відзначити, що сполуки, які містять у структурі еноновий фрагмент є об'єктами інтенсивного вивчення у сучасній медичній хімії, зумовлену здатністю до властивостей акцепторів Міхаеля [480]. Так, дані сполуки є основою для створення ряду протипухлинних агентів, завдяки здатності до активації Nrf2 як ключового фактору у пригніченні оксидативного або електрофільного стресу та інгібуванні канцерогенезу [576]. Відповідно, це стало однією із причин дослідження протипухлинної активності серед похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону, які вміщують еноновий фрагмент у структурі. Так, похідні **8.10**, **8.12**, **8.14-8.16** були відібрані на дослідження протипухлинної активності згідно програми DTP NCI Національного інституту раку США [233-236]. Результати скринінгу у концентрації  $10^{-5}$  моль/л наведені у таблиці 8.12 та додатках E1-E5.



Таблиця 8.12

**Результати скринінгу протипухлинної активності похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону на 60 лініях клітин (концентрація  $10^{-5}$ М)**

Сполука	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>8.10**</b>	89,31	54,94 ÷ 115,93	CCRF-CEM, лейкемія / 63,70 MOLT-4, лейкемія / 72,61 RPMI-8226, лейкемія / 67,06 A549/ATCC, недрібноклітинний рак легень / 71,38 HOP-92, недрібноклітинний рак легень / 58,78 PC-3, рак простати / 54,94
<b>8.12**</b>	98,76	73,23 ÷ 148,67	RPMI-8226, лейкемія / 73,75 HCT-15, рак прямої кишки / 72,23
<b>8.14**</b>	100,84	71,29 ÷ 121,70	CCRF-CEM, лейкемія / 71,29
<b>8.15**</b>	97,55	48,19 ÷ 146,13	CCRF-CEM, лейкемія / 48,19 HL-60(TB), лейкемія / 66,58 UO-31, рак нирок / 66,97 MCF7, рак молочної залози / 74,99
<b>8.16**</b>	99,16	58,81 ÷ 121,36	CCRF-CEM, лейкемія / 63,29 HOP-92, недрібноклітинний рак легень / 58,81 PC-3, рак простати / 71,77

\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результати мітотичної активності ряду найбільш чутливих ліній.

Результати скринінгу протипухлинного ефекту похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону не продемонстрували значного рівня активності щодо досліджуваних ліній ракових клітин у порівнянні із іншими класами поліфункціональних похідних на основі тіазолідинону/тіазолу представлених у інших розділах нашої роботи. Зокрема, синтезовані сполуки мали діапазон мітотичної активності в межах 48,19-148,67%. Варто відзначити, що було ідентифіковано лише сполуку **8.15**, що володіла помірним рівнем цитотоксичності щодо лейкемії лінії CCRF-CEM (GP = 48,19%).

Сполуки **8.13** та **8.16** були також оцінені на предмет антимікробної активності. Так, за результатами скринінгу сполуки **8.13** та **8.16** показали помірну антимікробну активність із діаметрами зон пригнічення росту в межах від 10,0 до 20,0 мм. Діаметри зон пригнічення росту найбільш активної сполуки **8.16** були наступними: *S. aureus* (16 мм), *P. aeruginosa* (14 мм), гриби роду *Candida* (20 мм), що значно перевищують значення контролю та підтверджують актуальність подальшого дослідження даного виду активності для зазначеної сполуки. Детальні результати антимікробної активності досліджуваних сполук представлені в таблицях 8.13 та 8.14.



Таблиця 8.14

**Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) і мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) сполук 8.13 та 8.16**

№	Мікроорганізм	МКГ / мл			
		МІК		МБК	
		8.13	8.16	8.13	8.16
1	<i>S.aureus</i> * (4)	-	250	-	500
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1/6)	250	-	500	-
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (23/26)	-	125	-	250

**Примітка:** \*Антибіотикорезистентні штами

Для синтезованих сполук було оцінено параметри ADME за допомогою онлайн-сервісу SwissADME Швейцарського інституту біоінформатики [293]. Дані сполуки володіли оптимальними фізико-хімічними параметрами згідно правил Ліпінського необхідних для потенційних лікоподібних молекул (Таблиця 8.15).

Таблиця 8.15

**Параметри лікоподібності похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону (8.8-8.16) оцінені онлайн-сервісом SwissADME**

Сполука	Молекулярна маса	Число зв'язків, що обертаються	Число акцепторів протону	Число донорів протону	LogP	Параметр біодоступності
<b>8.8</b>	258,34	3	2	1	3,11	0,55
<b>8.9</b>	274,34	4	3	1	2,68	0,55
<b>8.10</b>	262,30	3	3	1	3,00	0,55
<b>8.11</b>	304,36	5	4	1	2,60	0,55
<b>8.12</b>	288,36	5	3	1	3,00	0,55
<b>8.13</b>	290,34	4	4	1	2,32	0,55
<b>8.14</b>	304,36	5	4	1	2,66	0,55
<b>8.15</b>	300,38	6	3	1	3,23	0,55
<b>8.16</b>	320,36	5	5	2	2,26	0,55

### 8.3 Дослідження біологічної активності похідних тіазолідинону та їх аналогів з фрагментом диклофенаку у структурі.

Численні літературні дані повідомляють про ефективність гібрид-фармакофорного та структуро-орієнтованого підходів у створенні поліфармакологічних та мультитаргентних агентів, що ґрунтуються на поєднанні двох або більше різних фармакофорних фрагментів у одній молекулі підвищуючи активність один одного за рахунок синергічної дії [577, 578]. Відомо, що диклофенак натрію є ефективним нестероїдним протизапальним засобом (НПЗЗ), який використовується у терапії запальних та больових станів і має окрім того, широкий спектр інших видів активностей, зокрема антимікробну [579], протипухлинну [549] та антиоксидантну [550]. Відповідно, метою даного фрагменту нашої роботи було вивчення *in vivo* протизапальної та *in vitro* протипухлинної та антитрипаносомної активності гібридних молекул на основі тіазолідинону та його структурних аналогів, що вміщують 2-(2,6-дихлорофеніламіно)-фенілацетамідний фрагмент (Рис. 8.4). Скринінгові дослідження були проведені для похідних 2-(2-((2,6-дихлорофеніл)аміно)феніл)-N'-((3-(заміщених)-4-тіазолідин-5-іліден)метил)ацетогідразиду **8.17-8.25** та 2-[2-(2,6-дихлорофеніламіно)-феніл]-N-{5-[3,5-діарил-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен]-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл}-ацетамідів **8.26-8.32**, які було синтезовано за описаними раніше методиками [580-582].

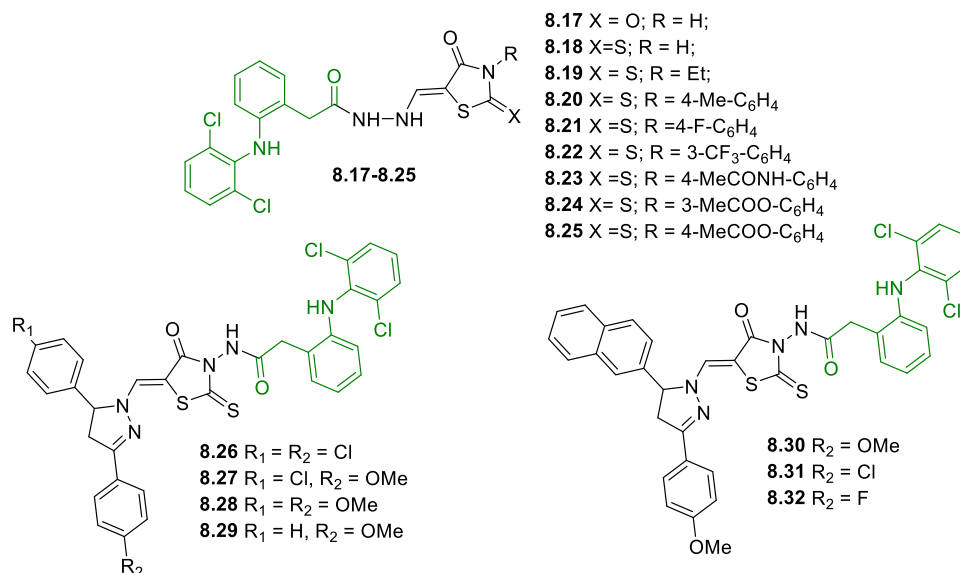


Рис. 8.4. Структури похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку, використані для скринінгу біологічної активності.

Для похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі (сполуки **8.18**, **8.21-8.23**, **8.29**, **8.30**) було проведено скринінг протипухлинної активності згідно програми DTP NCI [233-236]. Результати первинного скринінгу у концентрації  $10^{-5}$  моль/л наведені у таблиці 8.16 та додатках Е6-Е11.

Таблиця 8.16

Сумарні результати прескринінгу протипухлинної активності похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі на 60 лініях клітин (концентрація  $10^{-5}$ М)

Сполука	Середня мітотична активність, %	Діапазон мітотичної активності, %	Найчутливіші лінії ракових клітин / % росту*
<b>8.18**</b>	91,81	56,82÷114,98	CCRF-CEM, лейкемія / 56,82 U251, рак ЦНС / 68,16
<b>8.21**</b>	93,79	76,52÷117,53	MDA-MB-468, рак молочної залози / 76,52
<b>8.22**</b>	90,42	54,38÷115,43	SR, лейкемія / 64,58 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / 54,38 HCT-116, рак прямої кишки / 57,71 BT-549, рак молочної залози / 67,30
<b>8.23**</b>	99,47	72,93÷118,74	SR, лейкемія / 72,93
<b>8.29**</b>	99,30	79,35÷121,08	UO-31, рак нирок / 79,35

8.30	22,40	-49,77÷69,97	CCRF-CEM, лейкемія / 6,24 HL-60 (ТВ), лейкемія / -27,37 K-562, лейкемія / 10,63 RPMI-8226, лейкемія / -10,09 NCI-H460, недрібноклітинний рак легень / 9,42 NCI-H522, недрібноклітинний рак легень / -15,38 SF-539, рак ЦНС / -16,88 SNB-75, рак ЦНС / -15,72 M14, меланома / -25,06 MDA-MB-435, меланома / -49,77 OVCAR-3, рак яйників / 2,15 NCI/ADR-RES, рак яйників / 9,39 A498, рак нирок / -0,47 RXF 393, рак нирок / -8,96 MDA-MB-468, рак молочної залози / 7,11
------	-------	--------------	---

\*\* У зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результати мітотичної активності ряду найбільш чутливих ліній.

У основному 2-((2,6-дихлорофеніл)аміно)феніл)-*N*'-((3-(заміщених)-4-тіазолідин-5-іліден)метил)ацетогідразида (сполуки **8.18**, **8.21-8.23**) не показали значного рівня активності щодо досліджуваних ліній клітин раку. Тим не менш, сполука **8.18** проявила незначний цитостатичний ефект щодо лейкемії лінії CCRF-CEM (GP% = 56,82%), а сполука **8.22** проявила помірну активність щодо недрібноклітинного раку легень лінії NCI-H522 (GP% = 54,38%) і раку товстої кишки лінії HCT-116 (GP% = 57,71%). З іншого боку, серед похідних 5-(3,5-діарил-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен)-2-тіоксо-4-тіазолідинонів з фрагментом диклофенаку у структурі, а саме похідного **8.30** було ідентифіковано високий рівень протипухлинної активності. Так, значення середньої мітотичної активності (GP<sub>mean</sub>) для сполуки **8.30** становило 22,40%. Особливо високу цитотоксичну дію сполука **8.30** продемонструвала щодо ліній лейкемії HL-60(ТВ) та RPMI-8226 (GP = -27,37 та -10,09%, відповідно), недрібноклітинного раку легень NCI-H522 (GP = -15,38%), ліній клітин раку ЦНС SF-539 та SNB-75 (GP = -16,88 та -15,72 %, відповідно), а також меланоми ліній M14 та MDA-MB-435 (GP = -25,06 та -49,77%, відповідно). Окрім того, на основі високого рівня

протипухлинної активності у концентрації  $10^{-5}$  моль/л для сполуки **8.30** було проведено скринінг у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні в двох тестуваннях, як наведено в Таблиці 8.17.

Таблиця 8.17

**Протипухлинна активність 2-[2-(2,6-дихлорофеніламіно)-феніл]-N-{5-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен]-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл}-ацетаміду **8.30** у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні**

Тип раку	Лінія клітин раку	GI <sub>50</sub> , μM	SI (GI <sub>50</sub> )	TGI, μM	SI (TGI)	LC <sub>50</sub> , μM	SI (LC <sub>50</sub> )
Лейкемія	CCRF-CEM	0,14/0,39	5,07/2,79	>100,0/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
	HL-60(TB)	0,32/0,50	2,21/2,18	1,23/6,77	67,43/4,20	>100,0/>100,0	-/-
	K-562	0,35/0,45	2,02/2,42	>100,0/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
	MOLT-4	0,37/0,59	0,91/1,84	>100,0/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
	RPMI-8226	0,28/0,33	2,53/3,30	0,74/4,26	112,09/6,68	>100,0/>100,0	-/-
	SR	0,19/0,30	3,73/3,63	-/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
	<b>MG_MID</b>	<b>0,27/0,42</b>	<b>2,62/2,59</b>	<b>50,32/68,50</b>	<b>1,64/0,41</b>	<b>&gt;100/&gt;100</b>	<b>-/-</b>
Недрібно клітинний рак легень	A549/ATCC	0,42/0,60	1,69/1,81	>100,0/22,2	-/1,28	>100,0/>100,0	-/-
	EKVX	2,28/0,92	0,31/1,18	>100,0/37,8	-/0,75	>100,0/>100,0	-/-
	HOP-62	0,86/1,07	0,82/1,01	>100,0/24,9	-/1,14	>100,0/>100,0	-/-
	HOP-92	0,74/2,15	0,95/0,50	>100,0/28,5	-/0,99	>100,0/>100,0	-/-
	NCI-H266	2,30/0,56	0,30/1,94	>100,0/10,4	-/2,73	>100,0/58,1	-/1,27
	NCI-H23	0,76/0,82	0,93/1,32	>100,0/21,9	-/1,29	>100,0/88,1	-/0,84
	NCI-H322M	0,44/0,74	1,61/1,47	>100,0/65,6	-/0,43	>100,0/>100,0	-/-
	NCI-H460	0,38/0,39	1,86/2,79	>100,0/11,5	-/2,47	>100,0/45,1	-/1,64
NCI-H522	0,26/0,37	2,73/2,94	-/4,76	-/5,97	>100,0/>100,0	-/-	
<b>MG_MID</b>	<b>0,93/0,84</b>	<b>0,76/1,29</b>	<b>&gt;100/25,28</b>	<b>-/1,12</b>	<b>&gt;100/87,92</b>	<b>-/0,84</b>	
Рак товстої кишки	COLO 205	1,89/-	0,37/-	>100,0/-	-/-	>100,0/-	-/-
	HCC-2998	1,24/1,55	0,57/0,70	>100,0/11,1	-/2,56	>100,0/75,9	-/0,97
	HCT-116	0,44/0,51	1,61/2,13	>100,0/15,7	-/1,81	>100,0/53,8	-/1,37
	HCT-15	0,44/0,49	1,61/2,22	>100,0/42,4	-/0,67	>100,0/>100,0	-/-
	HT29	2,29/2,31	0,31/0,47	>100,0/6,91	-/4,11	>100,0/26,6	-/2,79
	KM12	0,38/0,35	1,86/3,11	>100,0/11,2	-/2,54	>100,0/40,2	-/1,84
	SW-620	0,41/0,41	1,73/2,65	>100,0/27,7	-/1,02	>100,0/>100,0	-/-
<b>MG_MID</b>	<b>1,01/0,93</b>	<b>0,70/1,17</b>	<b>&gt;100/19,16</b>	<b>-/1,48</b>	<b>&gt;100/66,08</b>	<b>-/1,12</b>	
Рак ЦНС	SF-268	0,98/0,66	0,72/1,65	>100,0/23,8	-/1,19	>100,0/90,5	-/0,82
	SF-295	1,17/0,45	0,61/2,42	>100,0/10,7	-/2,65	>100,0/39,5	-/1,87
	SF-539	0,25/0,31	2,84/3,51	0,75/1,67	110,6/17,04	>100,0/20,6	-/3,60
	SNB-19	0,51/0,79	1,39/1,37	>100,0/22,0	-/1,29	>100,0/>100,0	-/-
	SNB-75	0,20/0,32	3,55/3,40	0,86/2,26	96,45/12,59	>100,0/24,5	-/3,02
	U251	0,39/0,40	1,82/2,72	>100,0/13,5	-/2,10	>100,0/37,3	-/1,99
<b>MG_MID</b>	<b>0,58/0,48</b>	<b>1,22/2,27</b>	<b>66,93/12,32</b>	<b>1,23/2,31</b>	<b>&gt;100/52,06</b>	<b>-/1,42</b>	
Меланома	LOX IMVI	0,55/0,55	1,29/1,98	>100,0/29,1	-/0,97	>100,0/>100,0	-/-
	MALME-3M	0,62/2,88	1,14/0,37	>100,0/24,0	-/1,18	>100,0/70,6	-/1,05
	M14	0,34/0,47	2,08/2,31	2,88/10,1	28,80/2,81	>100,0/92,0	-/0,80
	MDA-MB-435	0,22/0,21	3,22/5,19	0,56/0,53	148,12/53,69	7,21/2,53	13,65/29,33
	SK-MEL-2	-/2,95	-/0,36	>100,0/18,8	-/1,51	>100,0/>100,0	-/-
	SK-MEL-28	5,86/3,37	0,12/0,32	>100,0/25,0	-/1,13	>100,0/82,5	-/0,89
	SK-MEL-5	0,46/0,50	1,54/2,18	>100,0/13,6	-/2,09	>100,0/41,3	-/1,79
	UACC-257	1,37/10,9	0,51/0,1	>100,0/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
UACC-62	0,49/0,74	1,44/1,47	>100,0/19,2	-/1,48	>100,0/59,4	-/1,24	



	<b>MG_MID</b>	<b>1,10/2,50</b>	<b>0,64/0,43</b>	<b>78,16/26,70</b>	<b>1,06/1,06</b>	<b>89,69/72,03</b>	<b>1,09/1,03</b>
Рак яєчників	IGROV1	0,48/0,71	1,47/1,53	>100,0/17,7	-/1,60	>100,0/59,1	-/1,25
	OVCAR-3	0,34/0,33	2,08/3,30	>100,0/0,95	-/29,9	>100,0/20,9	-/3,55
	OVCAR-4	0,82/1,74	0,86/0,62	>100,0/23,0	-/1,23	>100,0/65,1	-/1,14
	OVCAR-5	0,83/3,63	0,85/0,30	>100,0/20,8	-/1,36	>100,0/66,0	-/1,12
	OVCAR-8	0,50/0,94	1,42/1,15	>100,0/>100,0	-/-	>100,0/>100,0	-/-
	NCI/ADR-RES	0,40/0,43	1,77/2,53	>100,0/11,9	-/2,39	>100,0/>100,0	-/-
	SK-OV-3	0,84/-	0,84/-	>100,0/-	-/-	>100,0/-	-/-
	<b>MG_MID</b>	<b>0,60/1,29</b>	<b>1,18/0,84</b>	<b>&gt;100/29,05</b>	<b>-/0,97</b>	<b>&gt;100/68,51</b>	<b>-/1,08</b>
Рак нирок	786-0	0,49/0,51	1,44/2,13	>100,0/14,5	-/1,96	>100,0/57,8	-/1,28
	A498	0,30/-	2,36/-	0,99/-	83,78/-	>100,0/-	-/-
	ACHN	0,72/0,64	0,98/1,70	>100,0/51,1	-/0,55	>100,0/>100,0	-/-
	CAKI-1	0,33/0,45	2,15/2,42	>100,0/16,0	-/1,77	>100,0/50,8	-/1,46
	RXF 393	0,22/0,35	3,22/3,11	0,83/1,61	99,93/17,67	>100,0/22,3	-/3,32
	SN12C	0,49/0,85	1,44/1,28	>100,0/24,0	-/1,18	>100,0/>100,0	-/-
	TK-10	-/3,57	-/0,30	>100,0/43,2	-/0,65	>100,0/>100,0	-/-
	UO-31	0,29/0,42	2,44/2,59	>100,0/3,02	-/9,42	>100,0/23,4	-/3,17
	<b>MG_MID</b>	<b>0,35/1,13</b>	<b>2,02/0,96</b>	<b>75,21/21,91</b>	<b>1,10/1,29</b>	<b>&gt;100/64,9</b>	<b>-/1,14</b>
Рак простати	PC-3	0,66/0,76	1,07/1,43	>100,0/29,1	-/0,97	>100,0/>100,0	-/-
	DU-145	0,38/0,42	1,86/2,59	68,4/10,8	1,21/2,63	>100,0/32,8	-/2,26
	<b>MG_MID</b>	<b>0,52/0,59</b>	<b>1,36/1,84</b>	<b>84,2/19,95</b>	<b>0,98/1,42</b>	<b>&gt;100/66,4</b>	<b>-/1,11</b>
Рак молочної залози	MCF7	0,36/0,36	1,97/3,02	>100,0/25,5	-/1,11	>100,0/>100,0	-/-
	MDA-MB-231/ATCC	1,61/1,60	0,44/0,68	>100,0/19,7	-/1,44	>100,0/70,3	-/1,05
	HS 578T	0,35/0,48	2,02/2,27	>100,0/14,2	-/2,00	>100,0/>100,0	-/-
	BT-549	0,57/0,80	1,24/1,36	>100,0/18,5	-/1,53	>100,0/52,1	-/1,42
	T-47D	0,50/1,23	1,42/0,88	>100,0/97,6	-/0,29	>100,0/>100,0	-/-
	MDA-MB-468	0,56/0,52	1,26/2,09	>100,0/11,7	-/2,43	>100,0/62,4	-/1,18
	<b>MG_MID</b>	<b>0,65/0,83</b>	<b>1,09/1,31</b>	<b>&gt;100/31,20</b>	<b>-/0,91</b>	<b>&gt;100/80,8</b>	<b>-/0,91</b>
<b>MG_MID</b>		<b>0,71/1,09</b>		<b>82,95/28,46</b>		<b>98,45/74,23</b>	

На основі результатів скринінгу у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні сполука **8.30** продемонструвала високий рівень інгібування росту досліджуваних ліній клітин раку із середніми значеннями  $GI_{50}$  та TGI 0,71/1,09 та 82,95/28,46 мкМ, відповідно. Розрахунок індексу селективності (SI), отриманий шляхом ділення повної панелі MG-MID (мкМ) сполуки **8.30** на її окрему субпанель, розглядався як міра селективності сполуки. Сполука **8.30** у цьому дослідженні виявилася неселективною як на рівнях  $GI_{50}$ , так і на рівнях TGI (індекси селективності 0,12-5,07/0,10-5,19 та 1,21-148,12/0,29-53,69, відповідно). Тим не менш, дана сполука продемонструвала певний профіль селективності щодо деяких окремих клітинних ліній на рівні TGI. Так, показники селективності для RPMI-8226 (лейкемія), SF-539 і SNB-75 (рак ЦНС), MDA-MB-435 (меланома), OVCAR-3 (рак яєчників), а також ліній A498, RXF 393 та UO-31 (рак нирки) становили 28,80-148,12/6,68-53,69.

Варто відзначити, що для роданін-піразолінових гібридної молекули з 2-(2,6-дихлорофеніламіно)фенілацетамідним фрагментом **8.30** було також проведено аналіз за допомогою сервісу PRISM Національного інституту раку США (NCI) з метою додаткового встановлення механізмів реалізації протипухлинної активності [443]. PRISM-аналіз сполуки **8.30** дозволив ідентифікувати 2-(3,4-дигідроксифеніл)-6-гідрокси-3,5,7-триметоксихроман-4-он з найвищим показником коефіцієнту кореляції, який становив 0.81 (рис. 8.5), а також ряд інших сполук з показниками кореляції 0.78 (рис. 8.6).

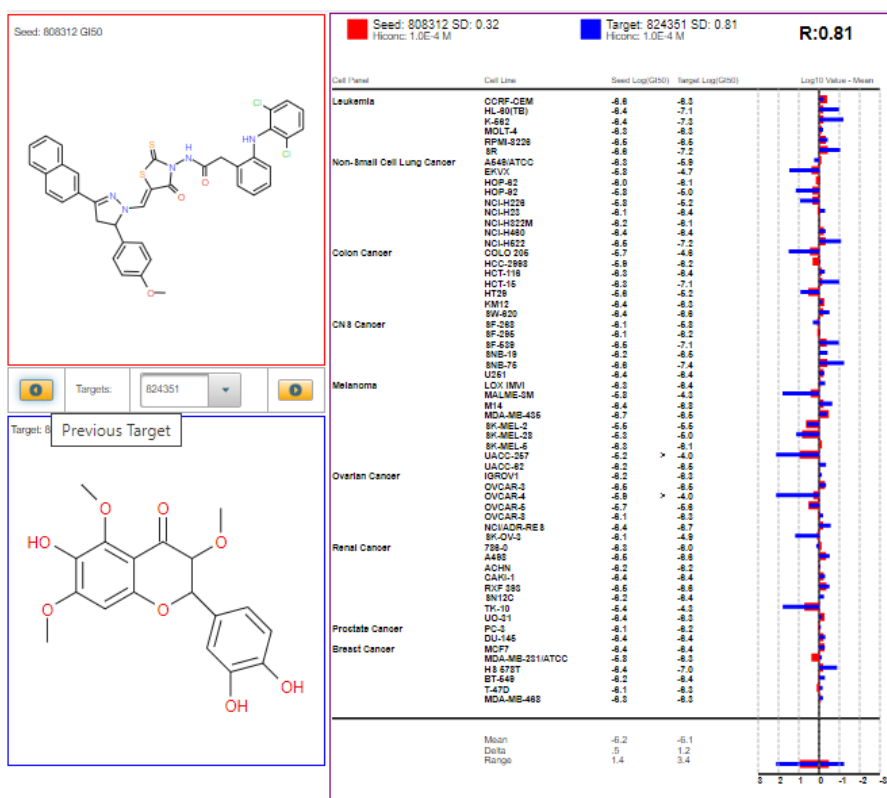


Рис. 8.5. Візуалізація NCI-60 кореляції сервісом PRISM сполуки **8.30** та 2-(3,4-дигідроксифеніл)-6-гідрокси-3,5,7-триметоксихроман-4-оном.

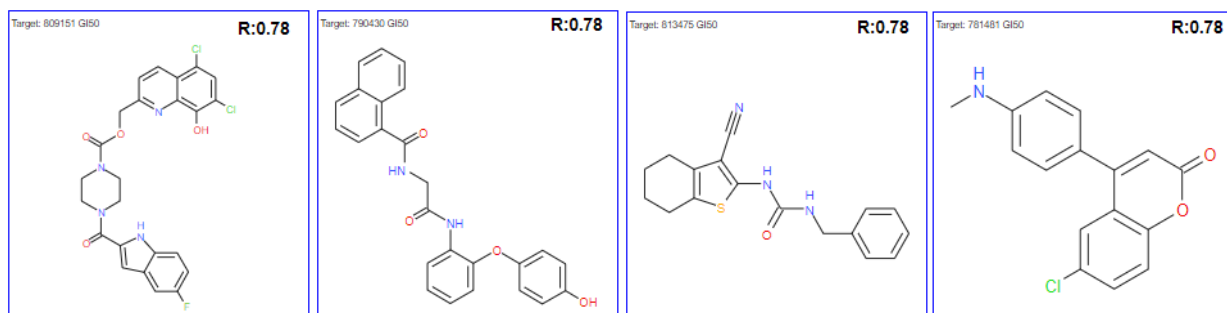


Рис. 8.6. Сполуки з високими показниками кореляції NCI-60 PRISM до похідного **8.30**.

Цікаво, що для похідного 2-(3,4-дигідроксифеніл)-6-гідрокси-3,5,7-триметоксихроман-4-ону як представника класу флавонів, що володіє найвищими показниками кореляції, встановлено на рівні з протипухлинною також високу активність поглинання вільних радикалів [583]. Це може свідчити про можливий механізм реалізації протипухлинної активності роданін-піразолін-диклофенак гібридної молекули **8.30** та даного флавону шляхом зниження рівня оксидативного стресу та генерування активних форм кисню, оскільки відомо, що у більшості випадків при онкологічній патології дані показники є суттєво вищими від норми. З іншого боку серед представників гібридних молекул з фрагментами диклофенаку структури є теж ідентифіковано доволі велика кількість агентів з антиоксидантною та протипухлинною активностями [584, 585].

Відповідно, аналізуючи результати скринінгу протипухлинної активності похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі можна дійти висновку, що введення додаткового фрагменту піразолу є сприятливим на прояв даного виду активності, що корелює із даними численних досліджень тiazолідинон-піразольних гібридних молекул як потенційних протипухлинних агентів [586].

Продовжуючи скринінгові дослідження нами було досліджено на протитрипаносомну активність *in vitro* щодо *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*) для похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку **8.17-8.32**. Загалом досліджувані сполуки пригнічували ріст паразитів у мікромольних концентраціях (табл. 8.18). Так, серед 2-((2,6-дихлорофеніл)аміно)феніл)-*N*'-((3-(заміщених)-4-тіазолідин-5-іліден)метил)ацетогідразидів було виявлено найбільш активні сполуки **8.18** та **8.20** зі значеннями  $IC_{50}$  4,80 та 7,06 мкМ, відповідно. Аналіз взаємозв'язку структура-активність досліджуваних сполук доводить відсутність чіткої кореляції впливу різних замісників у положеннях С3 та С5 тiazолідинового на рівень антитрипаносомної активності (рис. 8.7 А). Окрім того, варто зазначити, що гідразиновий фрагмент у положенні С5 базового ядра виявляв значно менший вплив на активність і селективність дії щодо

збудників роду *Trypanosoma*, ніж описані раніше похідні 4-тіазолідинон-2-гідразону [489].

Похідні 5-(3,5-діарил-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен)-2-тіоксо-4-тіазолідинону з фрагментом диклофенаку **8.26-8.32** продемонстрували незначне пригнічення росту досліджуваних збудників (табл. 8.18). Серед досліджуваних сполук даного ряду найбільш активними були похідні **8.26** та **8.28** зі значеннями  $IC_{50}$  15,0 та 17,2 мкМ, відповідно. Результати SAR-аналізу доводять, що рівень антитрипаносомної активності у ряді похідних 5-(3,5-діарил-4,5-дигідропіразол-1-ілметилен)-2-тіоксотіазолідин-4-ону залежить від наявності замісників у діарил-4,5-дигідропіразольному фрагменті положенні C5 тіазолідинонового ядра (рис. 8.7 Б). З іншого боку, встановлено, що введення фрагменту диклофенаку в положенні N3 базового ядра загалом є несприятливим на прояв даного виду активності порівняно з раніше повідомленими гібридними молекулами на основі піразолін-тіазолідинону [490, 491].

Таблиця 8.18

**Антитрипаносомна активність похідних тіазолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі щодо *Trypanosoma brucei brucei***

Сполука	<i>Tbb</i> $IC_{50}$ , мкМ
<b>8.17</b>	36,30 ± 0,45
<b>8.18</b>	4,80 ± 0,08
<b>8.19</b>	40,40 ± 0,45
<b>8.20</b>	7,06 ± 0,12
<b>8.21</b>	43,60 ± 0,45
<b>8.22</b>	41,30 ± 0,41
<b>8.23</b>	35,80 ± 0,43
<b>8.24</b>	>85,2
<b>8.25</b>	35,40 ± 0,47
<b>8.26</b>	15,0 ± 0,12
<b>8.27</b>	29,0 ± 0,45
<b>8.28</b>	17,2 ± 0,15
<b>8.29</b>	72,6 ± 0,43
<b>8.30</b>	49,3 ± 0,35
<b>8.31</b>	67,3 ± 0,47
<b>8.32</b>	68,8 ± 0,41
Пентамідин, нМ	2,40 ± 0,06

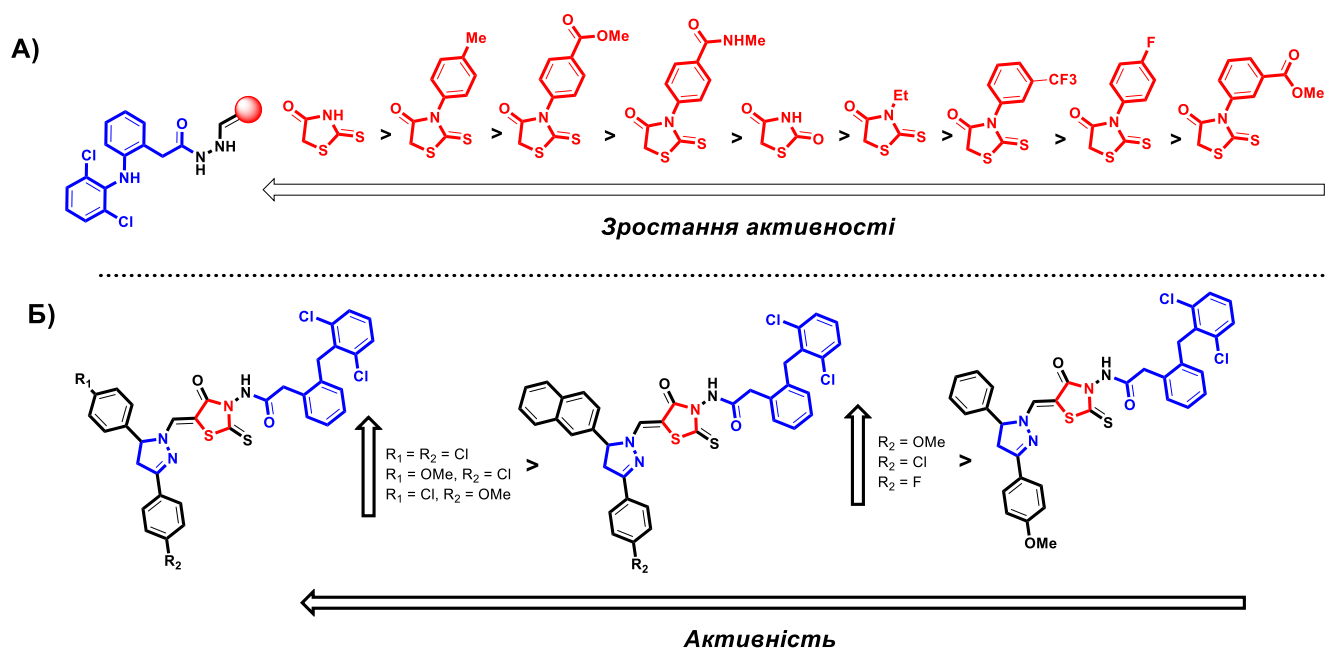


Рис. 8.7. Особливості кореляції структура – протитрипаносомна дія в ряду похідних тiazолідинону та їх аналогів з фрагментом диклофенаку.

Для ряду похідних 2-((2,6-дихлорофеніл)аміно)феніл)-*N'*-((3-(заміщених)-4-тіазолідин-5-іліден)метил)ацетогідрозиду (сполуки **8.20**, **8.21**, **8.23**, **8.25**) вивчали антиексудативну активність *in vivo* на основі карагенінової моделі запального набряку лап білих щурів [262]. Усі досліджувані сполуки продемонстрували різний показник пригнічення запальної реакції спричинений введенням карагеніну (табл. 8.19). За результатами скринінгових досліджень встановлено, що сполука **8.20** не показала значного зменшення приросту об'єму лапи зі значенням показника пригнічення запальної на рівні 29,2% порівняно з контрольною групою. З іншого боку сполуки **8.21**, **8.23** та **8.25** проявили пригнічення запальної реакції в діапазоні 39,5-40,8 %, що є співмірним з дією препаратів порівняння диклофенаку натрію та кеторолаку трометаміну. При загальному аналізі кореляції «структура – антиексудативна дія» було встановлено, що рівень активності досліджуваних сполук залежить від природи замісників у положенні 3 тіазолідинового ядра. Зокрема, наявність метилбензоатних або *N*-метилбензамідних замісників у положенні С-3 базового гетероциклу покращувала антиексудативну активність порівняно з іншими

сполуками даного класу. Так, для 5-енгідразин-4-тіазолідинонів антиексудативна активність зростає в ряді наступних замісників: 4-Me-Ph < 4-MeCOO-Ph < 4-MeCONH-Ph < 4-F-Ph.

Таблиця 8.19

**Результати дослідження антиексудативної активності 2-((2,6-дихлорофеніл)аміно)феніл)-N'-((3-(заміщених)-4-тіазолідин-5-іліден)метил)ацетогідрозидів 8.20, 8.21, 8.23, 8.25**

Сполука або еталонний лікарський засіб	Приріст об'єму лапи (мл)	Показник пригнічення запальної реакції, %
Контроль	2,14 ± 0,035	-
<b>8.20</b>	1,58 ± 0,035	29,2
<b>8.21</b>	1,34 ± 0,030	40,8
<b>8.23</b>	1,36 ± 0,035	40,0
<b>8.25</b>	1,39 ± 0,040	39,5
<b>Диклофенак натрію</b>	1,25 ± 0,025	43,3
<b>Кеторолак трометамін</b>	1,41 ± 0,040	37,8

Продовжуючи вивчення антиексудативної активності похідних тіазолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі нами було проведено дослідження даного виду активності серед структурно споріднених гетероциклів, а саме S-алкільованих похідних 1,3,4,-оксадіазол-2-тіолу **8.33-8.42** (рис. 8.8) [587]. Синтез даних сполук були було детально висвітлено у попередніх роботах виконаних на кафедрі фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького [580].

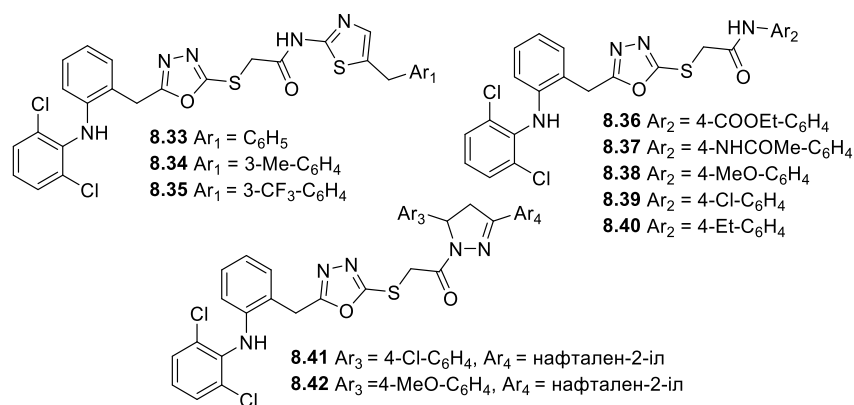


Рис. 8.8. Структури S-алкільованих похідних 1,3,4-оксадіазол-2-тіолу використані для вивчення антиексудативної активності.

Згідно результатів скринінгу антиексудативної активності у ряді S-алкільованих похідних 1,3,4-оксадіазол-2-тіолу було встановлено, що практично всі досліджувані сполуки (за винятком похідних **8.33**, **8.41** та **8.42**) проявили помітний рівень активності. Окрім того, було ідентифіковано три високоактивні сполуки, а саме **8.37**, **8.38** та **8.40** дія яких співмірна в умовах експерименту з активністю еталонних лікарських засобів – диклофенаку натрію та кетанову (табл. 8.20). Результати вивчення антиексудативної активності ряду S-алкільованих похідних 1,2,4-оксадіазолу з фрагментом диклофенаку в молекулах **8.33-8.42** дозволяють встановити деякі закономірності кореляції «структура-антиексудативна активність». Зокрема, найвищий рівень активності спостерігається для похідних оксадіазолу алкільованих N-заміщеними 2-хлороацетамідами ароматичних амінів (сполуки **8.37**, **8.38**, **8.40**), що містять 4-етил-, 4-метоксифенільний, чи 4-N-ацетиламінофенільний фрагменти в амідному залишку. Так, для сполуки **8.37** показник пригнічення запальної реакції становив 43,7 %, для сполуки **8.38** – 42,4 %, а для сполуки **8.40** – 44,6 %, що є еквівалентним зі значеннями препаратів порівняння. З іншого боку, похідні оксадіазолу одержані шляхом алкілюванням хлороацетамідами на основі 2-аміно-5-бензилтіазолів та 3,5-діарилпіразолінів показало зниження рівня антиексудативного ефекту.

Таблиця 8.20

**Результати дослідження антиексудативної активності S-алкільованих похідних 1,3,4-оксадіазол-2-тіолу**

Сполука або еталонний лікарський засіб	Доза мг/кг	LD <sub>50</sub> мг/кг	Показник пригнічення запальної реакції, %
<b>8.33</b>	50	550	13,0%
<b>8.34</b>	50	660	41,5%
<b>8.35</b>	50	720	40,3%
<b>8.36</b>	50	560	30,1%
<b>8.37</b>	50	680	43,7%
<b>8.38</b>	50	710	42,4%
<b>8.39</b>	50	640	41,6%
<b>8.40</b>	50	730	44,6%
<b>8.41</b>	50	600	19,3%
<b>8.42</b>	50	580	26,3%
<b>Диклофенак натрію</b>	8	-	43,3%
<b>Кеторолак триметамін</b>	10	-	37,8%

8.4 Дослідження *in silico* лікоподібності та параметрів токсичності 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів.

Продовжуючи вивчення піразоліл-тіазолідинових гібридних молекул нами було здійснено прогнозування лікоподібності та токсичності з використанням веб-інструментів SwissADME та ProTox II нових 5-заміщених-2-(3-метил-5-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)тіазол-4(5*H*)-онів **8.43-8.47**, синтез яких було повідомлено нами раніше (рис. 8.9) [588]. На основі результатів оцінки активності сполук **8.43-8.47** базою даних SwisAdme встановлено, що досліджувані сполуки у всіх випадках мають задовільні фізико-хімічні параметри (молекулярна маса, ліпофільність, розчинність, полярність), а SwissADME радар біодоступності підтвердив лікоподібність з показником 0,55 одиниць (табл. 8.21, додатки E12-E19).



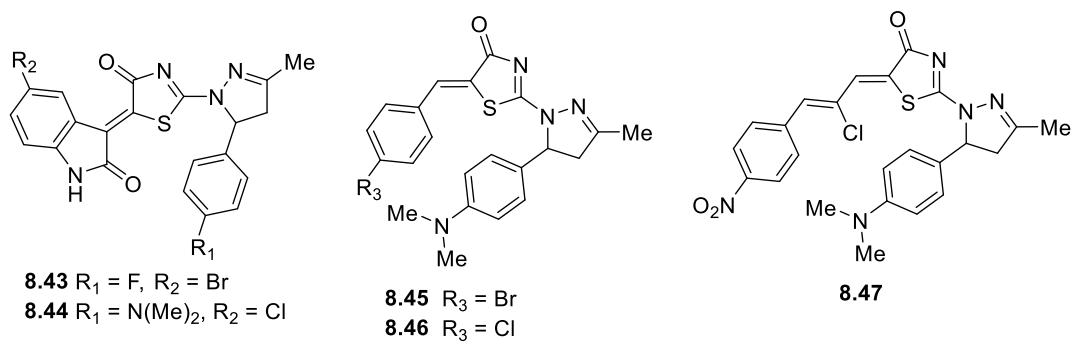


Рис. 8.9. Структури 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів використанні для прогнозування параметрів лікоподібності та токсичності.

Таблиця 8.21

**Фізико-хімічні показники, параметри ADME, фармакокінетичні властивості, параметри лікоподібності сполук 8.49-8.53**

	8.43	8.44	8.45	8.46	8.47
<i>Фізико-хімічні властивості</i>					
Молекулярна маса	485,33	465,96	469,40	424,95	495,98
Кількість «важких» атомів	30	32	29	29	34
Кількість ароматичних «важких» атомів	12	12	12	12	12
Число зв'язків, що обертаються	2	3	4	4	6
Число донорів протону	1	1	0	0	0
Число акцепторів протону	5	4	3	3	5
Молярна рефрактерність	132,24	143,80	136,16	133,47	151,22
TPSA Å <sup>2</sup>	99,43	102,67	73,57	73,57	119,39
Узгоджена log Po/w	3,70	3,30	4,27	4,19	3,76
Правило Ліпінського	Так	Так	Так	Так	Так
<i>Фармакокінетичні параметри</i>					

Гастроінтестинальна абсорбція	Висока	Висока	Висока	Висока	Висока
Проникність через ГЕБ	Ні	Ні	Так	Так	Ні
P-гр субстрат	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
Log K <sub>p</sub> (SP) (cm/s) (шкірна проникність)	-6,94	-6,85	-5,90	-5,68	-5,92
Параметр біодоступності	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55

Для сполук **8.43-8.47** також було проведено тест BOILED-Egg (додатки Д17-Д21). Даний тест дозволяє оцінити пасивну шлунково-кишкову абсорбцію (НІА) і проникнення через гематоенцефалічний бар'єр (ВВВ) залежно від положення молекул у референсі WLOGP- проти -TPSA. Біла область - для високої ймовірності пасивного всмоктування шлунково-кишковим трактом, а жовта область (жовток) - для високої ймовірності проникнення через гематоенцефалічний бар'єр. Варто відзначити, що на основі проведеного тесту BOILED-Egg похідні **8.43-8.47** мають високу гастроінтестинальну абсорбцію, а сполуки **8.45** та **8.46** також високу здатність до проходження гематоенцефалічного бар'єру.

Варто відзначити, що аналізуючи фізико-хімічні ознаки сполук-хітів **8.43-8.47** спостерігався також ряд негативних характеристик, а саме помірна розчинність у воді. Окрім того, розгляд розрахунків параметрів медичної хімії, а саме структурних PAINS, Brenk та Lead-likeness, які складаються із токсичних, хімічно-реакційних, метаболічно нестабільних фрагментів або які властивості з незадовільною фармакокінетикою показали, що сполуки також мають певні структурні порушення через наявність енонового фрагменту у структурі. З іншого боку, дані показники є не критичними згідно сучасних критеріїв створення лікарських засобів і можуть бути оптимізовані.

Додаткове прогнозування пероральної токсичності за допомогою сервісу Pro Tox II показало, що сполуки **8.43-8.47** відноситься до IV класу токсичності (LD<sub>50</sub> 540-1000 мг/кг) (табл. 8.22). З іншого боку в результаті прогнозування

токсичності, особливо похідне **8.57** може мати потенційно небажані ефекти, а саме канцерогенність, імунотоксичність, мутагенність та цитотоксичність і, потребує більш ретельної попередньої оцінки *in vivo*.

Таблиця 8.22

### Результати прогнозування токсичності сполук 8.49-8.53 сервісом ProTox II

Сполука	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Клас токс.	Нер.	Cancer.	Immynotox.	Mutagen.	Cytotox.
<b>8.43</b>	1000	4	Активна	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна
<b>8.44</b>	500	4	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна
<b>8.45</b>	600	4	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна
<b>8.46</b>	540	4	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна	Інактивна
<b>8.47</b>	800	4	Активна	Активна	Активна	Активна	Інактивна

Нер.: гепатотоксичність; Cancer.: канцерогенність; Immynotox.: імунотоксичність; Mutagen.: мутагенність; Cytotox.: цитотоксичність;

8.5. Пошук агентів з потенційною антиконвульсантною, психотропною та іншими видами активності серед функціональнозаміщених похідних на основі тiazолідинону/tiazолу

У контексті сучасної медичної хімії пошук нових агентів, що впливають на протікання психічних процесів у центральній нервовій системі людини є особливо актуальним. На сьогоднішній день на ринку наявні більшість психотропних препаратів, які створені багато десятиліть тому, а створення нових з даним видом активності налічує окремі одиниці. Аналізуючи структуру психотропних агентів більшість з них відносяться до класу гетероциклічних сполук, за винятком структурних аналогів біогенних амінів. Відповідно, пошук нових сполук з психотропною активністю серед похідних на основі тiazолідинону/tiazолу є актуальним та перспективним. Варто зазначити, серед похідних тiazолідинону дослідження психотропних ефектів представлене в основному вивченням антиконвульсантної дії, а інші види психотропної

активності практично не представлені у науковій літературі. Вибір матриці тiazолідинону для подальшого скринінгу даного виду активності, частково обумовлений тим, що їх структурні аналоги, а саме похідні гідантоїну (фенітоїн, етотоїн, мефенітоїн, фосфенітоїн) та інші лікарські засоби на основі п'ятичленних циклічних імідів є одними із найбільш ефективних протиепілептичних груп препаратів. З іншого боку, актуальність вибору сполук на основі тiazолу/тiazолідинону ґрунтується на тому, що вони лежить в основі лікарських засобів з протизапальною дією, а саме мелоксикаму та дарбуфелону, які проявляли виражений антиконвульсантний ефект, що особливо актуальним є у контексті впливу на патогенез нейрозапалення [589, 590].

#### 8.5.1. Оцінка протисудомної активності дарбуфелону, його структурних аналогів та деяких похідних на основі 4-тiazолідинону.

Близько 70 мільйонів людей у світі страждають на епілепсію та інші судомні стани, що становить майже 1% людської популяції [591]. На сьогоднішній день наявні схеми та протоколи лікування даного виду патології часто є недосконалими, а наявність суттєвих побічних ефектів лікарських засобів часто нівелюють їх терапевтичну цінність, тому дослідження та розробка інноваційних протисудомних агентів є актуальною проблемою сучасної медичної та фармацевтичної хімії [592-595]. Останнім часом значна увага в пошуку можливих біомішеней для корекції епілепсії та пов'язаних із нею станів була зосереджена на нейрозапальному процесі, який виникає внаслідок багатьох причин, таких як нейроінфекція, інсульту та травми голови, і може ініціювати запальний каскад у центральній нервовій системі [596, 597]. Нейрозапалення є предиктором підвищеної судомної готовності [598] і ключовим тригером патогенних механізмів епілепсії, таких як активація мікроглії та мікрогліальних медіаторів запалення [599], експресія циркулюючих імунних клітин [600], активація цитокінів і хемокінів [601], утворення вільних радикалів [602], підвищення регуляції циклооксигеназ-1 і 2 (ЦОГ-1/2) тощо [603, 604]. НПЗП з

різними механізмами дії є потужним інструментом у сучасному дизайні потенційних антиконвульсантів [605, 606]. Так, для низки НПЗП із різних хімічних груп була оцінено та встановлено антиконвульсантну активність на різних моделях судом, що свідчить про їх перспективу для подальших досліджень у даному напрямку (рис. 8.10) [607-612].

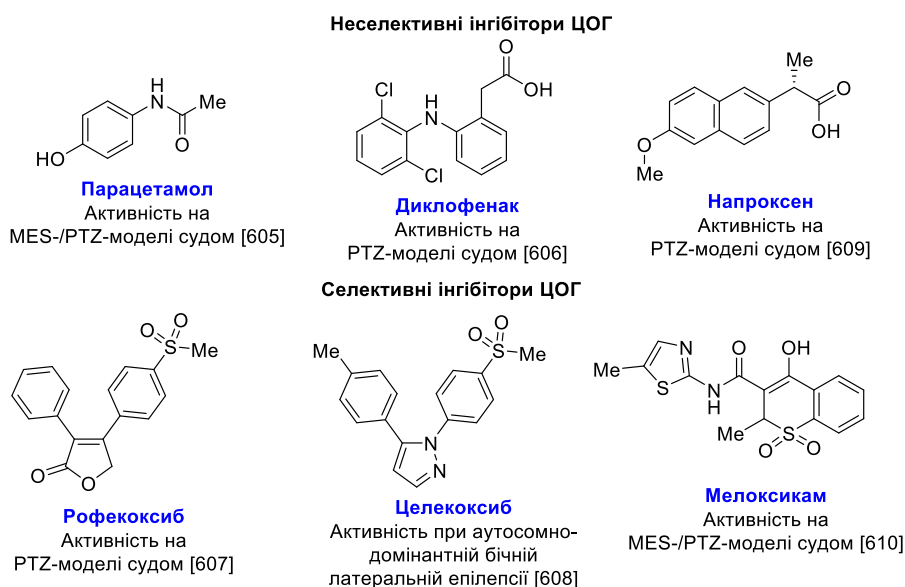


Рис. 8.10. Протисудомні властивості ряду нестероїдних протизапальних препаратів.

Повідомляється, що дві ізоформи ферменту ЦОГ – ЦОГ-1 (конститутивна) і ЦОГ-2 (індуцибельна), які каталізують синтез запальних протаноїдів та є основними біомішенями для дії НПЗП є також потенційними цілями у лікуванні епілепсії та інших судомних нападів [604, 606, 613].

У даному контексті особливу увагу заслуговує дарбуфелон **8.57** – НПЗП, як подвійний інгібітор ЦОГ-2 і 5-ліпоксигенази (5-ЛОГ), який представляє інтерес для вивчення як потенційний протисудомний агент. Дарбуфелон належить до похідних на основі 4-тіазолідинону, серед гібридних молекул яких ідентифіковано агенти з протисудомною та іншими видами біологічної активності, включно із сполуками із поліфармакологічним профілем [355]. Зокрема у попередніх дослідженнях було ідентифіковано сполуку **8.55** (5-(4-нітробензиліден)-2-(тіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-он), що володіла високою

протисудомною активністю [266, 614]. Так, сполука **8.55** виявила протисудомну активність на максимальній електрошоковій (MES) та пентилентетразоловій (PTZ) моделях судом, а в дозах 50–150 мг/кг мала однакову активність з еталонними препаратами вальпроатом натрію і карбамазепіном [266, 614].

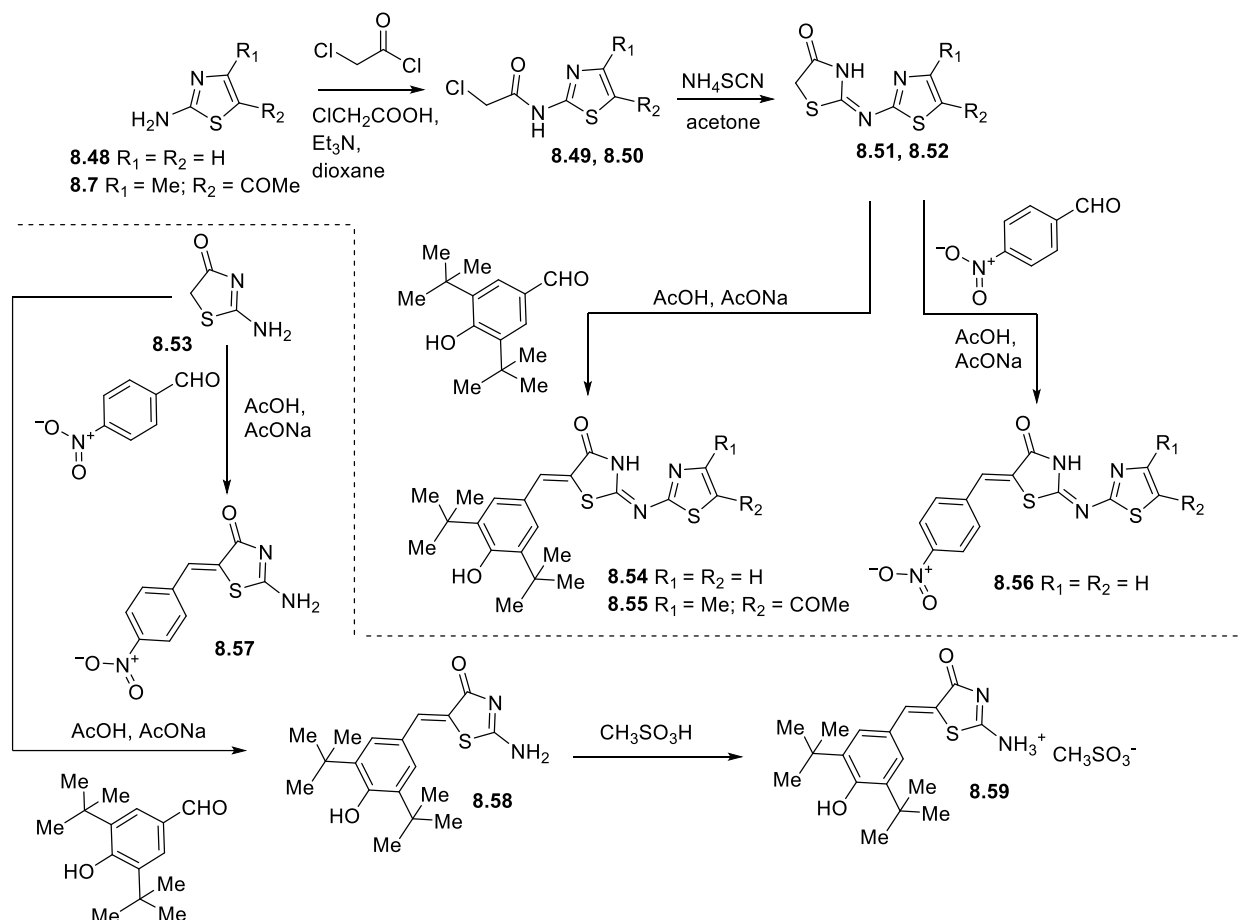
Враховуючи вищенаведене метою даного фрагменту нашої роботи стало дослідження антиконвульсантної активності дарбуфелону та структурних аналогів на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом [615].

Загальна схема синтезу цільових сполук базувалась на використанні двох підходів: (1) побудова 4-тіазолідинового циклу з подальшою модифікацією в положенні С-5 базового гетероциклу; (2) використання попередньо синтезованих похідних 4-тіазолідину для функціоналізації в положенні С-5 в умовах реакції Кньовенагеля (схема 8.3).

У якості вихідних сполук було використано *N*-(тіазол-2-іл)- та *N*-(5-ацетил-4-метилтіазол-2-іл)-2-хлорацетаміди (**8.49**, **8.50**), які були одержані з відповідних похідних амінотіазолу **8.7**, **8.48** та хлорацетилхлориду в реакції ацилювання при нагріванні протягом 30 хвилин зумовлену слабкою реакційною здатністю аміногруп. Відповідні хлорацетаміди **8.49**, **8.50** були використані у якості еквівалентів діелектрофільного синтону  $[C_2]^{2+}$  у реакції [2+3]-циклоконденсації з роданідом амонію в середовищі ацетону, що дозволило одержати відповідні 2-(тіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-они **8.51**, **8.52**. В подальшому метиленактивні похідні 4-тіазолідину **8.51-8.53** були трансформовані в умовах реакції Кньовенагеля (середовище – оцтова кислота; каталізатор – безводний ацетат натрію) з ароматичними альдегідами у відповідні 5-ариліліденпохідні **8.54-8.58**. Синтез дарбуфелону метансульфонату **8.59** був здійснений шляхом взаємодії дарбуфелону **8.58** та метансульфонової кислоти у середовищі тетрагідрофурану, що дозволило з одержати похідне покращеною розчинністю у воді. Синтез та фізико-хімічні властивості та спектральні характеристики дарбуфелону **8.58** та його метансульфонатної солі **8.59**, а також сполуки **8.56** було повідомлено раніше [616, 617], та, відповідно, нами було здійснено ресинтез даних сполук

згідно опублікованих методик для подальшого скринінгу їх протисудомної активності.

## Схема 8.3



Синтезовані сполуки **8.54**, **8.55**, **8.57** - кристалічні порошки жовтого або коричневого кольорів, розчинні в ДМФА, діоксані, оцтовій кислоті, при нагріванні в спиртах, нерозчинні в бензолі, толуолі, гексані, діетиловому етері та воді. Фізико-хімічні характеристики одержаних похідних наведено в таблиці 8.23.

Таблиця 8.23

**Фізико-хімічні характеристики 5-ариліденпохідних 2-(тіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-ону 8.54, 8.55 та 2-аміно-тіазол-4(5H)-ону 8.57**

Сполука	Вихід, %	Т.пл., °С	Брутто-формула	Обчислено			Знайдено		
				С, %	Н, %	Н, %	С, %	Н, %	Н, %
<b>8.54</b>	72	170-172	$C_{21}H_{25}N_3O_2S_2$	60,69	6,06	10,11	60,60	6,00	10,19
<b>8.55</b>	80	158-160	$C_{24}H_{29}N_3O_3S_2$	61,12	6,20	8,91	61,20	6,30	8,82
<b>8.57</b>	80	>240	$C_{10}H_7N_3O_3S$	48,00	3,22	16,70	48,07	3,32	16,80

Структура синтезованих похідних підтверджена елементним аналізом, методами  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії. Спектральні характеристики сполук наведені у таблиці 8.24.

Таблиця 8.24

**Спектральні характеристики 5-ариліденпохідних 2-(тіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-ону та 2-аміно-тіазол-4(5H)-ону 8.54, 8.55, 8.57**

Сполука	Спектр ЯМР, $\sigma$ (м.ч.), $J$ (Гц)	LC-MS, $m/z$
<b>8.54</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,39, 1,41 (2*с, 18H, t-Bu), 7,38 (м, 1H, тіазол.), 7,45 (с, 1H, =CH), 7,60 (м, 1H, тіазол.), 7,64 (м, 2H, аром.), 8,00 (с, 1H, OH), 9,80, 12,21, 12,51 (3*с, 1H, NH), $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 30,3, 34,8, 117,6, 125,1, 127,3, 128,7, 133,7, 140,3, 144,6, 148,0, 162,7, 168,6, 192,4	416 [M+H] <sup>+</sup>
<b>8.55</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 1,26 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1,39 (с, 18H, t-Bu), 1,51 (с, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,38, 7,45 (2*с, 1H, =CH), 7,66 (с, 2H, аром.), 7,99 (с, 1H, OH), 9,80 (с, 1H, NH), $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 37,5 (CH <sub>2</sub> ), 19,0, 35,0, 35,2, 39,6, 114,9, 123,5, 130,5, 132,0, 133,4, 143,8, 153,5, 165,1, 168,7, 174,5, 197,2	472 [M+H] <sup>+</sup>
<b>8.57</b>	$^1\text{H}$ ЯМР: $\delta$ 7,68 (с, 1H, =CH), 7,81 (д, 2H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 8,32 (д, 2H, $J = 8,5$ Гц, аром.), 9,34, 9,62 (2*с, 2H, NH <sub>2</sub> ), $^{13}\text{C}$ ЯМР: $\delta$ 129,4, 131,6, 135,4, 139,0, 145,8, 152,1, 180,3, 185,0	250 [M+H] <sup>+</sup>

Фізико-хімічні властивості дарбуфелону метансульфонату **8.59** та його структурних аналогів **8.54, 8.55, 8.57** визначали на оцінку відповідності правилам Ліпінського та Вебера з використанням платформи SwissAdme Швейцарського інституту біоінформатики [293] (табл. 8.25).

Таблиця 8.25

**Параметри лікоподібності дарбуфелону метансульфонату 8.59 та його структурних аналогів 8.54, 8.55, 8.57 згідно правил Ліпінського та Вебера.**

Препарат/ сполуки	Правила Ліпінського				Правила Вебера		Невідповідність критеріям
	MW ≤ 500	Log P ≤ 5	NHD ≤ 5	NHA ≤ 10	NBR ≤ 10	TPSA ≤ 140	
Дарбуфелону метансульфонат	332,46	2,88	2	3	3	100,98	0



<b>8.59</b>							
<b>8.54</b>	415,57	3,41	2	4	5	128,12	0
<b>8.55</b>	471,64	3,81	2	5	6	145,19	1
<b>8.57</b>	249,25	1,19	1	4	2	126,57	0

NHD: число донорів протону; NHA: число акцепторів протону; NBR: число зв'язків, що обертаються; TPSA: загальна площа полярної поверхні.

Протисудомну активність дарбуфелону метансульфонату **8.59** та його структурних аналогів **8.54**, **8.55**, **8.57** оцінювали на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом, результати досліджень представлені у таблиці 8.26 та рисунку 8.11. Загалом PTZ-індукована кіндлінг-модель дозволяє вивчити вплив лікарських засобів і досліджуваних сполук на судомний стан, який найбільш наближений до реальних патофізіологічних і клінічних особливостей епілептогенезу [267] шляхом повторної стимуляції допорогової інтенсивності, яка викликає вогнищеві судомні розряди та генералізовані судомні приступи [618]. У даному дослідженні еталонний лікарський засіб – натрію вальпроат показав виражену протисудомну дію, максимально запобігаючи судомам у тварин. Водночас інший референтний лікарський засіб фенітоїн у дозі 40 мг/кг впливав лише на латентний період нападів і посилював їх у 1,73 рази. Крім того, вплив фенітоїну на зниження летальності був невиразним (лише 19%), що можна пояснити переважною блокадою потенціалзалежних натрієвих каналів [267], тобто недостатньою податливістю PTZ-індукованого механізму судом.

*Таблиця 8.26*

**Протисудомна активність еталонних лікарських засобів,  
целекоксибу, подвійного інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону  
метансульфонату **8.59** та його структурних аналогів **8.54**, **8.55**, **8.57** у тесті  
на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом**

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість клоніко-тонічних нападів на мишу	Миші з судомами, %		Тяжкість судом, бали	Летальність, %
			Клонічні	Тонічні		
CP(PTZ)	90	2,29 ± 0,52	100	85,71	5,57 ± 0,43	85,71
SV	300	0,00 ± 0,00**	0**	0**	0**	0**
PHТ	40	1,17 ± 0,17	100	66,67	5,00 ± 0,63	66,67
CXB	4	2,00 ± 0,37	100	66,67	4,67 ± 0,62	50,00
DAR	100	1,17 ± 0,17	100	100	4,00 ± 0,00*	0,00**
<b>8.54</b>	100	1,00 ± 0,00*	100	33,33*	3,33 ± 0,21**	0,00**
	75	0,83 ± 0,17*	83,33**	16,67**	2,67 ± 0,56**	0,00**

<b>8.55</b>	100	1,67 ± 0,56	83,33**	50,00	3,67 ± 0,84*	16,67**
<b>8.57</b>	100	1,00 ± 0,00*	100	66,67	4,33 ± 0,56	33,33*
	53	1,00 ± 0,63	50,00**	33,33*	2,50 ± 1,20*	33,33*

Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ), кількість мишей = 6; СР(PTZ), контрольна патологія; SV, натрій вальпроат; РНТ, фенітоїн; СХВ, целекоксиб; DAR, дарбуфелону метансульфонат; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 порівняно з групою контрольної патології (СР (PTZ)).

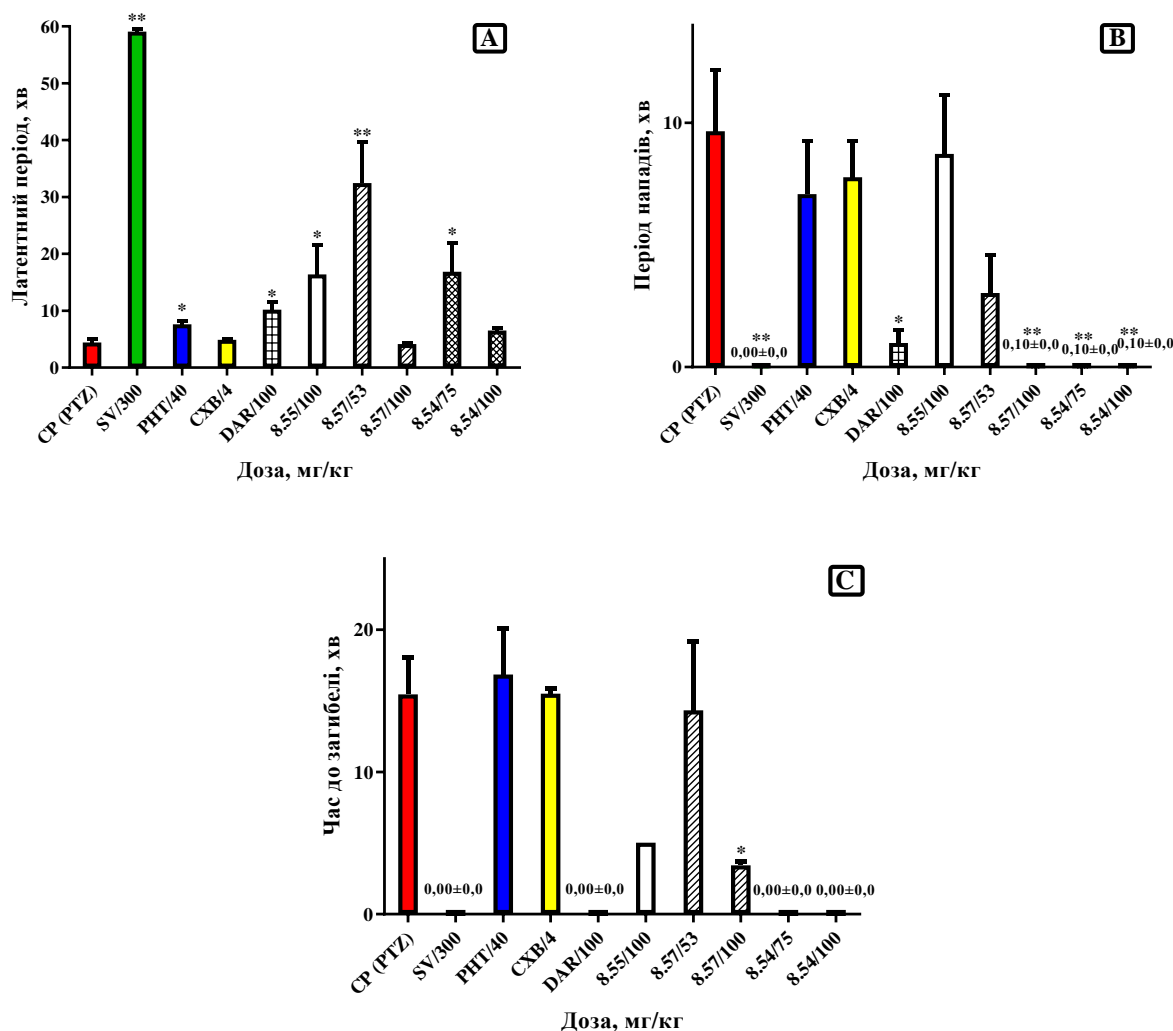


Рис. 8.11. Антиконвульсантна активність еталонних лікарських засобів, целекоксибу, подвійного інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону метансульфонату **8.59** та його структурних аналогів **8.54**, **8.55**, **8.57** у тесті на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом: (а) латентний період до першої судоми; (б) тривалість (період) нападів; (с) час до загибелі. Дані представлено як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ), кількість мишей = 6;. СР(PTZ), контрольна патологія; SV, натрій вальпроат; РНТ, фенітоїн; СХВ, целекоксиб; DAR, дарбуфелон метансульфонат; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 порівняно з групою контрольної патології (СР (PTZ)).

Застосування селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу в дозі 4 мг/кг призвело до помірної протисудомної активності в тесті PTZ. В умовах експерименту при введенні целекоксибу незначно (на 19,04%) зменшувалася частка тварин з тонічними судомами, знизилася летальність тварин (на 35,71%), а латентний період був співмірний зі значеннями контрольної патології (CP(PTZ)).

Водночас застосування подвійного інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону метансульфонату **8.59** в дозі 100 мг/кг призводило до подовження латентного періоду в 2,3 рази, зменшувало тяжкість нападів (на 28,18%), зменшувало тривалість періодів нападу у 9,76 рази і продемонструвала абсолютний захисний ефект щодо летальності (0%) порівняно з групою CP(PTZ). Окрім того, введення дарбуфелону метансульфонату призводило до подовження латентного періоду в 2,09 рази і зменшувало тривалість судомного періоду в 7,86 рази в порівнянні з групою тварин, яка отримувала целекоксиб. Враховуючи більш виражену протисудомну дію дарбуфелону метансульфонату, логічно припустити, що в механізмі судомного синдрому важливу роль відіграють як простагландини, так і лейкотрієни. Таким чином, подвійний вплив на COX-2/5-ЛОГ може бути більш ефективним компонентом наявності протисудомного ефекту, ніж лише інгібування синтезу простагландинів.

Введення сполуки **8.57** у дозі 100 мг/кг ( $p < 0,05$ ) призводило до зменшення кількості пароксизмів на одну тварину в 2,29 рази. Крім того, тривалість конвульсивного періоду була значно зменшена порівняно з групою CP(PTZ) ( $p < 0,01$ ) і групою, яка отримувала фенітоїн ( $p < 0,05$ ). Очікувана тривалість життя тварин до загибелі достовірно ( $p < 0,05$ ) зменшилась у 4.49 рази. Проте летальність тварин зменшилась до 52,38 % ( $p < 0,05$ ). Після введення сполуки **8.57** у дозі 53 мг/кг (еквівалентно дозі 40 мг/кг фенітоїну) латентний період перших судом достовірно ( $p < 0,01$ ) збільшувався у 7,36 рази, кількість клонічних і тонічних пароксизмів зменшилась до 50% і 52,38%, відповідно, а також зменшилась тяжкість судом у 2,23 рази і летальність на 52,38%.

Сполука **8.57** володіла протисудомною активністю в обох використаних дозах (100 і 53 мг/кг). Зокрема спостерігалось зменшення кількості тварин з клонічними судомами на 100,00% (для дози 100 мг/кг) та на 50,00% (для дози 53 мг/кг),  $p < 0,01$ , а також зменшення тривалості судомного періоду  $0,10 \pm 0,00$  хв (для дози 100 мг/кг) і  $7,08 \pm 3,80$  хв (для дози 53 мг/кг), при  $p < 0,05$ .

Введення сполуки **8.55** призводило до статистично достовірного ( $p < 0,01$ ) зменшення кількості тварин із клонічними судомами на 16,67%, а також зменшення кількості мишей із тонічними судомами порівняно з групою CP(PTZ). Крім того, введення сполуки **8.55** значно зменшило кількість тварин з тонічними судомами на 50% ( $p < 0,01$ ) і на 16,67% з клонічними нападами порівняно з даними, отриманими в поточному експерименті для групи дарбуфелону метансульфонату. Після введення сполуки **8.55** тяжкість нападів статистично ( $p < 0,05$ ) зменшувалась у 1,52 рази, а летальність знижувалась до 69,04 % порівняно з групою CP(PTZ).

Сполука **8.54** виявилася найбільш активною в експерименті і проявила виражену протисудомну дію в обох дозах (100 і 75 мг/кг), що була еквівалентною дозі дарбуфелону метансульфонату. Введення похідного **8.54** в обох зазначених дозах сприяло повному виживанню тварин, скорочувало тривалість нападів і зменшувало вираженість пароксизмів. Застосування сполуки **8.54** (у дозі 100 мг/кг) достовірно ( $p < 0,05$ ) призводило до зменшення кількості тварин із тонічними судомами. Водночас введення сполуки в дозі 75 мг/кг зменшувало відсоток тварин як з тонічними (на 69,04%), так і з клонічними (на 16,67%) судомами порівняно з групою CP(PTZ). Крім того, сполука **8.54** в обох дозах знижувала відсоток тварин як з клонічними, так і з тонічними пароксизмами та демонструвала абсолютний захисний ефект проти летальності (0%) порівняно з групою, яка отримувала дарбуфелон метансульфонат.

Слід зазначити, що дія сполук **8.55** та **8.57** зменшувала час, який призводив до летальності досліджуваних тварин в дозі 100 мг/кг (рисунки 8.11 С). Це спостереження не означає, що ці сполуки підвищують ризик летальності, оскільки, як показано в таблиці 8.26, вони зменшували тяжкість нападів і значно

знижували інтегральний показник – смертність. Зокрема, лише одна та дві миші, із шести в кожній групі, загинули при введенні сполук **8.55** та **8.57**, відповідно. Крім того, лише окремі тварини характеризувались судомним синдромом, який був більш важким, ніж у інших тварин. Це призводило до досить швидкої смерті, час якої не перевищувала коливань відповідного показника інших груп. У інших тварин, які отримували **8.55** та **8.57**, напади припинялися досить швидко.

У серії дарбуфелону метансульфонату та його структурних аналогів спостерігалася наступна послідовність зниження протисудомної активності: **8.54** (75 мг/кг) > дарбуфелону метансульфонат **8.59** (100 мг/кг) > **8.54** (100 мг/кг) > **8.55** (100 мг/кг) > **8.57** (53 мг/кг і 100 мг/кг). При аналізі взаємозв'язку структура-активність у ряді досліджуваних сполук було встановлено, що присутність тiazол-2-іламінного замісника в положенні С-2 і 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксибензиліденового фрагменту в положенні С-5 в 4-тіазолідиноновому ядрі є найбільш оптимальними для прояву протисудомної активності.

У цьому дослідженні було встановлено, що селективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб, подвійний інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелон метансульфонат та його похідні значно знижували PTZ-індуковані судоми у мишей. Підтверджено визначну роль нейрозапалення в процесі епілептогенезі [596-598]. У даному фрагменті нашої роботи підтверджено помірний протисудомний ефект целекоксибу, що відповідає літературним даним про захисну роль інгібіторів ЦОГ-2 у моделях PTZ [610, 619, 620]. Це стимулює подальші дослідження в області синтезу нових протисудомних агентів з протизапальними властивостями, особливо серед похідних на основі 4-тіазолідинону з поліфармакологічними властивостями.

Наступний фрагмент нашого дослідження полягав на вивченні антиконульсантної активності іншого похідного на основі 4-тіазолідинону, а саме сполуки **8.56** на аналогічній пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом [621]. Результати дослідження для сполуки **8.56** наведені в таблиці. 8.27. Так, на 4-ту добу експерименту підпорогові дози PTZ призводили до поступового наростання судомної активності: спостерігалася поява клонічних нападів у групі

контрольної патології, цеlexоксиду та сполуки **8.56**. Перші пароксизми зареєстровані в групі вальпроату натрію на 6-ту добу введення PTZ. Статистично значущої різниці в тривалості латентного періоду між досліджуваними групами та групою контрольної патології не виявлено.

Досліджувана сполука **8.56** виявляла чітку протисудомну дію, що свідчить про статистично достовірну різницю в кількості тварин із судомами з 8-ї по 16-ту добу експерименту. На 8, 9 та з 11 по 13 добу експерименту у тварин групи, які вводили похідне **8.56** судом не реєстрували, що вірогідно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від показників групи контрольної патології та цеlexоксиду, у яких судоми спостерігалися щоденно. У групі препарату порівняння натрію вальпроату, який не поступався ефективності сполуці **8.56**, нападів не було протягом 8, 10, 12 днів.

В останню добу досліду (на 16-ту добу введення) виражені судоми спостерігалися у 77,78 % тварин групи контрольної патології. Натомість у групі сполуки **8.56** пароксизми мали лише 33,33% мишей, що статистично підтверджує ефективність досліджуваної сполуки ( $p < 0,01$ ). За цим показником зазначена група також не поступалася показникам натрію вальпроату (25%). Водночас на тлі цеlexоксиду судоми спостерігались у 85,71 % тварин ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з групою, якій вводили сполуку **8.56**.

Таблиця 8.27

**Вплив сполуки 8.56, натрію вальпроату та цеlexоксиду на перебіг кіндлінгу пентилентетразолом у мишей ( $M \pm m$ )**

Експериментальні дані	Група тварин			
	Контрольна патологія (пентилентетразол), n=9	Натрій вальпроат, n=8	Цеlexоксид, n=7	Сполука 8.56, n=9
Доза, мг/кг	30	300	4	100
Латентний період між нападами, дні	4	6	4	4
% мишей із судомами, середнє значення за весь період	29,83±7,22	9,08±3,44	29,84±6,71	7,29±2,79

Кількість днів з нападами	13/16	8/16	13/16	7/16
Кількість днів без нападів	3/16	8/16	3/16	9/16

Таким чином, результати вивчення антиконвульсантної активності на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом свідчать про ефективність дії сполуки **8.56**, що підтверджується статистично достовірним зниженням частки тварин з пароксизмами проти показників контрольної патології, які статистично відрізняється від показників групи целекоксибу. Значної відмінності у дії сполуки **8.56** з показниками групи препарату порівняння натрію вальпроату не було виявлено.

За кількістю тварин із судомами целекоксиб не виявляв вираженої протисудомної дії. Водночас натрію вальпроат зменшував кількість мишей із судомами на 20,75 %, що статистично перевищує відповідний показник групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ) та целекоксибу ( $p < 0,01$ ).

У групі сполуки **8.56** частка тварин із судомами під час експерименту була на 22,54% меншою, ніж у групі кіндлінгу індукованої PTZ ( $p < 0,05$ ), і на 22,55% меншою, ніж у групі целекоксибу ( $p < 0,01$ ). Статистично значущих відмінностей між групами сполуки **8.56** та натрію вальпроату виявлено не було.

Підсумовуючи динаміку розвитку судомного синдрому, варто відзначити, що лише в групах сполуки **8.56** та натрію вальпроату спостерігалось достовірне зменшення ( $p < 0,05$ ) кількості днів без нападів (табл. 8.27). Таким чином, виявлено високу протисудомну активність досліджуваного 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону **8.56** в моделі PTZ-індукованого кіндлінгу, яка відтворює умови вторинні генералізовані напади хронічного епілептогенезу.

Результати дослідження показників циклооксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти та ряду інших маркерів запалення на фоні PTZ-індукованого кіндлінгу у мозку мишей наведено в табл. 8.28. Так, у гомогенатах головного мозку мишей за допомогою стандартних видоспецифічних наборів

визначали вміст циклооксигенази-1 (ЦОГ-1), циклооксигенази-2 (ЦОГ-2), простагландинів: PGE2, PGF2 $\alpha$ , простацикліну (PGI2), тромбоксану B2 (TXB2), 8-ізопростану, а також нейронспецифічної енолази (NSE).

Зокрема, у групі контрольної патології спостерігалось підвищення маркерів запалення, що свідчить про розвиток нейрозапалення на фоні тривалого введення конвульсанту пентилентетразолу. Відомо, що в результаті активації цитокінів з ендотеліоцитів судин надлишкова кількість вторинних месенджерів (оксид азоту, простагландини та ін.) вивільняється і потрапляє в ЦНС, що викликає пошкодження клітин мозку. Як наслідок, вміст ЦОГ-1 збільшився на 12,4%, експресія ЦОГ-2 зросла майже в 2 рази, вміст PGF2 $\alpha$  збільшився на 27,3%, TXB2 збільшився вдвічі, а продукція PGE2 і PGI2 знизилася на 42,1% і 50,4%, відповідно ( $p < 0,01$ ).

Таблиця 8.28

**Вплив сполуки 8.56, натрію вальпроату та целекоксибу на циклооксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти, 8-ізопростану та NSE на моделі кіндлінгу пентилентетразолом у мишей,  $M \pm m$**

Група	Доза, мг/кг	ЦОГ-1, пкг/г тканини	ЦОГ-2, нг/г тканини	PGE2, пкг/г тканини	PGF2 $\alpha$ , пкг/г тканини	PGI2, нг/г тканини	TXB2, пкг/г тканини	8-ізопростан, нМ/г	NSE, нг/год
Інтактний контроль	–	794,86 $\pm$ 4,59	132,16 $\pm$ 3,44	704,70 $\pm$ 4,57	988,79 $\pm$ 15,15	6,15 $\pm$ 0,05	131,66 $\pm$ 1,32	19,65 $\pm$ 0,23	4,04 $\pm$ 0,05
Контрольна патологія	30	893,06 $\pm$ 7,50	216,12 $\pm$ 7,98	407,82 $\pm$ 3,08	1258,98 $\pm$ 18,42	3,05 $\pm$ 0,06	263,44 $\pm$ 1,14	54,67 $\pm$ 1,94	70,84 $\pm$ 1,01
Сполука 8.56	100	843,32 $\pm$ 9,35	119,94 $\pm$ 2,48	515,04 $\pm$ 3,44	1030,58 $\pm$ 25,39	3,88 $\pm$ 0,06	148,55 $\pm$ 2,78	45,75 $\pm$ 0,93	57,83 $\pm$ 0,90
Целекоксиб	4	778,25 $\pm$ 7,73	213,25 $\pm$ 3,38	609,10 $\pm$ 3,64	1129,62 $\pm$ 16,11	2,91 $\pm$ 0,05	183,93 $\pm$ 2,43	40,42 $\pm$ 0,63	68,12 $\pm$ 0,48
Натрію вальпроат	300	760,40 $\pm$ 8,55	103,31 $\pm$ 4,33	629,42 $\pm$ 26,77	1085,49 $\pm$ 15,47	4,11 $\pm$ 0,10	142,10 $\pm$ 1,65	32,04 $\pm$ 0,54	34,44 $\pm$ 0,51

Незважаючи на належність високоселективних інгібіторів ЦОГ-2 до ліпофільних сполук, яка визначає здатність долати гематоенцефалічний бар'єр, целекоксиб практично не впливав на підвищення рівня даної ізоформи ЦОГ у гомогенатах мозку (табл. 8.28). З іншого боку, підвищений вміст ЦОГ-1 за



рахунок дії целекоксибу знизився до рівня інтактного контролю, вміст PGE2 збільшився на 49,4%, PGF2 $\alpha$  знизився на 10,27%, рівень PGI2 не зазнав змін, а TXB2 знизився на 30,2 % порівняно з відповідними показниками групи контрольної патології.

Натрію вальпроат вірогідно ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками групи контрольної патології впливав на всі досліджувані маркери стану каскаду арахідонової кислоти: рівень ЦОГ-1 знизився на 14,9%, ЦОГ-2 – на 52,2%, вміст PGE2 зріс на 54,3%, PGF2 $\alpha$  знизився на 13,8%, PGI2 збільшився на 34,8%, а TXB2 знизився на 46,1%.

У групі сполуки **8.56** вміст ЦОГ-1 знизився на 5,6 % порівняно з параметром групи контрольної патології ( $p < 0,01$ ), а ЦОГ-2 – на 44,5 % ( $p < 0,01$ ). Вміст PGE2 збільшився на 26.3 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з аналогічним показником групи контрольної патології, рівень PGF2 $\alpha$  знизився на 18,1 % ( $p < 0,01$ ), PGI2 збільшився на 27.2 % ( $p < 0,01$ ), а TXB2 знизився на 43,6% ( $p < 0,01$ ).

У моделі хронічного епілептогенезу вміст 8-ізопростану, маркера перекисного окиснення ліпідів, з високим ступенем достовірності збільшився у 2,78 рази ( $p < 0,01$ ) порівняно зі значенням інтактного контролю. Це підтверджує розвиток нейрозапалення в умовах введення конвульсанту пентилентетразолу. Під впливом натрію вальпроату рівень 8-ізопростану статистично вірогідно знизився на 41,39 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з групою контрольної патології. Целекоксиб достовірно знижував вміст 8-ізопростану на 26,07 % ( $p < 0,01$ ), а сполука **8.56** на 16,32 % порівняно з групою контрольної патології ( $p < 0,01$ ). Дані результати свідчать про наявність антиоксидантних властивостей всіх досліджуваних сполук, які були використані в експерименті.

NSE є біомаркером, який пов'язаний з активацією мікроглії. Відповідно, аналіз вмісту даного показника дає змогу оцінити ступінь пошкодження нейронів головного мозку, що виникає при ішемії та різних метаболічних, запальних і нейродегенеративних захворюваннях [622]. Підвищення рівня NSE у групі контрольної патології у 17,5 рази порівняно з інтактним контролем свідчить про розвиток швидкого процесу імпресії нейронів у мозку мишей. У

групі натрію вальпроату рівень NSE був статистично достовірно знижений на 51,4 % порівняно з групою кіндлінгу, індукованого PTZ, що є характерним для даного протисудомного препарату [623]. Не було виявлено статистично значущого зниження даного маркера в групі целекоксибу, що вказує на те, що високоселективний інгібітор ЦОГ-2 не має чітких нейропротекторних властивостей. Під впливом сполука **8.56** рівень NSE статистично знижувався порівняно з показником групи контрольної патології на 18,4 %. Це вказує на подібний механізм дії сполуки **8.56** і натрію вальпроату щодо попередження пошкодженню нейронів, спричиненого PTZ у моделях хронічного епілептогенезу.

Враховуючи високий протизапальний ефект 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону **8.56** нами було проведено докінгові дослідження щодо ряду запалення-асоційованих біомішеней. Спочатку структури ЦОГ-1 (код PDB 4O1Z) і ЦОГ-2 (код PDB 3LN1) були обрані для молекулярного докінгу як стандартні біомішені. Перед суміщенням тривимірну структуру сполуки **8.56** оптимізували за допомогою програмного забезпечення HyperChem 7.5. Метод молекулярної механіки MM+ оптимізував структуру молекули, досягнувши середньоквадратичного градієнта менше 0,1 ккал/(моль Å). Напівемпіричний квантово-хімічний метод PM3 виконував остаточну мінімізацію енергій досліджуваних інтермедіатів до тих пір, поки середньоквадратичний градієнт не становив менше 0,01 ккал/(моль Å). Однак отримані значення енергії зв'язування були достатньо малими, щоб пояснити протизапальну активність сполуки **8.56** через інгібування ізоформ ЦОГ. Тому для молекулярного докінгу були також використані інші біомішені, а саме 5-ліпооксигеназа (5-ЛОГ) (код PDB 3V99) і 5-ліпооксигеназо активуючий протеїн (FLAP) (код PDB 6VGI).

Результати енергії зв'язування комплексів сполуки **8.56** та препаратів/сполук порівняння з запалення-асоційованими біомішенями наведені в табл. 8.29.

**Енергії зв'язування комплексів сполуки 8.56 та препаратів/сполук порівняння із деякими запалення-асоційованими біомішенями**

	<b>ЦОГ-1, ккал/моль</b>	<b>ЦОГ-2, ккал/моль</b>	<b>5-ЛОГ, ккал/моль</b>	<b>FLAP, ккал/моль</b>
Сполука <b>8.62</b>	-6,9	-6,9	-7,5	-7,7
Мелоксикам	-9,8	-	-	-
Целекоксиб	-	-12,4	-	-
Лікофелон			-8,0	-
МК-886	-	-		-7,9

Згідно з отриманими даними сполука **8.56** проявила високу спорідненість до 5-ЛОГ і FLAP і низьку енергію зв'язування до ЦОГ-1/2. Результати даного дослідження є важливі у контексті розуміння механізмів виникнення нейрозапалення та розробки підходів його фармакологічної корекції. Варто відзначити, що в літературних даних повідомлено про подібні дослідження, зокрема про препарат лікофелон, який є потужним подвійним інгібітором ЦОГ/ЛОГ та проявляє виражену протисудомну дію [624].

При детальному аналізі особливостей зв'язування сполуки **8.56** з 5-ЛОГ встановлено, що досліджувана сполука утворює два водневі зв'язки з Arg596 і His367 довжиною 2,85 Å і 2,12 Å, відповідно. Усі три цикли, які входять до складу сполуки **8.56** взаємодіють із ліпофільними амінокислотами біомішені через різні типи гідрофобних нековалентних взаємодій, як показано на рис 8.12.

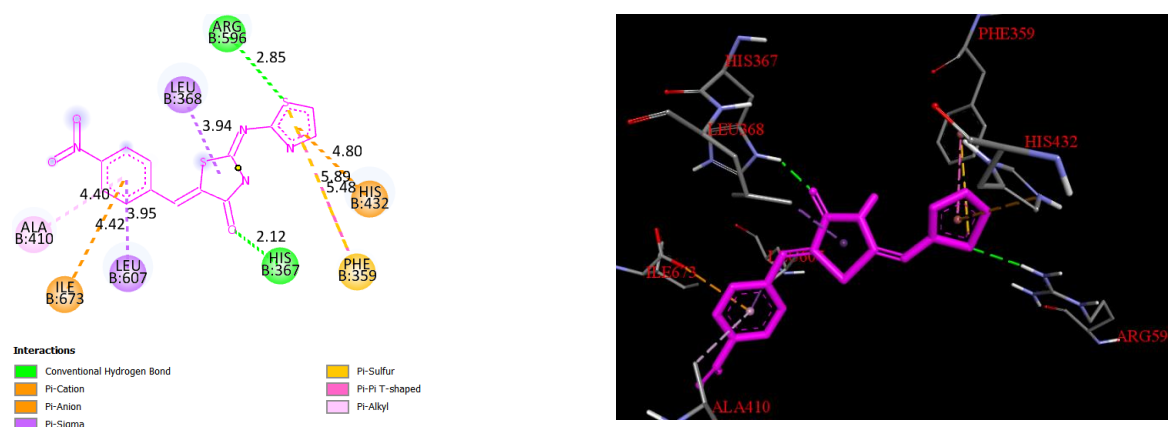


Рис. 8.12. Візуалізація 2D and 3D зв'язування сполуки **8.56** з 5-ЛОГ (PDB 3V99).

Згідно з результатами молекулярного докінгу, сполука **8.56** має виражену спорідненість до FLAP з енергією зв'язування близькою до антагоніста лейкотрієну МК-886. Досліджувана сполука **8.56** не утворює водневих зв'язків і займає гідрофобну кишеню, утворену кількома ліпофільними амінокислотами біомішені (рис. 8.13). Такі ж взаємодії без будь-яких додаткових водневих зв'язків можна спостерігати і в комплексі МК-886-FLAP.

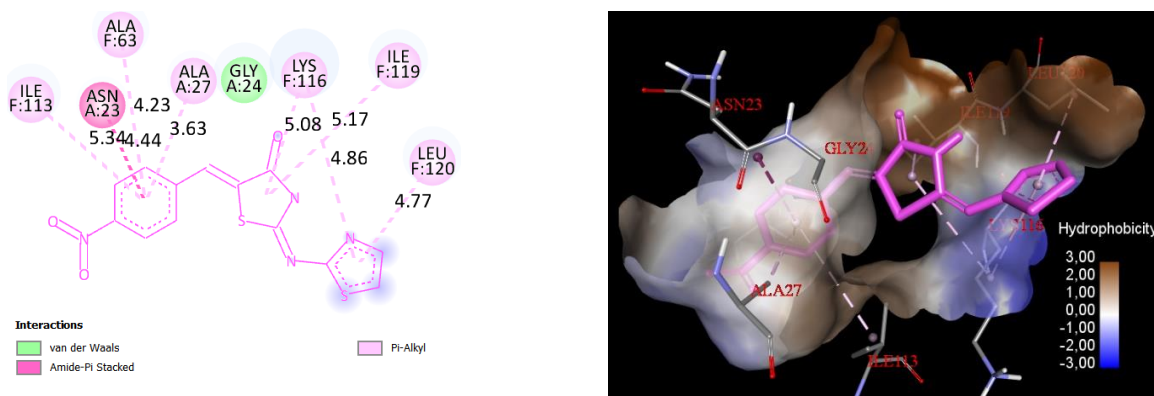


Рис. 8.13. Візуалізація 2D та 3D зв'язування сполуки **8.56** з FLAP (PDB 6VGI).

Таким чином, результати проведеного молекулярного докінгу підтверджують наявність спорідненості сполуки **8.56** до ряду запалення-асоційованих біомішеней та визначають доцільність подальших поглиблених досліджень впливу досліджуваного похідного на 5-ліпоксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти.

Аналізуючи результати досліджень сполуки **8.56** було показано, що перебіг PTZ-індукованого кіндлінгу у мишей значною мірою залежить від застосованої експериментальної терапії. Під впливом класичного протисудомного засобу натрію вальпроату та досліджуваної сполуки **8.56** спостерігався виражений протисудомний ефект, тоді як целекоксиб не покращував перебіг модельної патології. У використаній моделі хронічного епілептогенезу високоселективний інгібітор ЦОГ-2 був клінічно неефективним. Високий рівень NSE в гомогенатах мозку миші також це підтверджує. На основі літературних даних було встановлено помірну протисудомну активність целекоксибу на моделі гострого PTZ-індукованого судомного синдрому [619,

625]. Однак захисні властивості целекоксибу недостатні для ефективного контролю над судомами в досліджуваній моделі.

ЦОГ-2 є індукцибельним ферментом у запальному процесі як відповідь на вплив різних флогенів. Відомо, що експресія ЦОГ-2 підвищується у хворих на епілепсію [626,627] та у лабораторних тварин під час моделювання судом [625]. ЦОГ-2 каталізує перетворення арахідонової кислоти в проміжний простагландин-Н<sub>2</sub>, який потім перетворюється клітинно-специфічними синтазами в тромбоксан-А<sub>2</sub> і чотири різні простагландини: PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α і PGI<sub>2</sub>, які називаються простаноїдами.

Так, у нашому дослідженні на моделі PTZ-індукованого кіндлінгу в групі контрольної патології вміст ЦОГ-2 збільшився майже вдвічі, чого не спостерігалось під дією сполуки **8.56** та натрію вальпроату. Порівняно з ЦОГ-2 вміст ЦОГ-1 лише незначно підвищувався на моделі хронічного епілептогенезу. Таким чином, експресія ЦОГ-2 підвищується в мозку мишей на фоні PTZ-ініційованого запалювання. Той факт, що сполука **8.56** переважно інгібує ЦОГ-2, може вказувати на його високу селективність щодо даного ферменту, що відповідно, знижує ризик виникнення побічних ефектів через інгібування конститутивної ЦОГ-1. Цікаво, що досліджувана сполука **8.56** та її аналоги в скринінговому дослідженні *in vitro* проведеному *Geronikaki A.* та співавторами як потенційних інгібіторів ЦОГ продемонстрували переважно інгібування ЦОГ-1, а не ЦОГ-2 [628]. Встановлено також, що натрію вальпроат також помітно пригнічує ЦОГ-2.

За результатами кореляційного аналізу між ЦОГ-1 і ЦОГ-2 спостерігається помірний негативний зв'язок ( $\rho = -0,43$ ). Після PTZ-індукованого кіндлінгу у групі контрольної патології виявляється сильний зв'язок ( $\rho=0,83$ ,  $p<0,05$ ), що свідчить про пряму залежність від експресії обох ізоформ ЦОГ. Цю залежність послаблює найменш ефективний протисудомний препарат целекоксиб ( $\rho = -0,31$ ), а високоефективні натрію вальпроат і сполука **8.56** інвертують її, повертаючи до закономірності, характерної для інтактних тварин ( $\rho = -0,60$  і  $\rho =$

- 0,66, відповідно), що вказує на їхню участь у регуляції каскаду арахідонової кислоти.

Простациклін є антагоністом ТХВ2. У інтактних тварин його вміст мав слабку кореляцію ( $\rho = 0,31$ ). У моделі епілептогенезу його рівень зростав ( $\rho = 0,83$ ), що може свідчити про компенсаторні механізми регуляції вмісту простацикліну та процесів вазоконстрикції і тромбоутворення. На тлі дії протисудомної сполуки **8.56** та натрію вальпроату даний зв'язок є інвертованим ( $\rho = -0,54$  та  $\rho = -0,43$ , відповідно), що можна розглядати як маркер взаємозв'язку механізмів протисудомної та протизапальної дії зазначених сполук, на відміну від целекоксибу, який майже не вплинув на величину даного показника і залишив її на рівні контрольної патології ( $\rho = 0,71$ ).

Було виявлено, що целекоксиб не впливає на біомішені у головному мозку мишей із моделлю хронічного епілептогенезу, але демонструє потужне пригнічення експресії ЦОГ-1. Так, у дослідженні [619] повідомлялося про наявність неселективного інгібування ЦОГ-2 целекоксибом при судомних станах викликаних пентилентетразолом, що можна пояснити використанням високих доз препарату, оскільки його коефіцієнт селективності щодо ЦОГ-2 ( $IC_{50}$ ) становив 7.6. Можливо також припустити, що такий нетиповий характер дії целекоксибу на ізоформи ЦОГ у головному мозку зумовлений особливостями модельної патології.

У дослідженні [629] для підтвердження кореляції між рівнем експресії ЦОГ-2 і продукцією простагландинів визначали PGE2, PGH2, PGD2 і PGI2 в гіпокампі інтактних мишей на моделі PTZ-індукованого кіндлінгу, в тому числі під час експериментальної терапії целекоксибом. Авторами було встановлено, що вміст PGE2 і PGH2 значно підвищувався в гіпокампі мишей під впливом PTZ. Проте целекоксиб за цих умов суттєво інгібував утворення PGE2 і PGH2 і майже не впливав на продукцію PGD2 і PGI2 [630]. У нашому дослідженні за аналогічною моделлю рівень PGE2 у гомогенаті мозку, навпаки, знизився майже вдвічі, а на фоні досліджуваних сполук, у тому числі целекоксибу, з рівнем, близьким до інтактного контролю. Рівень PGI2 у мишей групи контрольної

патології також знизився майже вдвічі. Така суттєва відмінність може бути пов'язана з тим, що простаноїди визначали безпосередньо в гіпокампі тварин, де зосереджені основні запальні процеси епілептичного мозку, а PGE2 регулює збудливість мембрани та тривалу синаптичну пластичність перфорантних шляхів [629].

В іншому дослідженні [589] вивчали рівень фактора некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкіну- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), малонового діальдегіду (MDA) і PGE2, а також вміст глутатіону (GSH) у мишей на фоні судом індукованих PTZ. Так, у гомогенатах головного мозку, виділеному через 24 год після останнього введення PTZ, виявлено статистично достовірне підвищення рівня PGE2 у 8 разів у групі контрольної патології порівняно з рівнем інтактних тварин. Під впливом натрію вальпроату також спостерігався підвищений рівень простагландину, але значно менше, ніж у групі контрольної патології.

Суттєва зміна рівня показників медіаторів запалення в наведених вище дослідженнях [589, 629] і в нашому експерименті можна пояснити тим, що мозок видаляли через 1 годину після останнього введення PTZ, що було набагато раніше, ніж у попередніх роботах [589, 629]. Така розбіжність може свідчити про певну фазовість рівнів медіаторів запалення. Наш підхід до вибору моменту часу відбору тканин на дослідження базувався на численних даних літератури, згідно з якими експресія ЦОГ-1, ЦОГ-2 та інших медіаторів поступово зростає з максимальним посиленням на етапі початку судомного нападу та протягом 1 години після нападу [613, 631, 632]. Через 24 години після нападів рівень даних медіаторів зазнає істотних змін.

Роль окремих простагландинів в розвитку епілептогенезу чітко не визначена і може бути оцінена лише комплексно, беручи до уваги всі аспекти нейрозапалення. Експериментальні дані свідчать про те, що PGE2 є критичним посередником у передачі сигналів ЦОГ-2 [633]. Крім того, введення екзогенного PGE2, але не PGD2 або PGF $2\alpha$ , збільшує частоту нападів і амплітуду збуджувальних постсинаптичних потенціалів [634]. Крім того, PGE2 збільшує вивільнення глутамату з астроцитів [635], що свідчить про роль PGE2 у контролі

передачі збудження в мозку. Інше дослідження [636] показало, що PGE2 захищає культивовані кортикальні нейрони від NMDA-рецептор-ініційованої нейротоксичності глутамату через активацію рецепторів EP2, тобто виявляє виражену нейропротекторну активність.

Рівень PGF2 $\alpha$  підвищується при церебральній ішемії та епілепсії. Цей простагландин здійснює свою нейротоксичну дію через активацію рецепторів PGF2 $\alpha$ , з'єднаних з білком G [637]. У контексті наведених даних зниження вмісту PGF2 $\alpha$  в мозку свідчить про захисну дію досліджуваного похідного **8.56**.

PGI2 проявляє нейропротекторні властивості при ішемічному пошкодженні нейронів (включаючи епілепсію), оскільки покращує мозковий кровообіг [638]. У нашому дослідженні рівень PGI2 статистично вірогідно ( $p < 0.01$ ) підвищувався під впливом сполуки **8.56** та натрію вальпроату, що свідчить про позитивний вплив на нейрони в моделі хронічного епілептогенезу.

Антагоністом простагландину є THX2, який стимулює агрегацію тромбоцитів і викликає вазоконстрикцію, необхідну для розвитку епілептичної ішемії мозку [639]. Зниження його рівня під дією сполуки **8.56** і натрію вальпроату можна вважати сприятливою ланкою нейропротекторної активності даних сполук.

Результати молекулярного докінгу продемонстрували афінитет сполуки **8.56** до 5-ЛОГ і FLAP і незначну селективність ЦОГ-1/2. Активація запального шляху 5-ЛОГ має надзвичайно важливе значення в нейродегенеративних процесах, які широко описані та обговорені в науковій літературі [640-642]. Так, досліджуване похідне 4-тіазолідинону (сполука **8.56**) можна розглядати як потенційний інгібітор не лише ЦОГ-1 та ЦОГ-2, а також 5-LOX/FLAP, що створює передумови для подальших поглиблених досліджень ліпоксигеназної ланки арахідонової кислоти як важливого елемента у розвитку нейрозапалення.

Варто відзначити, що судомні стани суттєво сприяють витраті метаболічної енергії у ЦНС та виникненню гіпоксії головного мозку, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Останній є одним із механізмів, який бере участь у процесі виникнення порушень мозкової діяльності



викликаних епілепсією [643]. Відповідно, висока ефективність сполуки **8.56** у зниженні вмісту  $\delta$ -ізопростану є важливим елементом у механізмі реалізації антиконвульсантного ефекту та відповідно, зниження негативного впливу на ЦНС.

За даними літератури, при захворюваннях, пов'язаних з безпосереднім залученням нервової тканини у патологічний процес, якісні та кількісні зміни рівня NSE вказують на виразність ушкоджень нейронів і порушень загальної цілісності гематоенцефалічного бар'єру [644]. Як видно з табл. 8.28, рівень NSE у групах сполуки **8.56** та натрію вальпроату статистично значуще ( $p < 0.01$ ) є нижчим за рівень у групі контрольної патології. Це доводить ефективність зазначених сполук у зниженні судомної активності, що підтверджується достовірним ( $p < 0.05$ ) зниженням % мишей з судомами та зменшенням кількості днів із пароксизмами проти показника групи контрольної патології. Отже, запобігаючи розвитку судом, сполука **8.56** та натрію вальпроат зумовлювали також нейропротекторний ефект, захищаючи нейрони від пошкодження та подальшої загибелі, що сприяє зменшенню запалених процесів у головному мозку дослідних мишей.

Таким чином встановлено, що у розвитку хронічного епілептогенезу беруть участь численні медіатори запалення, механізм дії яких потребує подальшого вивчення. Досі залишається незрозумілим, чи може пригнічення нейрозапалення інгібіторами ЦОГ запобігти судомним нападам за даних умов. Протисудомні властивості інгібіторів ЦОГ та їх роль у процесі епілептогенезу потребують подальшого цілеспрямованого вивчення. Однак перспективний протисудомний агент 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон (сполука **8.56**), як і класичний протиепілептичний препарат натрію вальпроат, виявляє виражені протизапальні властивості шляхом інгібування циклооксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти у мозку тварин із моделлю хронічного епілептогенезу, що пов'язано зі зменшенням окисного стресу та пошкодження нейронів. Крім того, досліджувана сполука **8.56** вигідно

відрізняється від натрію вальпроату характеристиками вторинної фармакодинаміки, зокрема відсутністю протидепресивних побічних ефектів [645].

8.5.2. Вивчення психотропних властивостей сполуки-хіта **8.56** як потенційного протисудомного агента.

Для сполуки **8.56** (5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону), яка у попередніх дослідженнях виявила виразний антиконвульсантний ефект на моделях судом з різним механізмом розвитку було вивчено супутні психотропні ефекти використовуючи наступні тести: тест відкритого поля на локомоторну, орієнтовно-дослідницьку, емоційну активність та її вегетативний супровід; тест піднесеного-хрестоподібного лабіринту для з'ясування впливу на тривожність; іммобілізаційний тест підвішування за хвіст для вивчення впливу на депресивну поведінку; тест умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) для вивчення впливу на пам'ять інтактних тварин; тест стрижня, що обертається для оцінки впливу на тонус м'язів і координацію рухів; тест примусового плавання з навантаженням для вивчення фізичної витривалості [645]. Як препарати порівняння у дослідженнях психомоторних властивостей було використано антиконвульсант вальпроат натрію, ноотропний препарат пірацетам та психомоторний стимулятор кофеїн-бензоат натрію.

Результати тесту відкритого поля для сполуки **8.56** наведені у табл. 8.30. Так, дані свідчать про відсутність чіткого впливу досліджуваної сполуки на емоційний стан дослідних тварин, локомоторну та орієнтовно-дослідницьку активність. Проте під дією сполуки **8.56** відзначалось підвищення рухової активності у 1,19 рази, сумарні показники орієнтовно-дослідницької діяльності зменшилась у 1,15 раза, а загалом сумарний показник усіх видів активностей збільшився на 17,45 %. Незначна виразність зазначених змін та відсутність їх статистичної значущості свідчать, що за умов проведення даного тесту досліджувана сполука не виявляє чіткої седативної та стимулюючої активності. Вальпроат натрію незначно зменшував у порівнянні з контролем показники

кожного субтесту й сумарний показник усіх активностей на 10,7 %. Статистично значущі відмінності між показниками поведінки мишей у тесті відкритого поля під впливом сполуки **8.56** та натрію вальпроату відсутні.

Таблиця 8.30

**Вплив сполуки 8.56 (100 мг/кг) та вальпроату натрію (300 мг/кг) на поведінку мишей у тесті відкритого поля,  
Me[Q<sup>25</sup>;Q<sup>75</sup>]**

Група, кількість тварин	Локомоторна активність (перетнуто квадратів)	Орієнтовно-дослідницька діяльність			Емоційні реакції та їх вегетативний супровід				Сума всіх активностей
		Стійки	Отвори	Сума	Болюси	Уринації	Грумінг	Сума	
Контроль (n=8)	33,5 [24,5; 41,5]	5 [4; 6]	33 [22,5; 38]	38,5 [28; 45,5]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	1,5 [0,5; 2]	1,5 [1; 2,5]	74,5 [56; 86,5]
Вальпроат натрію (n=8)	31 [22,5; 41]	4 [2; 10,5]	24,5 [17,5; 30]	32,5 [21; 43,5]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,5 [0; 1]	0,5 [0; 1]	66,5 [61; 76,5]
Сполука 8.62 (n=8)	40 [34,5; 57]	4 [2; 13,5]	23,5 [19,5; 42,5]	33,5 [25; 52]	0,5 [0; 2]	0 [0; 0]	1 [0; 1]	1 [1; 3]	87,5 [64,5; 100,5]

Аналіз результатів таблиці 8.30 свідчить, що у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту досліджувана сполука **8.56** виявляла слабкий анксиолітичний ефект. Так, досліджувана сполука подовжувала латентний період входу в темну камеру в 1,97 рази, збільшувала час та тривалість перебування в освітлених рукавах у 1,27 та 1,16 рази, відповідно. Препарат порівняння вальпроат натрію виявляв помірну анксиогенну активність. Натрію вальпроат спричинив скорочення латентного періоду входу в темну камеру відносно показника контрольної групи у 2,83 рази, скорочував тривалість перебування тварин в освітлених рукавах та пролонгував перебування у темних рукавах у 1,26 та 1,25 рази, відповідно. Порівняно з ефектом натрію вальпроату досліджувана сполука **8.56** збільшувала час входу мишей у темний відсік та підвищувала тривалість перебування в освітленому рукаві, зменшуючи час перебування в затемненому.

Результати іммобілізаційного тесту сполуки **8.56** наведено в табл. 8.31. Вальпроат натрію виявляв депресогенний ефект, про який свідчить подовження тривалості нерухомого зависання на 11,11 %, збільшення кількості актів іммобілізації та середньої тривалості іммобілізації у 1,5 та 2,09 рази, відповідно порівняно з показниками контрольної групи. Натрію вальпроат застосовується у терапії біполярних розладів як нормотимічний лікарський засіб, проте спектр його дії у більшій мірі пов'язаний із запобіганням розвитку маніакальних фаз, ніж депресивних [269]. На тлі застосування сполуки **8.56** достовірних відмінностей з контрольною групою не спостерігали. Таким чином, досліджувана сполука **8.56** не проявляла депресивного чи антидепресивного ефектів.

На моделі УРПУ сполука **8.56** скорочувала латентний період входу до темної камери у понад три рази (табл.8.32). Препарат порівняння пірацетам впливав на величину даного показника подібним чином. Це відповідно, дає змогу припустити про анксиогенні властивості пірацетаму та сполуки **8.56**. згідно з результатами досліджень, на формування пам'яті сполука **8.56** практично не впливає, про що свідчить відсутність достовірних відмінностей з показником

контрольної групи. Пірацетам у дозі 200 мг/кг виявив незначну мнемотропну активність, а саме збільшив кількість тварин із закріпленим УРПУ.

Результати дослідження впливу сполуки **8.56** та натрію вальпроату на м'язовий тонус та координацію рухів наведено у табл. 8.33. Згідно з результатами отриманих даних спостерігається відсутність в досліджуваних сполук впливу на тонус скелетних м'язів та координацію рухів у порівнянні з показниками контрольної групи.

Актопротекторні властивості сполуки **8.56** та референс препарату порівняння кофеїну-бензоату натрію наведено у табл. 8.34. Досліджувані сполуки з високою достовірністю ( $p < 0,01$ ) подовжували тривалість плавання досліджуваних тварин з навантаженням, а саме сполука **8.56** у 2,40 рази, а кофеїн-бензоат натрію – у 3,18 рази. Таким чином, достовірно встановлено, що 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон **8.56** здатний підвищувати фізичну витривалість у досліджуваних тварин у даному тесті.

Таблиця 8.31

**Вплив сполуки 8.56 (100 мг/кг) та вальпроату натрію (300 мг/кг)  
на депресивну поведінку мишей в іммобілізаційному тесті, Me[Q<sup>25</sup>;Q<sup>75</sup>]**

Група, кількість тварин	Латентний період, с	Тривалість нерухомого зависання, с	Кількість актів іммобілізації	Середня тривалість іммобілізації, с
Контроль (n=8)	52,5 [37,5; 70,5]	193,5 [131,5; 208,5]	12 [9; 16]	16,21 [7,5; 23,27]
Вальпроат натрію (n=8)	50,5 [44; 60]	215 [205; 246] *	8 [6; 8,5] *	34 [26,78; 34,58] *
Сполука 8.62 (n=8)	48 [35; 60]	184,5 [176; 203] #	9,5 [7; 12,5]	19,12 [15,68; 27,07] #

*Примітка.* Статистично значущі відмінності: \* – з групою контролю (p<0,05); # – з групою вальпроату натрію (p<0,05).

Таблиця 8.32

**Вплив сполуки 8.56 на поведінку інтактних мишей у тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ),  
M[Q<sup>25</sup>;Q<sup>75</sup>]**

Група, кількість тварин	Доза, мг/кг	Латентний період входу до темної камери, с		Кількість мишей, що досягли критерію навченості		Кількість незавершених спроб входу (через 24 год)
		вихідний	через 24 год	Абсолютна	%	
Інтактний контроль (n=7)	–	32 [19; 43]	165 [149; 180]	3	42,86	4 [2; 5]
Пірацетам (n=8)	200	12 [9,5; 41]	129,5 [28; 180]	4	50,00	4 [3; 5]
Сполука 8.62 (n=8)	100	10,5 [8; 13]**	167,5 [34; 180]	4	50,00	4 [1; 4]

*Примітка.* \*\* – статистично значущі відмінності з групою контролю (p<0,01).

Таблиця 8.33

**Вплив сполуки 8.56 (100 мг/кг) та вальпроату натрію (300 мг/кг) на м'язовий тонус та координацію рухів у тесті стрижня, що обертається**

Група, кількість тварин	Кількість мишей, що впали зі стрижня, абс./%			
	до 30 с	до 1хв	до 2 хв	до 5 хв
Контроль (n=8)	2/ 25 %	2/ 25 %	2/ 25 %	2/ 25 %
Вальпроат натрію (n=8)	4 / 50 %	2/ 25 %	1 / 12,5 %	1 / 12,5 %
Сполука Les-6222 (n=8)	2/ 25 %	2/ 25 %	3/ 37,5 %	1 / 12,5 %

Таблиця 8.34

**Вплив сполуки 8.56 на фізичну витривалість мишей у тесті примусового плавання з навантаженням 10% від маси тіла, M[Q<sup>25</sup>; Q<sup>75</sup>]**

Показник	Інтактний контроль (n=8)	Сполука 8.62, 100 мг/кг (n=8)	Кофеїн-бензоат натрію, 20 мг/кг в/о (n=8)
Тривалість плавання до виснаження, хв	10,42 [8,25;15,42]	25,00 [19,38; 40,78]**	33,11 [26,72; 53,85]**

*Примітка.* \*\* – статистично значущі відмінності з групою контролю (p<0,01).



Постає закономірне питання про причини відсутності виразного впливу сполуки **8.56** на показники поведінкових тестів. Безумовно, воно пов'язане з механізмом дії даної сполуки. На даному етапі дослідження точне і повне встановлення механізму дії для даної сполуки не є можливим, але наявні результати біологічної активності дозволяють зробити деякі обґрунтовані припущення.

На основі результатів дослідження сполуки **8.56** на фоні дії різних судомних отрут з відомим механізмом дії [614, 646], досліджувана молекула може посилювати ГАМК-ергічні (виразний антагонізм з пентилентетразолом, пікротоксином), гліцинергічні (помірний антагонізм із стрихніном) та аденозинергічні гальмівні процеси (виразний антагонізм з кофеїном). Також не виключена здатність досліджуваної сполуки **8.56** блокувати натрієві канали, підтверджену її ефективністю в тесті максимального електрошоку. Результати, які викладено в цій даному фрагменті роботи, дають підставу припустити, що сполука **8.56**, можливо, не є безпосереднім стимулятором іонотропних ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів, агоністам яких притаманна виразна анксиолітична дія (прикладом є бензодіазепінові транквілізатори, фенібут тощо). Для прикладу, антиконвульсант габапентин, який модулює обмін ГАМК, але безпосередньо з ГАМК-рецепторами не зв'язується, а є лігандом  $\alpha 2\delta$ -субодиниці потенціалзалежних кальцієвих каналів, також не має виразних протитривожних властивостей [647]. Проте інший антиконвульсант прегабалін, структурний аналог ГАМК зі складним механізмом дії, в якому також доведено зв'язування з  $\alpha 2\delta$ -субодиницею потенціалзалежних кальцієвих каналів і не є типовою стимуляція ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів, чинить виразну анксиолітичну дію [647]. Ці зіставлення підкреслюють надзвичайну складність психотропних ефектів, механізми яких часто не піддаються вичерпному поясненню. Зроблене на підставі виразного антагонізму з пікротоксином припущення, що сполука **8.56** може стимулювати ГАМК<sub>A</sub>-рецепторний комплекс за рахунок протидії пікротоксин-індукованій блокаді хлорного каналу [646], не суперечить вищенаведеним поясненням: механізм анксиолітичної дії є складним і його

окремі ланки інтерферують. Не виключено, що сполука **8.56** впливає на метаболізм ГАМК та/або є алостеричним модулятором ГАМК-рецепторів.

Імовірно, сполука **8.56**, має здатність певним чином посилюючи ГАМК-ергічні процеси, не прямо стимулюючи метаботропні ГАМК<sub>B</sub>-рецептори, оскільки не спостерігалось зменшення показників у тесті обертового стрижня і, відповідно, не було знижено тону м'язів і координацію рухів. Агоністи цих рецепторів (наприклад баклофен) є центральними міорелаксантами [648].

Слабкість можливої гліцинергічної ланки механізму дії сполуки **8.56**, про яку свідчить подовження латентного періоду судом індукованих стрихніном без захисного ефекту у вигляді зниження летальності [646], може частково пояснювати відсутність достовірної анксиолітичної дії у досліджуваній сполуки. Виявлення вираженої актопротекторної дії сполуки **8.56** було неочікуваним. Особливістю цієї сполуки з вибіркоким пригнічувальним (протисудомним) впливом на центральну нервову систему є збільшення фізичної витривалості, що є нетиповим ефектом. Особливо важливо відзначити, що сполука **8.56** майже не поступається класичному стимулятору - кофеїну, за виразністю актопротекторної дії (див. табл. 8.34). Механізм цього типу активності досить складно пояснити, хоча було встановлено, що сполука **8.56** пригнічує гальмівний аденозінергічний ефект, характерний для кофеїну, і навпаки, стимулює аденозінергічні процеси шляхом пригнічення кофеїн-індукованих судом на рівні препарату порівняння – інозину [646].

Таким чином, вивчення спектру центральних ефектів сполуки **8.56** є важливим кроком у подальшому дослідженні цієї речовини, зокрема для визначення її нейротрансмітерних механізмів дії. Враховуючи гальмівний вплив протиепілептичних препаратів на центральну нервову систему, їх застосування може супроводжуватись побічними ефектами, такими як сонливість, астенія, запаморочення, атаксія, погіршення пам'яті та зниження когнітивних функцій [649]. Результати даного експерименту свідчать про відсутність негативних психотропних ефектів у здорових тварин після застосування сполуки **8.56**. Це дослідно підтверджує можливі переваги вивченої потенційної

протиепілептичної речовини порівняно з існуючими антиконвульсантами, оскільки не супроводжується депримуючими побічними ефектами.

### 8.5.3. Вивчення фригопротекторної активності дарбуфелону та його структурних аналогів.

Холодові травми (ХТ), включаючи відмороження та загальне охолодження, донедавна були в основному проблемою цивільного населення. Це пов'язано зі зростаючою популярністю активного способу життя та таких його елементів як спортивний туризм, гірськолижний спорт, альпінізм. Крім того, спостерігається збільшення кількості бездомних осіб, які входять до групи ризику [650]. Однак, останнім часом враховуючи наявність численних зон бойових дій включно з нашою державою зростає частота холодкових уражень серед військових.

Згідно статистичних даних смертність спричинена ХТ становить близько 10% та на яку в основному страждають люди працездатного віку, що потребують стаціонарного лікування. Варто відзначити, що ХТ можуть призвести до значних ускладнень, а їх лікування триває в середньому в два рази довше за лікування опіків. Так, спектр ускладнень варіює від незначної втрати тканин з помірною тривалістю відновлення до масивного некротичного ураження, що призводить до ампутації та подальших фантомних болей [274, 650].

Існує низка факторів ризику щодо ймовірності отримання ХТ, зокрема люди, що страждають на алкогольну та наркотичну залежність, люди з психічними захворюваннями, цукровим діабетом, нирковою недостатністю та іншими хронічними захворюваннями.

Патологічний процес, що виникає при холодкових травмах (ХТ) поділяють на 4 фази: передзаморожування, замерзання, судинного застою та прогресуюча або пізня ішемічна фаза. За спрощеного підходу виділяють дві фази патогенезу ХТ: фаза переохолодження-замерзання та фаза судинних реакцій [650].

Продукти метаболізму арахідонової кислоти відіграють значну роль у формуванні холодних травм (ХТ). Зокрема, простагландин F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) та тромбоксан A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), які також сприяють запальній реакції, викликають агрегацію тромбоцитів та тромбоз, що призводить до тканинної ішемії. Також спостерігається збільшення утворення простагландину (PGI<sub>2</sub>), який є функціональним антагоністом PGF<sub>2α</sub> та TXA<sub>2</sub> та в певній мірі уповільнює розвиток ішемії. Враховуючи механізм розвитку ХТ, нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), що пригнічують синтез простагландинів, можуть вважатися перспективними фригопротекторами [651, 652].

Фригопротекторні властивості доведено для ацетилсаліцилової кислоти (АСК), мелоксикаму та целекоксибу [272, 275, 653]. Також було виявлено таку активність у диклофенаку натрію [274]. Однак наявність фригопротекторної активності НПЗП з класу селективних інгібіторів ЦОГ-2 не була вивчена. Особливу увагу серед інгібіторів ЦОГ-2/5-ЛОГ на основі похідних 4-тіазолідинону заслуговує дарбуфелон, який на даний момент перебуває на стадії доклінічних досліджень як протизапальний та потенційний протипухлинний агент [273, 653]. З'ясування його можливих фригопротекторних властивостей важливе з огляду на з'ясування можливої участі продуктів ліпоксигеназної реакції – лейкотрієнів у патогенезі ХТ. Насамкінець, доцільно з'ясувати вплив на ХТ інгібіторів ЦОГ-3 – анальгетиків-антипіретиків, які не мають виразних протизапальних властивостей. Відповідно метою даного фрагменту нашої роботи було порівняти виразність фригопротекторного ефекту низки НПЗП, анальгетика-антипіретика парацетамолу та деяких похідних на основі 4-тіазолідинону на моделі гострого загального охолодження (ГЗО) у мишей [654, 655].

У дослідженні використовували наступні препарати: неселективні інгібітори ЦОГ – ацетилсаліцилова кислота, диклофенак натрію; високоселективні інгібітори ЦОГ-2 – целекоксиб, еторикоксиб; подвійні інгібітори ЦОГ-2/5-ЛОГ – дарбуфелон **8.58**, дарбуфелону мезилат **8.59**; інгібітор

ЦОГ-3 – парацетамол; 5-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксибензиліден)-2-(тіазол-2-іліміно)-тіазолідин-4-он **8.54**, як структурний аналог дарбуфелону

Результати скринінгу фригопротекторної активності ряду інгібіторів каскаду арахідонової кислоти та сполук на основі 4-тіазолідинону на моделі гострого загального охолодження (ГЗО) у мишей наведено в табл.8.35.

Таблиця 8.35

**Вплив низки інгібіторів каскаду арахідонової кислоти та сполук на основі 4-тіазолідинону на тривалість життя мишей із гострою холодовою травмою (n=6)**

Група, препарат/сполука	Доза, мг/кг	Час життя, хв		Відмінність з контролем (%)	
		M±m	Me[Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	M	Me
Контрольна патологія	-	44,8±2,5	42[40;52]	-	-
Ацетилсаліцилова кислота	50	52,1±1,6*	53[49;57]*	+16,3	+26,2
Парацетамол	125	50,2±2,8	53,5[44;55]	+12,1	+27,4
	250	49,2±2,0	49[45;50]	+9,8	+16,7
Дарбуфелон <b>8.58</b>	30	51,8±1,6**	53[48;55]**	+15,6	+26,2
Дарбуфелону мезилат <b>8.59</b>	20	63,7±4,3***&	61,5[57;76]**&	+42,2	+46,4
	40	70,0±3,1***&§	69,5[64;78]**&§	+56,3	+65,5
	100	65,9±1,3***&§	66[63;68]**&§	+47,1	+57,1
Сполука <b>8.54</b>	40	59,3±3,5**	56,5[54;60]**	+32,4	+34,5
Диклофенак натрію	14	58,6±4,8*	54[51;68]*	+30,8	+28,6
Целекоксиб	74	57,1±3,3*	55[51;63]*	+27,5	+30,1
Еторикоксиб	10	57,5±0,3***&	58[57;58]**&	+28,3	+38,1
	20	53,2±2,7*	55,5[46;57]*	+18,8	+32,1

Примітка. Статистично значущі відмінності: \* – з контрольною патологією (p < 0,05), \*\* – з контрольною патологією (p < 0,01), & – з показником групи АСК (p < 0,05), § – показником групи еторикоксибу, 10 мг/кг (p < 0,05).

Як можна бачити з даних табл. 8.35, парацетамол в широкому діапазоні доз не спричиняв збільшення часу життя тварин за умов ХТ, а лише на рівні слабкої тенденції. Це може свідчити про те що, інгібування в головному мозку ЦОГ-3 парацетамолом не відіграє значну роль у розвитку ХТ.

Інші лікарські засоби та досліджувані сполуки розташувалися у ряду збільшення фригопротекторної активності наступним чином: ацетилсаліцилова кислота, 50 мг/кг = дарбуфелон **8.58**, 30 мг/кг < диклофенак натрію, 14 мг/кг < целекоксиб, 74 мг/кг < еторикоксиб, 20 мг/кг < сполука **8.54**, 40 мг/кг < еторикоксиб, 10 мг/кг < дарбуфелону мезилат **8.59**, 20 мг/кг < дарбуфелону мезилат **8.59**, 100 мг/кг < дарбуфелону мезилат **8.59**, 40 мг/кг. Щодо ацетилсаліцилової кислоти то зазначений НПЗП у дозі 50 мг/кг спричинив достовірний, хоча й помірний фригопротекторний ефект (табл. 8.37). У попередніх дослідженнях ацетилсаліцилова кислота у меншій дозі 25 мг/кг лише тенденційно збільшувала тривалість життя тварин [274] за умов ХТ у середньому на 14%. Відповідно на основі отриманих результатів встановлено, що для ацетилсаліцилової кислоти притаманна дозозалежність фригопротекторної активності. Серед інших НПЗП найкращий ефект продемонстрував інгібітор ЦОГ-2 еторикоксиб у дозі 10 мг/кг, що можна частково пояснити тим, що саме індучибельна ЦОГ-2 більшою мірою відповідає за утворення PGI<sub>2</sub>, який викликає розширення судин [656]. Можна припустити, що блокування ЦОГ-2 запобігає розширенню судин, викликаному PGI<sub>2</sub>, що сприяє централізації кровообігу та збереженню тепла. За ефективністю еторикоксиб дещо перевершує активність целекоксибу і, на відміну від нього, у відносно низькій дозі 10 мг/кг демонструє достовірно кращий ефект, ніж ацетилсаліцилова кислота.

Найвищий рівень фригопротекторної активності серед досліджуваних похідних 4-тіазолідинону проявив дарбуфелону мезилат **8.59** у широкому діапазоні доз. У дозі 40 мг/кг його ефект був максимальний, проте виразної дозозалежності не спостерігалось. В усіх дозах за фригопротекторним ефектом дарбуфелону мезилат перевищував ацетилсаліцилову кислоту, а також у дозі 40 мг/кг еторикоксиб у дозі 10 мг/кг. Варто зазначити, що саме дарбуфелону

мезилат демонструє кращі результати у порівнянні з основою дарбуфелону **8.58** та його структурним аналогом (сполука **8.54**) у зіставлюваних дозах. Цікаво, що в більшості досліджень дарбуфелону використовують саме його мезилатну сіль [160, 162, 657]. Відомо, що активація ендотеліальних лейкотрієнових рецепторів збільшує проникність судин, що негативно впливає на розвиток ХТ, адже вихід плазми з судинного русла за низьких температур призводить до ще більшого ураження тканин та інтенсифікації запального процесу. До того ж це погіршує реологічні властивості крові, що також відіграє значну роль у патогенезі ХТ [658]. Результати дослідження фригопротекторної активності дають підставу вважати, що застосування блокаторів ЦОГ-2/5-ЛОГ з групи відомих лікарських засобів, а також перспективних сполук з групи похідних 4-тіазолідинону дозволяє уникнути цих несприятливих явищ, однак це потребує подальших поглиблених досліджень.

#### 8.6. Експериментальна частина.

##### *Синтез 5-індоліден роданін-3-пропіонових/етансульфонової кислот (8.3, 8.5, 8.6)*

У круглодонну колбу із зворотнім холодильником поміщують 0,01 моль роданін-3-пропіонові/етансульфонової кислоти, 0,015 моль відповідного індолкарбальдегіду, 0,01 моль безводного ацетату натрію в 10 мл льодової ацетатної кислоти. Реакційну суміш кип'ятять протягом трьох годин і охолоджують. Продукт реакції відфільтровують і перекристалізують з оцтової кислоти або суміші ДМФА-етанол (1:2).

##### *Синтез метилового естру 3-[5-(1H-індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонової кислоти*

У круглодонну колбу із зворотнім холодильником поміщують 0,01 моль 3-[5-(1H-індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонової кислоти **8.3**, яку нагрівають протягом 1 год у 15 мл метанолу у присутності 2 мл сульфатної кислоти як каталізатора. Утворений осад відфільтровують, промивають метанолом та ефіром та перекристалізують із метанолу.

*Синтез 1-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)етан-1-ону (8.7)*

Суміш 0,025 моль тіосечовини, 0,026 моль безводного ацетату натрію та 0,026 моль 3-хлороацетилацетону в 20 мл ацетатної кислоти нагрівають протягом 4 годин в колбі зі зворотнім холодильником. Осад, який утворився після повного охолодження, відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та ефіром, висушують і перекристалізують із оцтової кислоти.

*Синтез 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенонів (8.8-8.16).*

Суміш 0,01 моль сполуки **8.7**, 0,02 відповідного ароматичного альдегіду та 0,01 моль трет-бутилату калію в 10 мл етанолу кип'ячать протягом 3-5 годин. Після охолодження до реакційної суміші додають 1 мл оцтової кислоти. Осад, який утворився відфільтровують, промивають етанолом та ефіром, висушують і перекристалізують з оцтової кислоти або суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Синтез (тіазол-2-іламіно/5-ацетил-4-метил-тіазол-2-іламіно)-ацетил хлоридів (8.49, 8.50).*

Розчин 0,03 моль хлорацетилхлориду у 5 мл безводного діоксану додають до суміші 0,03 моль 2-амінотіазолу **8.48** або 2-аміно-4-метил-5-ацетилтіазолу **8.7** і 0,03 моль триетиламіну у 5 мл діоксану. Суміш нагрівають при 70–80 °С протягом 30 хв, охолоджують та виливають в 50 мл води. Отриманий осад відфільтровують, промивають водою і перекристалізували з етанолу.

*Синтез 2-(2-тіазол-2-іліміно/5-ацетил-4-метилтіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-ону (8.51, 8.52)*

У круглодонну колбу із зворотнім холодильником поміщують 0,01 моль відповідного хлорацетаміду **8.49, 8.50**, 0,02 моль тіоціанату амонію і 30 мл ацетону. Реакційну суміш кип'ячать протягом трьох годин і охолоджують. Надлишок ацетону відганяють у вакуумі водоструйного насосу і залишок розтирають з 50 мл води. Продукт реакції відфільтровують, промивають етанолом і перекристалізують з бутанолу або оцтової кислоти.

*Загальна методика синтезу 5-іліденохідних 2-(2-тіазол-2-іліміно/5-ацетил-4-метилтіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-ону (8.54-8.56) та 2-аміно-5-бензилідентіазол-4(5H)-ону (8.57, 8.58)*



Суміш 0.01 моль 2-(2-тіазол-2-іліміно/5-ацетил-4-метилтіазол-2-іліміно)тіазолідин-4-ону **8.51**, **8.52** або 2-амінотіазол-4(5*H*)-ону, 0,015 моль відповідного ароматичного альдегіду та 0,01 моль безводного ацетату натрію кип'ятять в колбі із зворотнім холодильником протягом 3 годин в 10 мл оцтової кислоти. Продукт реакції відфільтровують, промивають оцтовою кислотою, водою, етанолом та ефіром і перекристалізують з оцтової кислоти або суміші ДМФА-етанол (1:2).

*Синтез 5-(3,5-ді-трет-бутил-4-гідроксибензиліден)-4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-аміній метансульфонат(дарбуфелону мезилат) (8.59)*

Розчиняють 0,01 моль 2-аміно-5-(3,5-ді-трет-бутил-4-гідроксибензиліден)тіазол-4(5*H*)-ону **8.58** у 15 мл безводного тетрагідрофурану та невеликими порціями додають 0,01 моль метансульфонової кислоти. Жовтий осад, що утворився відфільтровують, промивають тетрагідрофураном і висушують при кімнатній температурі та використовують без попередньої очистки.

## ВИСНОВКИ

1. В умовах реакції Кньюенагеля в середовищі оцтової кислоти в присутності ацетату натрію як каталізатора синтезовано ряд 5-індоліден роданін-3-пропіонових/етансульфонової кислот **8.3-8.6** виходячи із 3-заміщених похідних роданіну та індолкарбальдегідів. Скринінг їх протимікробної активності дозволив ідентифікувати сполуки, що володіють помітним ефектом відносно *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus* та *Candida albicans* з величинами MIC/MBC/MFC в межах 25-50 мкг/мл. Вивчення імуноотропної активності сполуки **8.3**, яка володіє високою протигрибковою активністю дало змогу встановити її вибірково активуючий вплив на певні ланки клітинного імунітету та на показники фагоцитарної активності.

2. Отримано серію похідних 1-[2-аміно-4-метилтіазол-5-іл]-3-арилпропенону **8.8-8.16** шляхом альдольно-кротонової конденсації-(2-аміно-4-метилтіазол-5-іл)-етанону та ароматичних альдегідів в середовищі абсолютного

етанолу та присутності основи як каталізатора. Вивчення протипухлинної активності в рамках програми DTP NCI дозволило ідентифікувати сполуку **8.15**, що володіла помірним цитотоксичним ефектом на лінію CCRF-CEM лейкемії. Скринінг антимікробної активності дозволив виділити високоактивну сполуку **8.16** із найвищими значеннями діаметрів зон пригнічення росту *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, та грибів роду *Candida*, які значно перевищують контроль.

3. Для похідних тiazолідинону з фрагментом диклофенаку у структурі **8.17-8.32** було досліджено протипухлинну, протитрипаносомну та антиексудативну активності. За результатами дослідження протипухлинної активності ідентифіковано високоактивне похідне 2-[2-(2,6-дихлорофеніламіно)-феніл]-N-{5-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-ілметилден]-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл}-ацетаміду **8.30**, що проявило суттєву антимітотичну активність з середніми значеннями показників GI<sub>50</sub>/TGI 0,71/1,09 та 82,95/28,46 мкМ, відповідно. Пошук антитрипаносомних агентів серед даного класу сполук дозволив ідентифікувати похідні **8.18** та **8.20** з високим рівнем активності відносно *Trypanosoma brucei brucei* зі значеннями IC<sub>50</sub> 4,8 та 7,06 мкМ, відповідно. За результатами скринінгу антиексудативної активності тiazолідинон-диклофенак гібридних молекул було ідентифіковано високоактивні похідні **8.21**, **8.23** та **8.25**, які проявили пригнічення запальної реакції в межах 39,5-40,8 %, що є співмірним з дією диклофенаку натрію та кеторолаку трометаміну.

4. Дослідження антиексудативної активності серед структурних аналогів тiazолідинон-диклофенак гібридних молекул, а саме S-алкільованих N-заміщеними 2-хлороацетамідами ароматичних амінів похідних 1,3,4,-оксадіазол-2-тіолу дозволило ідентифікувати сполуки **8.37**, **8.38**, **8.40** з показниками пригнічення запальної реакції в межах 42,4-44,6% що є еквівалентним зі значеннями еталонних лікарських засобів.

5. Комплексними *in silico* дослідженнями фізико-хімічних показників, параметрів ADME, фармакокінетичних властивостей та параметрів

лікоподібності встановлено значний потенціал 5-заміщених 2-піразолітіазол-4-онів **8.43-8.47**, який можна розглядати як потенційний напрямок подальшого поглибленого дослідження тіазолідинон-піразольних гібридних молекул.

6. Оцінка протисудомної активності дарбуфелону, його структурних аналогів та деяких похідних на основі 4-тіазолідинону **8.54-8.59** на пентилентетразоловій (PTZ) моделі судом у мишей дозволила встановити високий антиконвульсантний ефект даних сполук, що супроводжувався зменшенням кількості судом, їх тяжкість та тривалість, а також зменшенням кількості тварин з клонічними та тонічними судомами, та загального відсотку летальності у порівнянні з показниками контрольної патології.

7. Встановлено, що сполука-хіт **8.56** з високим рівнем антиконвульсантної активності має здатність впливати на циклооксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти та знижувати рівень маркерів пошкодження нейронів на фоні пентилентетразолової моделі судом. Зокрема, дана сполука проявила виражену протизапальну дію в головному мозку шляхом інгібування ЦОГ-1 і ЦОГ-2. За результатами молекулярного докінгу, для досліджуваної сполуки був підтверджений афінитет до ряду асоційованих з запаленням біомішеней, зокрема ЦОГ-1/ЦОГ-2, 5-LOX та FLAP. Згідно з результатами імунохімічного аналізу сполука **8.56** знижувала в гомогентатах головного мозку мишей вміст 8-ізопростану та нейронспецифічної енолази (NSE), що свідчить про її захисний вплив на клітинну мембрану на фоні оксидативного стресу індукованого введенням конвульсанту пентилентетразолу, а також нейропротекторні властивості на тлі хронічного епілептогенезу, що обґрунтовує доцільність подальшого вивчення даної сполуки як перспективного протисудомного агенту.

8. При вивченні супутніх психотропних ефектів сполуки-хіта **8.56** було встановлено відсутність впливу на локомоторну, орієнтовно-дослідницьку, емоційну активність та її вегетативний супровід, тривожність, депресивну поведінку, формування пам'ятного сліду у лабораторних мишей у порівнянні з референс-препаратом натрію вальпроатом, який виявляв продепресивні

властивості. Досліджувана сполука також не виявляє негативного впливу на тонус скелетних м'язів та координацію рухів, а також підвищує фізичну витривалість тварин незначно поступаючись стимулятору ЦНС кофеїну-бензоату натрію.

9. Дослідження фригопротекторного ефекту дарбуфелону та його структурних аналогів **8.54, 8.58, 8.59** на моделі гострого загального охолодження у мишей дозволило встановити високий рівень активності даного класу сполук, що перевищує еталонні лікарські засоби з групи неселективних та селективних інгібіторів ЦОГ, що підтверджує доцільність поглибленого вивчення похідних на основі 4-тіазолідинону як перспективних агентів у терапії холодової травми.

*Результати досліджень даного розділу наведені в публікаціях: [554, 555, 566-568, 573, 575, 581, 582, 587, 588, 615, 621, 630, 645, 654, 655]*

## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Розроблено ефективні методи синтезу і одержано 197 нових поліфункціональних конденсованих та неконденсованих похідних тiazолу/тiazолідинону, встановлена їх будова, вивчені фізико-хімічні параметри та біологічна активність. На основі комплексу досліджень кореляції "структура – біологічна дія", який включав віртуальний, традиційний та високоефективний фармакологічний скринінг, молекулярне та математичне моделювання, *in silico* оцінку лікоподібності та прогнозування токсичності, виділено 57 молекул з високою протипухлинною, антитрипаносомною, протимікробною, антиексудативною, антиоксидантною та протисудомною активностями для поглиблених досліджень та спрямованого синтезу нових біологічно активних гетероциклічних систем.
2. Показано, що реакції [3+3]-циклоконденсації 4-аміно-5*H*-тiazол-2-ону та різноманітних  $\alpha,\beta$ -ненасичених карбонільних сполук (енонів) є ефективним синтетичним підходом до тiazоло[4,5-*b*]піридин-2(3*H*)-онів, що дозволило одержати серії неописаних в науковій літературі 5,7-діарил-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів, 5-метил(ариліден)-7-феніл-3*H*-тiazоло[4,5-*b*]піридин-2-онів, 2-оксо-7-арил-2,3-дигідротiazоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот та їх амідів, які проявляють суттєву протимікробну, протигрибкову, антитрипаносомну та протипухлинну активності з певною селективною дією щодо окремих ліній клітин на рівні TGI.
3. Встановлено, що аліфатичні альдегіди 3-фенілпропаналь та цитраль є ефективними реагентами для реалізації схеми синтетичних перетворень, які включають реакції Кньюенагеля та *гетеро*-Дільса-Альдера на основі ізороданіну, що дозволило вперше одержати нові 6-замішені похідні *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-фенетил-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано [2,3-*d*]тiazол-2,5,7(6*H*)-тріону та *rel*-(4*aR*,7*aR*,8*R*)-8-((*E*)-2,6-диметилгепта-1,5-дієн-1-іл)-3,4*a*,7*a*,8-тетрагідропіроло[3',4':5,6]тіопірано [2,3-*d*]тiazол-2,5,7(6*H*)-тріону.
4. Показано, що метиловий естер (2-оксо-4-тіоксотiazолідин-5-іліден)-оцтової кислоти є ефективним гетеродієном в реакціях [4+2]-циклоприєднання з *N*-фенілмалеїнімідами, імідами 5-норборнен-2,3-дикарбонової кислоти, 1,4-

нафтохіноном та диметилцетилендикарбоксилатом як дієнофілами, що відкриває ефективний підхід до структурної функціоналізації тіопіранотіазолового ядра.

5. Встановлено, що *орто*-галогенозаміщені альдегіди при взаємодії з 4-тіоксо-2-тіазолідином утворюють неописані в літературі 1,4-дитіа-3-азаціклопента[*b*]нафтален-2-они, 1,4-дитіа-3,5-діазаціклопента[*b*]антрацен-2-они та 3-метил-1-феніл-3*H*-5,8-дитіа-1,2,7-тріаза-*s*-індацен-6-они, що відкриває новий синтетичний шлях до одержання конденсованих похідних з тіопіранотіазольним ядром у молекулах.
6. Розроблено регіоселективні методи синтезу 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів за реакцією *гетеро*-Дільса-Альдера 5-ен-ізороданінів та похідних нафтохінону (гідроксинафтален-1,4-діону, 5-гідрокси та 5-метоксинафтален-1,4-діонів) як дієнофілів, що розкриває нові підходи до молекулярного дизайну потенційних протипухлинних агентів.
7. За результатами полівекторного вивчення протипухлинної активності похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу встановлено групову протипухлинну цитотоксичність 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів, що дозволило виділити для поглиблених доклінічних досліджень 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріон з суттєвим цитотоксичним впливом на клітинні лінії меланоми та недрібноклітинного раку легень, а також раку молочної залози. Експериментально обґрунтовано, що зазначена сполука є потенційним інгібітором TGF- $\beta$  та індуктором апоптозу, а також має здатність до взаємодії з ДНК.
8. Проведено системне дослідження протимікробної активності функціонально заміщених тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, що дозволило ідентифікувати похідні 6-бензоіл-2-оксо-7-арил-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5-карбонових кислот з високою активністю щодо *S. aureus* MRSA та *C. albicans* та розробити гіпотетичну фармакофорну модель для оцінки прояву протистафілокової активності для гетероциклічних сполук даного класу.
9. Ідентифіковано 7-(4-хлорофеніл)-*N*-(*n*-толіл)-, *N*-(4-хлорофеніл)-7-(*n*-толіл)- та *N*,7-біс-(4-хлорофеніл)-2-оксо-5-феніл-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-

карбоксаміди, які пригнічували ріст паразитів *Trypanosoma brucei gambiense* у мікрота субмікромольних концентраціях ( $IC_{50} = 0,47-4,70$  мкМ), що обґрунтовує продовження системних досліджень протипаразитарного потенціалу похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу.

10. Вперше одержано кон'югати 7-заміщених 2-оксо-3,5,6,7-тетрагідро-2*H*-тіопірано[2,3-*d*]тіазол-6-карбальдегідів із лектинами та людським сироватковим альбуміном, які володіли цитотоксичним ефектом щодо ліній клітин аденокарциноми товстої кишки людини HCT-116, лейкемії миші L1210, Т-лімфобластної лейкемії людини Jurkat та були нетоксичними на псевдонормальну лінію клітин нирки ембріона людини HEK293. Зазначений підхід є одним із можливих варіантів підвищення біодоступності та посилення ефекту протипухлинних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів.
11. Вперше ідентифіковано селективний ефект щодо Т-лімфобластної лейкемії людини Jurkat та раку молочної залози лінії MCF-7 з низькими показниками токсичності на псевдонормальні клітини кератиноцитів людини лінії HaCaT для серії хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, що дозволяє розглядати зазначену тетрациклічну конденсовану систему як новий молекулярний каркас для дизайну потенційних протиракових агентів.
12. Проведено спрямований синтез та дослідження протипухлинної і протимікробної дії поліфункціональних 1(2)-гідразиноантрахінонів за реакцією азосполучення 1(2)-(морфолінодіазеніл)антрацен-9,10-діону з 4-тіазолідинонами і іншими метиленактивними сполуками, що дозволило встановити ряд нових особливостей кореляції «структура-дія» та ідентифікувати сполуки-хіти, що володіли високими показниками інгібування росту *C. albicans*. Крім того, запропоновано для поглиблених досліджень 1-[*N'*-(5-оксо-2-тіоксоімідазолідин-4-іліден)-гідразино]-антрахінон, для якого доведено селективність дії щодо клітинних ліній SF-539 (рак ЦНС), MDA-MB-435 (меланома), OVCAR-3 (рак яєчників), RXF 393 та UO-31 (рак нирок).
13. Вперше для 5-індоліденроданін-3-пропіонових/етансульфонових кислот встановлено протимікробну та протигрибкову активність відносно *E. coli*, *S. lentus*

та *C. albicans*, яка поєднує активуючий вплив на ланки клітинного імунітету та показники фагоцитарної активності, що є підставою для молекулярного дизайну індол-тіазолідинонових гібридних молекул як біологічно активних сполук.

14. Запропоновано нові напрямки дизайну «лікоподібних молекул» з фрагментом нестероїдного протизапального лікарського засобу диклофенаку у положеннях 3 та 5 4-тіазолідинонового кільця, для яких встановлено протипухлинну, протитрипаносомну та антиексудативну активності, що є фундаментальною основою для спрямованого синтезу нових агентів з поліфармакологічними властивостями у рамках гібрид-фармакофорного підходу.
15. Вперше встановлено високу протисудомну активність для (5*Z*)-2-аміно-5-[(3,5-дитрет-бутил-4-гідроксифеніл)метиліден]-4-тіазолідинону (дарбуфелону), його структурних аналогів та тіазол-тіазолідинонових гібридних молекул, для яких опрацьовано ефективні методи синтезу. Системне вивчення зазначених класів сполук дозволило запропонувати для поглиблених доклінічних досліджень 5-[(*Z*)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон, який на фоні значної протисудомної дії має здатність впливати на циклооксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти шляхом інгібування ЦОГ-1 і ЦОГ-2 та знижувати рівень маркерів пошкодження нейронів.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Golebiowski, A., Klopfenstein, S. R., & Portlock, D. E. (2003). Lead compounds discovered from libraries: part 2. *Current opinion in chemical biology*, 7(3), 308-325.
2. Khazir, J., Mir, B. A., Mir, S. A., & Cowan, D. (2013). Natural products as lead compounds in drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, 764-788.
3. Bevan, P., Ryder, H., & Shaw, I. (1995). Identifying small-molecule lead compounds: the screening approach to drug discovery. *Trends in Biotechnology*, 13(3), 115-121.
4. Tringali, C. (Ed.). (2011). *Bioactive compounds from natural sources: Natural products as lead compounds in drug discovery*. CRC Press.
5. Mandal, S., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 90-100.
6. Carnero, A. (2006). High throughput screening in drug discovery. *Clinical and Translational Oncology*, 8, 482-490.
7. Mayr, L. M., & Fuerst, P. (2008). The future of high-throughput screening. *SLAS Discovery*, 13(6), 443-448.
8. Dandapani, S., & Marcaurelle, L. A. (2010). Current strategies for diversity-oriented synthesis. *Current opinion in chemical biology*, 14(3), 362-370.
9. Viegas-Junior, C., Danuello, A., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current medicinal chemistry*, 14(17), 1829-1852.
10. Spandl, R. J., Bender, A., & Spring, D. R. (2008). Diversity-oriented synthesis; a spectrum of approaches and results. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(7), 1149-1158.
11. Schreiber, S. L. (2000). Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, 287(5460), 1964-1969.
12. Rouf, A., & Tanyeli, C. (2015). Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 911-927.

13. Ayati, A., Emami, S., Asadipour, A., Shafiee, A., & Foroumadi, A. (2015). Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 699-718.
14. Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring – A biologically active scaffold. *Molecules*, *26*(11), 3166.
15. DrugBank Online [DrugBank Data web service]. (2023). Retrieved from <https://go.drugbank.com/>.
16. Lauria, A., Ippolito, M., & Almerico, A. M. (2007). Molecular docking approach on the Topoisomerase I inhibitors series included in the NCI anti-cancer agents mechanism database. *Journal of Molecular Modeling*, *13*, 393-400.
17. Pogorelcnik, B., Perdih, A., & Solmajer, T. (2013). Recent developments of DNA poisons-human DNA topoisomerase II $\alpha$  inhibitors-as anticancer agents. *Current pharmaceutical design*, *19*(13), 2474-2488.
18. Shen, L. L. (1994). Molecular mechanisms of DNA gyrase inhibition by quinolone antibacterials. *Advances in Pharmacology*, *29*, 285-285.
19. Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews*, *61*(3), 377-392.
20. Mitton-Fry, M. J., Brickner, S. J., Hamel, J. C., Brennan, L., Casavant, J. M., Chen, M., Ding, X., Driscoll, J., Hardink, J., Hoang, T., Hua, E., Huband, M. D., Maloney, M., Marfat, A., McCurdy, S. P., McLeod, D., Plotkin, M., Reilly, U., Robinson, S., Schafer, J., Shepard, R. M., Smith, J. F., Stone, J. J., Subramanyam, C., Yoon, K., Yuan, W., Zaniewski, R. P., & Zook, C. (2013). Novel quinoline derivatives as inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *23*(10), 2955-2961.
21. Schultz, T. W., Yarbrough, J. W., Hunter, R. S., & Aptula, A. O. (2007). Verification of the structural alerts for Michael acceptors. *Chemical research in toxicology*, *20*(9), 1359-1363.
22. Ahn, B. Z., & Sok, D. E. (1996). Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. *Current Pharmaceutical Design*, *2*(3), 247-262.

23. Roseli, R. B., Keto, A. B., & Krenske, E. H. (2023). Mechanistic aspects of thiol additions to Michael acceptors: Insights from computations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *13*(2), e1636.
24. Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The essential medicinal chemistry of curcumin: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, *60*(5), 1620-1637.
25. Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews*, *117*(12), 7762-7810.
26. Baell, J. B., & Holloway, G. A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry*, *53*(7), 2719-2740.
27. Baell, J., & Walters, M. A. (2014). Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*, *513*(7519), 481-483.
28. Lesyk, R. B., & Zimenkovsky, B. S. (2004). 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Current Organic Chemistry*, *8*(16), 1547-1577.
29. Kryshchyshyn, A., Atamanyuk, D., & Lesyk, R. (2012). Fused thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives as potential anticancer agents. *Scientia pharmaceutica*, *80*(3), 509-530.
30. Poor Heravi, M. R., Hemmati, S., Nami, N., & Khalilzadeh, M. A. (2021). Synthesis of Novel Biologically Important 5-Amino-2-Oxo-7-Aryl-3,7-Dihydro-2*H*-Pyrano[2,3-*d*]Thiazole-6-Carbonitriles in Trifluoroethanol (TFE) under Ultrasound Irradiation Condition and Their Antimicrobial Activity. *Polycyclic Aromatic Compounds*, *41*(10), 2263-2273.
31. Wang, C., Gao, Z., Zhou, L., Yuan, C., Sun, Z., Xiao, Y., & Guo, H. (2016). Phosphine-Catalyzed [2+4] Annulation of Allenolates with Thiazolone-Derived Alkenes: Synthesis of Functionalized 6,7-Dihydro-5*H*-pyrano[2,3-*d*]thiazoles. *Organic letters*, *18*(14), 3418-3421.

32. Cui, L., Wang, Y., & Zhou, Z. (2016). Enantioselective synthesis of 7*H*-pyrano[2,3-*d*]thiazoles via squaramide-catalyzed [2+4] annulation of malononitrile and 5-ylidenethiazol-4-ones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 27(20-21), 1056-1061.
33. Mohareb, R. M., Khalil, E. M., Mayhoub, A. E., & Abdallah, A. E. (2020). Novel synthesis of pyran, thiophene, and pyridine derivatives incorporating thiazole ring and their antitumor evaluation. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 57(3), 1330-1343.
34. Mohareb, R., Al-Omran, F., Abdelaziz, M., & Ibrahim, R. (2017). Anti-inflammatory and Anti-ulcer Activities of New Fused Thiazole Derivatives Derived from 2-(2-Oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-4(5*H*)-one. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2), 349-364.
35. Mohareb, R. M., Abdallah, A. E., & Ahmed, E. A. (2017). Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiazole derivatives obtained from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile. *Acta Pharmaceutica*, 67(4), 495-510.
36. Abdallah, A. E., Mohareb, R. M., & Ahmed, E. A. (2019). Novel Pyrano[2,3-*d*]thiazole and Thiazolo[4,5-*b*]pyridine Derivatives: One-pot Three-component Synthesis and Biological Evaluation as Anticancer Agents, c-Met, and Pim-1 Kinase Inhibitors. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 56(11), 3017-3029.
37. Wu, W., Sun, Z., Wang, X., Lu, X., & Dai, D. (2020). Construction of thiazole-fused dihydropyrans via formal [4+2] cycloaddition reaction on DNA. *Organic letters*, 22(8), 3239-3244.
38. Salem, M. A. (2017). Synthesis of new thiazole, bithiazolidinone and pyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives as potential antimicrobial Agents. *Croatica Chemica Acta*, 90(1), 6-15.
39. Zaki, Y. H., Al-Gendey, M. S., & Abdelhamid, A. O. (2018). A facile synthesis, and antimicrobial and anticancer activities of some pyridines, thioamides, thiazole, urea, quinazoline,  $\beta$ -naphthyl carbamate, and pyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives. *Chemistry Central Journal*, 12, 1-14.
40. Rudolph, J., Chen, L., Majumdar, D., Bullock, W. H., Burns, M., Claus, T., Dela Cruz, F. E., Daly, M., Ehrgott, F. J., Johnson, J. S., Livingston, J. N.,

Schoenleber, R. W., Shapiro, J., Yang, L., Tsutsumi, M., & Ma, X. (2007). Indanylacetic Acid Derivatives Carrying 4-Thiazolyl-phenoxy Tail Groups, a New Class of Potent PPAR  $\alpha/\gamma/\delta$  Pan Agonists: Synthesis, Structure– Activity Relationship, and In Vivo Efficacy. *Journal of medicinal chemistry*, 50(5), 984-1000.

41. Mariappan, A., Rajaguru, K., Muthusubramanian, S., & Bhuvanesh, N. (2019). A facile one pot synthesis of thiazolo[3,2-*a*]benzimidazole and pyran fused polyheterocyclic scaffolds. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 17(17), 4196-4199.

42. Матійчук, В. С., Чабан, Т. І., & Горішній В. Я. (2020). *Тіазолоазини. Синтез та біологічна активність*. Львів: ЛНУ імені Івана Франка.

43. Nagarajaiah, H., Mukhopadhyay, A., & Moorthy, J. N. (2016). Biginelli reaction: an overview. *Tetrahedron Letters*, 57(47), 5135-5149.

44. S Panda, S., Khanna, P., & Khanna, L. (2012). Biginelli reaction: a green perspective. *Current Organic Chemistry*, 16(4), 507-520.

45. Heravi, M. M., Asadi, S., & Lashkariani, B. M. (2013). Recent progress in asymmetric Biginelli reaction. *Molecular diversity*, 17(2), 389-407.

46. Heravi, M. M., Moradi, R., Mohammadkhani, L., & Moradi, B. (2018). Current progress in asymmetric Biginelli reaction: an update. *Molecular Diversity*, 22, 751-767.

47. Wan, J. P., & Liu, Y. (2010). Synthesis of dihydropyrimidinones and thiones by multicomponent reactions: strategies beyond the classical Biginelli reaction. *Synthesis*, 2010(23), 3943-3953.

48. Youssef, A., Fouda, A. M., & Faty, R. M. (2018). Microwave assisted synthesis of some new thiazolopyrimidine and pyrimidothiazolopyrimidopyrimidine derivatives with potential antimicrobial activity. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1-14.

49. Banoth, S., Boda, S., Perugu, S., Balabadra, S., & Manga, V. (2018). Design, synthesis, biological evaluation and in silico molecular docking studies of novel benzochromeno[2,3-*d*]thiazolopyrimidine derivatives. *Research on Chemical Intermediates*, 44, 1833-1846.

50. Alzahrani, H. E., Fouda, A. M., & Youssef, A. M. (2020). Selective cyclization of S-substituted pyrimidinethione: Synthesis and antimicrobial evaluation of novel polysubstituted thiazolopyrimidine and thiazolodipyrimidine derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society*, *67*(5), 838-855.
51. Shahid Nadeem, M., Azam Khan, J., Kazmi, I., & Rashid, U. (2022). Design, synthesis, and bioevaluation of indole core containing 2-arylidine derivatives of thiazolopyrimidine as multitarget inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidase A/B for the treatment of alzheimer disease. *ACS omega*, *7*(11), 9369-9379.
52. Shashi, R., Prasad, N. L., & Begum, N. S. (2020). Synthesis and Crystal Structure of Thiazolopyrimidine Derivatives: Insights into Weak Interactions. *Crystallography Reports*, *65*, 1161-1168.
53. Basiony, E. A., Hassan, A. A., Al-Amshany, Z. M., Abd-Rabou, A. A., Abdel-Rahman, A. A. H., Hassan, N. A., & El-Sayed, W. A. (2020). Synthesis and cytotoxic activity of new thiazolopyrimidine sugar hydrazones and their derived acyclic nucleoside analogues. *Molecules*, *25*(2), 399.
54. Nazir, M. S., Nawaz, A., Aslam, S., Ahmad, M., Zahoor, A. F., & Mohsin, N. U. A. (2023). Synthetic strategies for thiazolopyridine derivatives. *Synthetic Communications*, *53*(7-8), 519-546.
55. El-Gaby, M. S. A., Al-Sehemi, A. G., Mohamed, Y. A., & Ammar, Y. A. (2006). Recent trends in chemistry of thiazolopyridines. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, *181*(3), 631-674.
56. Sukanya, S. H., Venkatesh, T., Rao, S. A., & Joy, M. N. (2022). Efficient L-Proline catalyzed synthesis of some new (4-substituted-phenyl)-1,5-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]thiazolo[3,2a]-pyrimidine-2,4(3H)-diones bearing thiazolopyrimidine derivatives and evaluation of their pharmacological activities. *Journal of Molecular Structure*, *1247*, 131324.
57. Batool, I., Saeed, A., Qureshi, I. Z., Kalsoom, S., & Razzaq, A. (2016). Synthesis, molecular docking and biological evaluation of new thiazolopyrimidine carboxylates as potential antidiabetic and antibacterial agents. *Research on Chemical Intermediates*, *42*, 1139-1163.

58. Al-Rashood, S. T., Elshahawy, S. S., El-Qaias, A. M., El-Behedy, D. S., Hassanin, A. A., El-Sayed, S. M., El-Messery, S. M., Shaldam, M. A., & Hassan, G. S. (2020). New thiazolopyrimidine as anticancer agents: Synthesis, biological evaluation, DNA binding, molecular modeling and ADMET study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(23), 127611.
59. Istanbulu, H., Bayraktar, G., Akbaba, H., Cavus, I., Coban, G., Debelec Butuner, B., Kilimcioglu, A. A., Ozbilgin, A., Alptuzun, V., & Erciyas, E. (2020). Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of novel thiazolopyrimidine derivatives as antileishmanial compounds. *Archiv der Pharmazie*, 353(8), 1900325.
60. Basyouni, W. M., Abbas, S. Y., El-Bayouki, K. A., Dawood, R. M., El Awady, M. K., & Abdelhafez, T. H. (2021). Synthesis and antiviral screening of 2-(propylthio)-7-substituted-thiazolo[5,4-*d*]pyrimidines as anti-bovine viral diarrhea virus agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 58(9), 1766-1774.
61. Abd Elhameed, A. A., El-Gohary, N. S., El-Bendary, E. R., Shaaban, M. I., & Bayomi, S. M. (2018). Synthesis and biological screening of new thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine and dithiazolo[3,2-*a*:5',4'-*e*]pyrimidinone derivatives as antimicrobial, antiquorum-sensing and antitumor agents. *Bioorganic Chemistry*, 81, 299-310.
62. Flefel, E. M., El-Sayed, W. A., Mohamed, A. M., El-Sofany, W. I., & Awad, H. M. (2017). Synthesis and anticancer activity of new 1-thia-4-azaspiro[4.5]decane, their derived thiazolopyrimidine and 1,3,4-thiadiazole thioglycosides. *Molecules*, 22(1), 170.
63. Saeedian Moghadam, E., Sameem, B., Abdel-Jalil, R., Faramarzi, M. A., & Amini, M. (2021). 5-Benzylidene-2,3-diarylthiazolidine-4-ones: Design, synthesis, spectroscopic characterization, *in vitro* biological and computational evaluation. *Synthetic Communications*, 51(17), 2668-2683.
64. Pelletier, S., Pinson, B., Smejkal, T., & Lamberth, C. (2013). A general synthesis of tetrahydropyrazolo[3,4-*d*]thiazoles. *Tetrahedron*, 69(23), 4641-4651.
65. Kaminsky, D., Khylyuk, D., Vasylenko, O., & Lesyk, R. (2012). An efficient method for the transformation of 5-ylidenerhodanines into 2,3,5-trisubstituted-4-thiazolidinones. *Tetrahedron Letters*, 53(5), 557-559.

66. Kaminsky, D., Khylyuk, D., Vasylenko, O., Zaprutko, L., & Lesyk, R. (2011). A facile synthesis and anticancer activity evaluation of spiro[thiazolidinone-isatin] conjugates. *Scientia pharmaceutica*, 79(4), 763-778.
67. Хилюк, Д. В. (2019). *Синтез, перетворення та біологічна активність 2,3-диарил(гетерил) 4-тіазолідонів* [Дисертація кандидата фармацевтичних наук, ЛНМУ імені Данила Галицького].
68. Abdildinova, A., Yang, S. J., & Gong, Y. D. (2016). Solid-Phase Parallel Synthesis of N-Substituted-2-aminothiazolo[4,5-*b*]pyrazine Derivatives via Tandem Reaction of Isothiocyanate Terminated Resin with *o*-Bromo-2-Aminopyrazines. *ACS Combinatorial Science*, 18(12), 702-709.
69. Sawazaki, T., Sohma, Y., & Kanai, M. (2022). Knoevenagel Condensation between 2-Methyl-thiazolo[4,5-*b*]pyrazines and Aldehydes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 70(1), 82-84.
70. Ghoneim, A. A., & Ali Hassan, A. G. (2022). An Efficient Procedure of Synthesis Acyclic C-Glycosides of Thiazolo[4,5-*b*]Pyrazine and Imidazo[4,5-*d*]Thiazole with Expected Anti-Cancer Activities. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(6), 3328-3338.
71. Ammar, Y. A., Farag, A. A., Ali, A. M., Hessein, S. A., Askar, A. A., Fayed, E. A., Elsisy, D. M., & Ragab, A. (2020). Antimicrobial evaluation of thiadiazino and thiazolo quinoxaline hybrids as potential DNA gyrase inhibitors; design, synthesis, characterization and morphological studies. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103841.
72. Lemos, T. L., Monte, F. J., Santos, A. K. L., Fonseca, A. M., Santos, H. S., Oliveira, M. F., Costa, S. M. O., Pessoa, O. D. L., & Braz-Filho, R. (2007). Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. *Natural Product Research*, 21(6), 529-550.
73. Lu, J. J., Bao, J. L., Wu, G. S., Xu, W. S., Huang, M. Q., Chen, X. P., & Wang, Y. T. (2013). Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer



agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(3), 456-463.

74. Martínez, M. J. A., & Benito, P. B. (2005). Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 303-366.

75. Ranade, S., & David, S. B. (1985). Quinones as plant growth regulators. *Plant growth regulation*, 3, 3-13.

76. Thomson, R. H. (2012). *Naturally occurring quinones*. Elsevier.

77. Eyonga, K. O., Kueteb, V., & Efferth, T. (2013). 10 Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*, 351.

78. Packter, N. M. (1965). Studies on the biosynthesis of quinones in fungi. Incorporation of 6-methylsalicylic acid into fumigatin and related compounds in *Aspergillus fumigatus* IMI 89353. *Biochemical Journal*, 97(2), 321-332.

79. Christiansen, J. V., Isbrandt, T., Petersen, C., Sondergaard, T. E., Nielsen, M. R., Pedersen, T. B., Sørensen, J. L., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2021). Fungal quinones: diversity, producers, and applications of quinones from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*, and *Arthrinium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-37.

80. Christiansen, J. V., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2022). Production of Fungal Quinones: Problems and Prospects. *Biomolecules*, 12(8), 1041.

81. Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11365-11370.

82. Fenn, K., Strandwitz, P., Stewart, E. J., Dimise, E., Rubin, S., Gurubacharya, S., Clardy, J., & Lewis, K. (2017). Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*, 5(1), 1-11.

83. Imhoff, J. F. (1984). Quinones of phototrophic purple bacteria. *FEMS microbiology letters*, 25(1), 85-89.

84. Watanuki, M., & Aida, K. (1972). Significance of quinones in the classification of bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 18(6), 469-472.
85. Morishita, T., Tamura, N., Makino, T., & Kudo, S. (1999). Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82(9), 1897-1903.
86. Sunassee, S. N., & Davies-Coleman, M. T. (2012). Cytotoxic and antioxidant marine prenylated quinones and hydroquinones. *Natural Product Reports*, 29(5), 513-535.
87. Riguera, R. (1997). Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*, 5, 187-193.
88. García, P. A., Hernández, Á. P., San Feliciano, A., & Castro, M. Á. (2018). Bioactive prenyl- and terpenyl-quinones/hydroquinones of marine origin. *Marine Drugs*, 16(9), 292.
89. de Rosa, S., & Tommonaro, G. (2012). Bioactive marine prenylated quinones/quinols. *Studies in Natural Products Chemistry*, 36, 163-218.
90. Ando, Y., & Suzuki, K. (2018). Photoredox reactions of quinones. *Chemistry—A European Journal*, 24(60), 15955-15964.
91. Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental pollution*, 130(3), 465-476.
92. Mallakin, A., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2000). Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. *Chemosphere*, 40(12), 1435-1441.
93. Lee, R. F. (2003). Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2), 157-162.
94. Martínez, M. J. A., & Benito, P. B. (2005). Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 303-366.
95. Powis, G. (1989). Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(1), 63-101.

96. Pillow, T. (2022). ortho-Quinone drugs go pro. *Nature Chemistry*, 14(7), 719-720.
97. Asche, C. (2005). Antitumour quinones. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(5), 449-467.
98. Hammam, A. S., & Bayoumy, B. E. (1985). Reaction of thioamides with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone. A novel synthesis of naphtho[2,3-*d*]thiazole-4,9-diones. *Collection of Czechoslovak chemical communications*, 50(1), 71-79.
99. Al-Alshaikh, M. A., & Lahsasni, S. A. (2013). Synthesis of Novel 2,3-Disubstituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives Containing Indole, Quinoline, Thiazole and Imidazole Moieties. *Asian Journal of Chemistry*, 25(18), 0000-0000.
100. Fandy, R. F. (2000). Synthesis of heterocyclic quinones containing bridgehead nitrogen atom from 2-aminonaphtho[2,3-*d*]thiazole-4,9-dione. *Heterocyclic Communications*, 6(6), 585-590.
101. Стесевич, М. В. (2020). *Функціоналізовані похідні 1(2)-аміно-9,10-антрацендіону: синтез та біологічна активність* [Дисертація доктора хімічних наук, Національний університет «Львівська політехніка»].
102. Olawode, E. O., Tandlich, R., Prinsloo, E., Isaacs, M., Hoppe, H., Seldon, R., Warner, D. F., Steenkamp, V., & Kaye, P. T. (2019). Synthesis and biological evaluation of 2-chloro-3-[(thiazol-2-yl)amino]-1,4-naphthoquinones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(13), 1572-1575.
103. Khalafy, J., Ghezelbash, Z. D., & Mahmood, M. (2010). Synthesis of naphtho[2',3':4,5]imidazo[2,1-*b*][1,3]-thiazole-5,10-dione and naphtho[2',3':4,5]imidazo-[2,1-*b*][1,3]benzothiazole-7,12-dione. *Chemistry of heterocyclic compounds*, 46, 613-616.
104. Kose, M., Şekerci, Ç. Y., Suzuki, K., & Yokoyama, Y. (2011). Synthesis of photochromic 2,3-bis (5-methyl-2-phenyl-4-thiazolyl)-1,4-naphthoquinone derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219(1), 58-61.
105. Liang, Y. K., Yue, Z. Z., Li, J. X., Tan, C., Miao, Z. H., Tan, W. F., & Yang, C. H. (2014). Natural product-based design, synthesis and biological evaluation

of anthra[2,1-*d*]thiazole-6,11-dione derivatives from rhein as novel antitumour agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 505-515.

106. Ishiyama, D., Kanai, Y., Senda, H., Iwatani, W., Takahashi, H., Konno, H., & Kanazawa, S. (2000). Novel Human Topoisomerase I Inhibitors, Topopyrones A, B, C and D II. Structure Elucidation. *The Journal of Antibiotics*, 53(9), 873-878.

107. Gattinoni, S., Merlini, L., & Dallavalle, S. (2007). First total synthesis of topopyrone C. *Tetrahedron letters*, 48(6), 1049-1051.

108. Zaleski, P. A., Maini, R., Leiris, S. J., Elban, M. A., & Hecht, S. M. (2012). Synthesis and biological activities of topopyrones. *Journal of Natural Products*, 75(4), 577-585.

109. Khan, Q. A., Elban, M. A., & Hecht, S. M. (2008). The topopyrones poison human DNA topoisomerases I and II. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39), 12888-12889.

110. Aziz, S., Ch, M. A., Ghani, K. S., Yasin, K. A., Hussain, H., & Krohn, K. (2016). Efficient Synthesis and Biological Evaluation of Topopyrone C Derivatives. *Chemistry of natural compounds*, 52, 58-61.

111. Dallavalle, S., Gattinoni, S., Mazzini, S., Scaglioni, L., Merlini, L., Tinelli, S., Beretta, G. L., & Zunino, F. (2008). Synthesis and cytotoxic activity of a new series of topoisomerase I inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(4), 1484-1489.

112. Chen, T. C., Yu, D. S., Huang, K. F., Fu, Y. C., Lee, C. C., Chen, C. L., Huang F. C., Hsieh, H. H., Lin, J. J. & Huang, H. S. (2013). Structure-based design, synthesis and biological evaluation of novel anthra[1,2-*d*]imidazole-6,11-dione homologues as potential antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry*, 69, 278-293.

113. Stasevych, M. V., Zvarych, V. I., Stan'ko, O. V., Vovk, M. V., & Novikov, V. P. (2014). Synthesis of 2-(*N*-benzoylimino)-*N*-(9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-yl)thiazoles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 49(12), 1831-1833.

114. Berghot, M. A., Kandeel, E. M., Abdel-Rahman, A. H., & Abdel-Motaal, M. (2014). Synthesis, antioxidant and cytotoxic activities of novel naphthoquinone derivatives from 2,3-dihydro-2,3-epoxy-1,4-naphthoquinone. *Med. Chem*, *4*(3), 381-388.
115. Garuti, L., Roberti, M., Pession, A., Leoncini, E., & Hrelia, S. (2001). Synthesis and antiproliferative activity of some thiazolylbenzimidazole-4,7-diones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *11*(24), 3147-3149.
116. Lavergne, O., Fernandes, A. C., Bréhu, L., Sidhu, A., Brézak, M. C., Prévost, G., Ducommun, B., & Contour-Galcera, M. O. (2006). Synthesis and biological evaluation of novel heterocyclic quinones as inhibitors of the dual specificity protein phosphatase CDC25C. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *16*(1), 171-175.
117. Andreani, A., Granaiola, M., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., Rambaldi, M., Recanatini, M., Lenaz, G., Fato, R., & Bergamini, C. (2004). Effects of new ubiquinone-imidazo[2,1-*b*]thiazoles on mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone reductase) and on mitochondrial permeability transition pore. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *12*(21), 5525-5532.
118. Valderrama, J. A., González, M. F., Pessoa-Mahana, D., Tapia, R. A., Fillion, H., Pautet, F., Rodriguez, J. A., Theoduloz, Сюб & Schmeda-Hirschmann, G. (2006). Studies on quinones. Part 41: Synthesis and cytotoxicity of isoquinoline-containing polycyclic quinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *14*(14), 5003-5011.
119. Carroll, A. R., & Scheuer, P. J. (1990). Kuanoniamines A, B, C, and D: Pentacyclic alkaloids from a tunicate and its prosobranch mollusk predator *Chelynotus semperi*. *The Journal of Organic Chemistry*, *55*(14), 4426-4431.
120. Kijjoa, A., Wattanadilok, R., Campos, N., Nascimento, M. S. J., Pinto, M., & Herz, W. (2007). Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Marine Drugs*, *5*(2), 6-22.

121. Machihara, K., & Namba, T. (2020). Kuanoniamine C stimulates bortezomib-induced cell death via suppression of glucose-regulated protein 78 in osteosarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(1), 289-296.
122. Ibrahim, S. R., & Mohamed, G. A. (2016). Marine pyridoacridine alkaloids: Biosynthesis and biological activities. *Chemistry & Biodiversity*, 13(1), 37-47.
123. Lyon, M. A., Lawrence, S., Williams, D. J., & Jackson, Y. A. (1999). Synthesis and structure verification of an analogue of kuanoniamine A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (4), 437-442.
124. Atamanyuk, D., Zimenkovsky, B., Atamanyuk, V., Nektgayev, I., & Lesyk, R. (2013). Synthesis and biological activity of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles containing a naphthoquinone moiety. *Scientia Pharmaceutica*, 81(2), 423-436.
125. Atamanyuk, D., Zimenkovsky, B., Atamanyuk, V., & Lesyk, R. (2014). 5-Ethoxymethylidene-4-thioxo-2-thiazolidinone as versatile building block for novel biorelevant small molecules with thiopyrano[2,3-*d*][1,3]thiazole core. *Synthetic Communications*, 44(2), 237-244.
126. Stumvoll, M., & Häring, H. U. (2002). Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Annals of medicine*, 34(3), 217-224.
127. Thaggikuppe Krishnamurthy, P., Joghee Nanjan Chandrasekar, M., & Joghee Nanjan, M. (2013). Newer approaches to the discovery of glitazones. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10(1), 66-72.
128. Fong, D. S., & Contreras, R. (2009). Glitazone use associated with diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 147(4), 583-586.
129. Mudaliar, S., & Henry, R. R. (2001). New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Annual review of medicine*, 52(1), 239-257.
130. Lalloyer, F., & Staels, B. (2010). Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(5), 894-899.

131. Bortolini, M., Wright, M. B., Bopst, M., & Balas, B. (2013). Examining the safety of PPAR agonists—current trends and future prospects. *Expert opinion on drug safety*, *12*(1), 65-79.
132. Mandal, S. P., Garg, A., Prabitha, P., Wadhvani, A. D., Adhikary, L., & Kumar, B. R. (2018). Novel glitazones as PPAR $\gamma$  agonists: molecular design, synthesis, glucose uptake activity and 3D QSAR studies. *Chemistry Central Journal*, *12*(1), 1-21.
133. Kumar, A. P., Mandal, S., Prabitha, P., Faizan, S., Kumar, B. P., Dhanabal, S. P., & Justin, A. (2022). Rational design, molecular docking, dynamic simulation, synthesis, PPAR- $\gamma$  competitive binding and transcription analysis of novel glitazones. *Journal of Molecular Structure*, *1265*, 133354.
134. Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspé, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., Herbert, J.-M., Winegar, D. A., Willson, T. M., Fruchart, J.-C., Berge, R. K., & Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16638-16642.
135. Chinetti-Gbaguidi, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2005). Therapeutical effects of PPAR agonists assessed by biomarker modulation. *Biomarkers*, *10*(sup1), 30-36.
136. Jones, A. B. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) modulators: Diabetes and beyond. *Medicinal research reviews*, *21*(6), 540-552.
137. Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, *19*(5), 557-566.
138. Olefsky, J. M., & Saltiel, A. R. (2000). PPAR $\gamma$  and the treatment of insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *11*(9), 362-368.
139. Houseknecht, K. L., Cole, B. M., & Steele, P. J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and its ligands: a review. *Domestic animal endocrinology*, *22*(1), 1-23.

140. Boelsterli, U. A., & Bedoucha, M. (2002). Toxicological consequences of altered peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) expression in the liver: insights from models of obesity and type 2 diabetes. *Biochemical pharmacology*, *63*(1), 1-10.
141. Kadowaki, T., Hara, K., Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Eto, K., Kadowaki, H., Noda, M., Hagura, R., & Akanuma, Y. (2002). The role of PPAR $\gamma$  in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Journal of diabetes and its complications*, *16*(1), 41-45.
142. Spiegelman, B. M. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, *47*(4), 507-514.
143. Zierath, J. R., Ryder, J. W., Doebber, T., Woods, J., Wu, M., Ventre, J., Li, Z., McCrary, C., Berger, J., Zhang, B., & Moller, D. E. (1998). Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPAR $\gamma$  agonist) action. *Endocrinology*, *139*(12), 5034-5041.
144. Heikkinen, S., Auwerx, J., & Argmann, C. A. (2007). PPAR $\gamma$  in human and mouse physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*(8), 999-1013.
145. Tachibana, K., Yamasaki, D., & Ishimoto, K. (2008). The role of PPARs in cancer. *PPAR research*, 2008.
146. Szychowski, K. A., Leja, M. L., Kaminsky, D. V., Kryshchychyn, A. P., Binduga, U. E., Pinyazhko, R., Lesyk, R., Tobiasz, J., & Gmiński, J. (2017). Anticancer properties of 4-thiazolidinone derivatives depend on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). *European Journal of Medicinal Chemistry*, *141*, 162-168.
147. Bar, M., Skóra, B., Tabęcka-Łonczyńska, A., Holota, S., Khylyuk, D., Roman, O., Lesyk, R., & Szychowski, K. A. (2022). New 4-thiazolidinone-based molecules Les-2769 and Les-3266 as possible PPAR $\gamma$  modulators. *Bioorganic Chemistry*, *128*, 106075.
148. McCommis, K. S., Hodges, W. T., Brunt, E. M., Nalbantoglu, I., McDonald, W. G., Holley, C., Fujiwara, H., Schaffer, J. E., Colca, J. R., & Finck, B.



N. (2017). Targeting the mitochondrial pyruvate carrier attenuates fibrosis in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 65(5), 1543-1556.

149. Zhu, H., Wan, H., Wu, L., Li, Q., Liu, S., Duan, S., Huang, Z., Zhang, C., Zhang, B., Xing, C., & Yuan, Y. (2020). Mitochondrial pyruvate carrier: a potential target for diabetic nephropathy. *BMC nephrology*, 21, 1-10.

150. Dunlop, M. (2000). Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international*, 58, S3-S12.

151. Quattrini, L., & La Motta, C. (2019). Aldose reductase inhibitors: 2013-present. *Expert opinion on therapeutic patents*, 29(3), 199-213.

152. de la Fuente, J. Á., & Manzanaro, S. (2003). Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Natural Product Reports*, 20(2), 243-251.

153. Kharyal, A., Ranjan, S., Jaswal, S., Parveen, D., Gupta, G. D., Thareja, S., & Verma, S. K. (2022). Research Progress on 2, 4-Thiazolidinedione and 2-Thioxo-4-thiazolidinone Analogues as Aldose Reductase Inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 133742.

154. Ramirez, M. A., & Borja, N. L. (2008). Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 28(5), 646-655.

155. Mucke, H. A. M., Mucke, E., & Mucke, P. M. (2014). Aldose reductase inhibitors for diabetic cataract: A study of disclosure patterns in patents and peer review papers. *Ophthalmol. Res.: An Intl. J.*, 2, 137-149.

156. Noh, H. L., Hu, Y., Park, T. S., DiCioccio, T., Nichols, A. J., Okajima, K., Homma, S., & Goldberg, I. J. (2009). Regulation of plasma fructose and mortality in mice by the aldose reductase inhibitor lidoestat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 496-503.

157. Zhai, J., Zhang, H., Zhang, L., Zhao, Y., Chen, S., Chen, Y., Peng, X., Li, Q., Yuan, M., & Hu, X. (2013). Zopolrestat as a human glyoxalase I inhibitor and its structural basis. *ChemMedChem*, 8(9), 1462-1464.

158. Liaras, K., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2018). Thiazoles and thiazolidinones as COX/LOX inhibitors. *Molecules*, 23(3), 685.

159. Inxight Drugs [NCATS Inxight Drugs portal for drug development information]. (2023). Retrieved from <https://drugs.ncats.io/>
160. Ye, X., Zhou, W., Li, Y., Sun, Y., Zhang, Y., Ji, H., & Lai, Y. (2010). Darbufelone, a novel anti-inflammatory drug, induces growth inhibition of lung cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *66*, 277-285.
161. Sklyarova, Y., Fomenko, I., Lozynska, I., Lozynskyi, A., Lesyk, R., & Sklyarov, A. (2017). Hydrogen sulfide releasing 2-mercaptoacrylic acid-based derivative possesses cytoprotective activity in a small intestine of rats with medication-induced enteropathy. *Scientia Pharmaceutica*, *85*(4), 35.
162. Sharma, R. N., Xavier, F. P., Vasu, K. K., Chaturvedi, S. C., & Pancholi, S. S. (2009). Synthesis of 4-benzyl-1,3-thiazole derivatives as potential anti-inflammatory agents: an analogue-based drug design approach. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *24*(3), 890-897.
163. Roszczenko, P., Holota, S., Szewczyk, O. K., Dudchak, R., Bielawski, K., Bielawska, A., & Lesyk, R. (2022). 4-Thiazolidinone-Bearing Hybrid Molecules in Anticancer Drug Design. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(21), 13135.
164. de Siqueira, L. R. P., de Moraes Gomes, P. A. T., de Lima Ferreira, L. P., de Melo Rêgo, M. J. B., & Leite, A. C. L. (2019). Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *170*, 237-260.
165. Li, M., Sala, V., De Santis, M. C., Cimino, J., Cappello, P., Pianca, N., Di Bona, A., Margaria, J. P., Martini, M., Lazzarini, E., Pirozzi, F., Rossi, L., Franco, I., Bornbaum, J., Heger, J., Rohrbach, S., Perino, A., Tocchetti, C. G., Lima, B. H. F., Teixeira, M. M., Porporato, P. E., Schulz, R., Angelini, A., Sandri, M., Ameri, P., Sciarretta, S., Lima-Júnior, R. C. P., Mongillo, M., Zaglia, T., Morello, F., Novelli, F., Hirsch E., & Ghigo, A. (2018). Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition protects from anthracycline cardiotoxicity and reduces tumor growth. *Circulation*, *138*(7), 696-711.
166. Huang, S., Liu, Y., Chen, Z., Wang, M., & Jiang, V. C. (2022). PIK-75 overcomes venetoclax resistance via blocking PI3K-AKT signaling and MCL-1

expression in mantle cell lymphoma. *American Journal of Cancer Research*, 12(3), 1102.

167. Xie, J., Li, Q., Ding, X., & Gao, Y. (2017). GSK1059615 kills head and neck squamous cell carcinoma cells possibly via activating mitochondrial programmed necrosis pathway. *Oncotarget*, 8(31), 50814.

168. Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., & Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular cancer*, 18(1), 1-17.

169. Zheng, W., Degterev, A., Hsu, E., Yuan, J., & Yuan, C. (2008). Structure–activity relationship study of a novel necroptosis inhibitor, necrostatin-7. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(18), 4932-4935.

170. Dayam, R., Aiello, F., Deng, J., Wu, Y., Garofalo, A., Chen, X., & Neamati, N. (2006). Discovery of small molecule integrin  $\alpha\beta3$  antagonists as novel anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*, 49(15), 4526-4534.

171. Hamidi, H., & Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 18(9), 533-548.

172. Björklund, M., Aitio, O., Stefanidakis, M., Suojanen, J., Salo, T., Sorsa, T., & Koivunen, E. (2006). Stabilization of the activated  $\alpha M\beta 2$  integrin by a small molecule inhibits leukocyte migration and recruitment. *Biochemistry*, 45(9), 2862-2871.

173. Suojanen, J., Salo, T., Sorsa, T., & Koivunen, E. (2007).  $\alpha M\beta 2$  Integrin modulator exerts antitumor activity in vivo. *Anticancer research*, 27(6B), 3775-3781.

174. Sawaguchi, Y., Yamazaki, R., Nishiyama, Y., Sasai, T., Mae, M., Abe, A., Yaegashi, T., Nishiyama, H., & Matsuzaki, T. (2017). Rational design of a potent pan-pim kinases inhibitor with a rhodanine–benzoimidazole structure. *Anticancer Research*, 37(8), 4051-4057.

175. Vatolin, S., Phillips, J. G., Jha, B. K., Govindgari, S., Hu, J., Grabowski, D., Parker, Y., Lindner, D. J., Zhong, F., Distelhorst, C. W., Smith, M. R., Cotta, C., Xu, Y., Chilakala, S., Kuang, R. R., Tall, S., & Reu, F. J. (2016). Novel Protein Disulfide Isomerase Inhibitor with Anticancer Activity in Multiple MyelomaMyeloma

Control with Protein Disulfide Isomerase Inhibition. *Cancer research*, 76(11), 3340-3350.

176. Lee, E. (2017). Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. *BMB reports*, 50(8), 401.

177. Huang, M. J., Cheng, Y. C., Liu, C. R., Lin, S., & Liu, H. E. (2006). A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Experimental hematology*, 34(11), 1480-1489.

178. Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical cancer research*, 18(20), 5546-5553.

179. Prochownik, E. V. (2004). c-Myc as a therapeutic target in cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 4(2), 289-302.

180. Pelengaris, S., & Khan, M. (2003). The many faces of c-MYC. *Archives of biochemistry and biophysics*, 416(2), 129-136.

181. Degterev, A., Lugovskoy, A., Cardone, M., Mulley, B., Wagner, G., Mitchison, T., & Yuan, J. (2001). Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nature cell biology*, 3(2), 173-182.

182. Zhou, F., Yang, Y., & Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *The FEBS journal*, 278(3), 403-413.

183. Reed, J. C., Miyashita, T., Takayama, S., Wang, H. G., Sato, T., Krajewski, S., Aimé-Sempé, C., Bodrug, S., Kitada, S., & Hanada, M. (1996). Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *Journal of cellular biochemistry*, 60(1), 23-32.

184. Reed, J. C. (1995). Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current opinion in oncology*, 7(6), 541-546.

185. Wang, S. (2003). Targeting Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin. Oncol.*, 30, 133-142.

186. Cutshall, N. S., O'Day, C., & Prezhdo, M. (2005). Rhodanine derivatives as inhibitors of JSP-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(14), 3374-3379.

187. Shen, Y., Lucche, R., Wei, B., Gordon, M. L., Diltz, C. D., & Tonks, N. K. (2001). Activation of the Jnk signaling pathway by a dual-specificity phosphatase, JSP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13613-13618.
188. McCain, D. F., & Zhang, Z. Y. (2003). Tyrosine phosphatases in cancer: targets for therapeutic intervention. In *Protein Phosphatases* (pp. 359-374). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
189. Carter, P. H., Scherle, P. A., Muckelbauer, J. A., Voss, M. E., Liu, R. Q., Thompson, L. A., Tebben, A. J., Solomon, K. A., Lo, Y. C., Li, Z., Strzemienski, P., Yang G., Falahatpisheh, N., Xu, M., Wu, Z., Farrow, N. A., Ramnarayan, K., Wang, J., Rideout, D., Yalamoor, V., Domaille, P., Underwood, D. J., Trzaskos, J. M., Friedman, S. M., Newton, R. C., & Decicco, C. P. (2001). Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF- $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 11879-11884.
190. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49(7), 1215-1228.
191. Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A., & Moldawer, L. L. (2003). Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nature reviews Drug discovery*, 2(9), 736-746.
192. Chaparro, M., Guerra, I., Muñoz-Linares, P., & Gisbert, J. P. (2012). Systematic review: antibodies and anti-TNF- $\alpha$  levels in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(9), 971-986.
193. Balkwill, F. (2006). TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25, 409-416.
194. Lejeune, F. J., Rüegg, C., & Liénard, D. (1998). Clinical applications of TNF- $\alpha$  in cancer. *Current opinion in immunology*, 10(5), 573-580.
195. Zidi, I., Mestiri, S., Bartegi, A., & Amor, N. B. (2010). TNF- $\alpha$  and its inhibitors in cancer. *Medical Oncology*, 27, 185-198.

196. Atzeni, F., Turiel, M., Capsoni, F., Doria, A., Meroni, P., & Sarzi-Puttini, P. (2005). Autoimmunity and anti-TNF- $\alpha$  agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051(1), 559-569.
197. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in autoimmune disease and current TNF- $\alpha$  inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719.
198. Sethi, G., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2009). Targeting TNF for treatment of cancer and autoimmunity. *Therapeutic Targets of the TNF Superfamily*, 37-51.
199. Anh, D. T., Hai, P. T., Park, E. J., Jun, H. W., Kang, J. S., Kwon, J. H., Dung, D. T. M., Anh, V. T., Hue, V. T. M., Han, S. B., & Nam, N. H. (2020). Exploration of certain 1,3-oxazole-and 1,3-thiazole-based hydroxamic acids as histone deacetylase inhibitors and antitumor agents. *Bioorganic Chemistry*, 101, 103988.
200. Barneda-Zahonero, B., & Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Molecular oncology*, 6(6), 579-589.
201. Ge, L., Hu, Q., Shi, M., Yang, H., & Zhu, G. (2017). Design and discovery of novel thiazole derivatives as potential MMP inhibitors to protect against acute lung injury in sepsis rats via attenuation of inflammation and apoptotic oxidative stress. *RSC advances*, 7(52), 32909-32922.
202. Shay, G., Lynch, C. C., & Fingleton, B. (2015). Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix biology*, 44, 200-206.
203. Foda, H. D., & Zucker, S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug discovery today*, 6(9), 478-482.
204. Hu, C. M., Zhu, J., Guo, X. E., Chen, W., Qiu, X. L., Ngo, B., Chien, R., Wang, Y. V., Tsai, C. Y., Wu, G., Kim, Y., Lopez, R., Chamberlin, A. R., Lee, E. H., & Lee, W. H. (2015). Novel small molecules disrupting Hec1/Nek2 interaction ablate tumor progression by triggering Nek2 degradation through a death-trap mechanism. *Oncogene*, 34(10), 1220-1230.

205. Wilson, K. J., Illig, C. R., Subasinghe, N., Hoffman, J. B., Rudolph, M. J., Soll, R., Molloy, C. J, Bone, R., Green, D., Randall, T., Zhang, M., Lewandowski, F. A., Zhou, Z., Sharp, C, Maguire, D., Grasberger, B., DesJarlais, R. L, & Spurlino, J. (2001). Synthesis of thiophene-2-carboxamidines containing 2-amino-thiazoles and their biological evaluation as urokinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(7), 915-918.
206. Shen, X., Zhao, L., Chen, P., Gong, Y., Liu, D., Zhang, X., Dai, L., Sun, Q., Lou, J., Jin, Z., Zhang, B., Niu, D., Chen, C., Qui, X., & Jia, D. (2019). A thiazole-derived oridonin analogue exhibits antitumor activity by directly and allosterically inhibiting STAT3. *Journal of Biological Chemistry*, 294(46), 17471-17486.
207. Aly, A. A., Bräse, S., Hassan, A. A., Mohamed, N. K., El-Haleem, L. E. A., Nieger, M., Morsy, N. M., Alshammari, M. B., Ibrahim, M. A. A., & Abdelhafez, E. M. (2020). Design, synthesis, and molecular docking of paracyclophanyl-thiazole hybrids as novel CDK1 inhibitors and apoptosis inducing anti-melanoma agents. *Molecules*, 25(23), 5569.
208. Xie, X. X., Li, H., Wang, J., Mao, S., Xin, M. H., Lu, S. M., Mei, Q. B., & Zhang, S. Q. (2015). Synthesis and anticancer effects evaluation of 1-alkyl-3-(6-(2-methoxy-3-sulfonylamino-pyridin-5-yl)benzo[d]thiazol-2-yl)urea as anticancer agents with low toxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(19), 6477-6485.
209. Luke, R. W., Ballard, P., Buttar, D., Campbell, L., Curwen, J., Emery, S. C., Griffen, A. M., Hassall, L., Hayter, B. R., Jones, C. D., McCoull, W., Mellor, M., Swain, M. L., & Tucker, J. A. (2009). Novel thienopyrimidine and thiazolopyrimidine kinase inhibitors with activity against Tie-2 in vitro and in vivo. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(23), 6670-6674.
210. Duran, C. L., Borriello, L., Karagiannis, G. S., Entenberg, D., Oktay, M. H., & Condeelis, J. S. (2021). Targeting Tie2 in the tumor microenvironment: from angiogenesis to dissemination. *Cancers*, 13(22), 5730.
211. Borcea, A. M., Ionuț, I., Crișan, O., & Oniga, O. (2021). An overview of the synthesis and antimicrobial, antiprotozoal, and antitumor activity of thiazole and bithiazole derivatives. *Molecules*, 26(3), 624.

212. Mishra, I., Mishra, R., Mujwar, S., Chandra, P., & Sachan, N. (2020). A retrospect on antimicrobial potential of thiazole scaffold. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 57(6), 2304-2329.
213. Garnaik, B., & Dash, S. (2014). Recent advances and potential antimicrobial activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 7(4), 446-457.
214. Borcea, A. M., Ionuț, I., Crișan, O., & Oniga, O. (2021). An overview of the synthesis and antimicrobial, antiprotozoal, and antitumor activity of thiazole and bithiazole derivatives. *Molecules*, 26(3), 624.
215. Sim, M. M., Ng, S. B., Buss, A. D., Crasta, S. C., Goh, K. L., & Lee, S. K. (2002). Benzylidene rhodanines as novel inhibitors of UDP-N-acetylmuramate/L-alanine ligase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(4), 697-699.
216. Grant, E. B., Guiadeen, D., Baum, E. Z., Foleno, B. D., Jin, H., Montenegro, D. A., Nelson, E. A., Bush, K., & Hlasta, D. J. (2000). The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(19), 2179-2182.
217. Brem, J., Van Berkel, S. S., Aik, W., Rydzik, A. M., Avison, M. B., Pettinati, I., Umland, K. D., Kawamura, A., Spencer, J., Claridge, T. D. W., McDonough, M. A., & Schofield, C. J. (2014). Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- $\beta$ -lactamase inhibition. *Nature chemistry*, 6(12), 1084-1090.
218. Suree, N., Yi, S. W., Thieu, W., Marohn, M., Damoiseaux, R., Chan, A., Jung, M. E., & Clubb, R. T. (2009). Discovery and structure–activity relationship analysis of *Staphylococcus aureus* sortase A inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(20), 7174-7185.
219. Maresso, A. W., & Schneewind, O. (2008). Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacological reviews*, 60(1), 128-141.
220. Howard, M. H., Cenizal, T., Gutteridge, S., Hanna, W. S., Tao, Y., Totrov, M., Wittenbach, W. A., & Zheng, Y. J. (2004). A novel class of inhibitors of peptide



deformylase discovered through high-throughput screening and virtual ligand screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6669-6672.

221. Ammar, Y. A., Abd El-Hafez, S. M., Hessein, S. A., Ali, A. M., Askar, A. A., & Ragab, A. (2021). One-pot strategy for thiazole tethered 7-ethoxy quinoline hybrids: Synthesis and potential antimicrobial agents as dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitors with molecular docking study. *Journal of Molecular Structure*, 1242, 130748.

222. Alzahrani, A. Y., Ammar, Y. A., Abu-Elghait, M., Salem, M. A., Assiri, M. A., Ali, T. E., & Ragab, A. (2022). Development of novel indolin-2-one derivative incorporating thiazole moiety as DHFR and quorum sensing inhibitors: Synthesis, antimicrobial, and antibiofilm activities with molecular modelling study. *Bioorganic Chemistry*, 119, 105571.

223. Hawser, S., Lociuro, S., & Islam, K. (2006). Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochemical pharmacology*, 71(7), 941-948.

224. Ammar, Y. A., Farag, A. A., Ali, A. M., Hessein, S. A., Askar, A. A., Fayed, E. A., Elsisy, D. M., & Ragab, A. (2020). Antimicrobial evaluation of thiadiazino and thiazolo quinoxaline hybrids as potential DNA gyrase inhibitors; design, synthesis, characterization and morphological studies. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103841.

225. Geist, J. G., Lauw, S., Illarionova, V., Illarionov, B., Fischer, M., Gräwert, T., Rohdich, F., Eisenreich, W., Kaiser, J., Groll, M., Scheurer, C., Wittlin, S., Alonso-Gómez, J. L., Schweizer, W. B., Bacher, A., & Diederich, F. (2010). Thiazolopyrimidine inhibitors of 2-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem*, 5(7), 1092-1101.

226. Masini, T., Kroezen, B. S., & Hirsch, A. K. (2013). Druggability of the enzymes of the non-mevalonate-pathway. *Drug Discovery Today*, 18(23-24), 1256-1262.

227. Wang, X., & Dowd, C. S. (2018). The methylerythritol phosphate pathway: promising drug targets in the fight against tuberculosis. *ACS infectious diseases*, 4(3), 278-290.
228. Sheldrick, G. M. (2015). SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, 71(1), 3-8.
229. Sheldrick, G. M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 71(1), 3-8.
230. Farrugia, L. J. (2012). WinGX and ORTEP for Windows: an update. *Journal of Applied Crystallography*, 45(4), 849-854.
231. Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A., & Puschmann, H. (2009). OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of applied crystallography*, 42(2), 339-341.
232. Spek, A. L. (2009). Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 65(2), 148-155.
233. Boyd, M. R. (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, 1985–1995. *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*, 23-42.
234. Boyd, M. R., & Paull, K. D. (1995). Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug development research*, 34(2), 91-109.
235. Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 813-823.
236. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., & Boyd, M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766.
237. Finiuk, N., Kryshchysyn-Dylevych, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Manko, N., Ivasechko, I., & Lesyk, R. (2022). Novel

hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 238, 114422.

238. Finiuk, N. S., Ivasechko, I. I., Klyuchivska, O. Y., Ostapiuk, Y. V., Hreniukh, V. P., Shalai, Y. R., Babsky, A. M., Ostapiuk, Y. V., Matychuk, V. S., & Stoika, R. S. (2019). Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 91(2), 29-39.

239. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

240. Minta, M., Radko, L., Stypuła-Trębas, S., & Żmudzki, J. (2014). Cytotoxic effects of the synthetic oestrogens and androgens on Balb/c 3T3 and HepG2 cells. *Journal of Veterinary Research*, 58(4), 613-620.

241. Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119-124.

242. Radko, L., Minta, M., & Stypuła-Trębas, S. (2016). Differential toxicities of albendazole and its two main metabolites to Balb/c 3T3, HepG2, and FaO lines and rat hepatocytes. *Journal of Veterinary Research*, 60(4), 495-500.

243. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

244. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.

245. Elsayed, S. A., Saad, E. A., & Mostafa, S. I. (2019). Development of new potential anticancer metal complexes derived from 2-hydrazinobenzothiazole. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(11), 913-922.

246. Garas, A., Webb, E., Pillay, V., MacPhee, D., Denny, W., Zeller, H., & Cotton, R. (2009). A novel and simple method of screening compounds for interaction with DNA: A validation study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 678(1), 20-29.

247. Zhao, J., Li, W., Ma, R., Chen, S., Ren, S., & Jiang, T. (2013). Design, synthesis and DNA interaction study of new potential DNA bis-intercalators based on glucuronic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 16851-16865.
248. Herrmann, M., Lorenz, H. M., Voll, R. E. A., Grünke, M., Woith, W., & Kalden, J. R. (1994). A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic acids research*, *22*(24), 5506.
249. Finiuk, N., Klyuchivska, O., Ivasechko, I., Hreniukh, V., Ostapiuk, Y., Shalai, Y., Panchuk, R., Matiychuk, V., Obushak, M., Stoika, R., & Babsky, A. (2019). Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anti-Cancer Drugs*, *30*(1), 27-37.
250. Borkova, L., Gurska, S., Dzubak, P., Burianova, R., Hajduch, M., Sarek, J., Popa, I., & Urban, M. (2016). Lupane and 18 $\alpha$ -oleanane derivatives substituted in the position 2, their cytotoxicity and influence on cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *121*, 120-131.
251. Rehulka, J., Subtelna, I., Kryshchychyn-Dylevych, A., Cherniienko, A., Ivanova, A., Matveieva, M., Polishchuk, P., Gurska, S., Hajduch, M., Zagrijtschuk, O., Dzubak, P., & Lesyk, R. (2022). Anticancer 5-arylidene-2-(4-hydroxyphenyl)aminothiazol-4(5H)-ones as tubulin inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, *355*(12), 2200419.
252. Radomska, D., Czarnomysy, R., Szymanowska, A., Radomski, D., Domínguez-Álvarez, E., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2022). Novel Selenoesters as a Potential Tool in Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Cancers*, *14*(17), 4304.
253. Ivasechko, I., Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khylyuk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, *27*(19), 6219.
254. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

255. Chen, L., Xu, S., Liu, L., Wen, X., Xu, Y., Chen, J., & Teng, J. (2014). Cab45S inhibits the ER stress-induced IRE1-JNK pathway and apoptosis via GRP78/BiP. *Cell Death & Disease*, 5(5), e1219-e1219.
256. АНТОНЮК, В. О. (2005). *Лектини та їх сировинні джерела*. Львів: Кварт.
257. Khomutovsky, O. A., Lutsik, M. D., & Perederei, O. F. (1986). *Electron histochemistry of cell membrane receptors*. Kyiv: Naukova dumka.
258. Hayat, M. A. (2012). *Colloidal gold: principles, methods, and applications*. Elsevier.
259. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
260. Bastos, I. M., Motta, F. N., Charneau, S., Santana, J. M., Dubost, L., Augustyns, K., & Grellier, P. (2010). Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes and Infection*, 12(6), 457-466.
261. Lethu, S., Bosc, D., Mouray, E., Grellier, P., & Dubois, J. (2013). New protein farnesyltransferase inhibitors in the 3-arylthiophene 2-carboxylic acid series: diversification of the aryl moiety by solid-phase synthesis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(1), 163-171.
262. Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), 544-547.
263. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
264. Hock, F. J. (Ed.). (2016). *Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays* (Vol. 4314). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.

265. Paronikyan, R. G., Avagyan, M. N., Harutyunyan, A. A., Avakyan, G. G., Litvinova, S. A., Voronina, T. A. (2019). Experimental study of the anticonvulsant and psychotropic properties of pufemid, piratidine and N3212 in comparison with known antiepileptic drugs. *Epilepsy Paroxysmal Conditions*, 11, 244-254.
266. Mishchenko, M., Shtrygol, S., Kaminsky, D., & Lesyk, R. (2020). Thiazole-bearing 4-thiazolidinones as new anticonvulsant agents. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), 16.
267. Bernalov, A., Michel, M. C., & Steckler, T. (2020). *Good research practice in non-clinical pharmacology and biomedicine* (p. 423). Springer Nature.
268. Geyer, M. A., & Markou, A. (2002). *The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs* (Vol. 30, pp. 445-455). Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
269. Xu, N., Huggon, B., & Saunders, K. E. (2020). Cognitive impairment in patients with bipolar disorder: impact of pharmacological treatment. *CNS drugs*, 34(1), 29-46.
270. Подольський, І. М., Штриголь, С. Ю., & Гриценко, І. С. (2013). Вплив перспективного антидепресанта з ноотропними властивостями 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону на фази пам'яті. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*, (8, № 4), 104-107.
271. Szopa, A., Poleszak, E., Wyska, E., Serefko, A., Wośko, S., Wlaź, A., Pieróg M., Wróbel, A., & Wlaź, P. (2016). Caffeine enhances the antidepressant-like activity of common antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389, 211-221.
272. Бондарев, Є. В. Холодова травма: доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями. *Методичні рекомендації. Харків.–2018.–35с.*
273. Misra, S., Ghatak, S., Patil, N., Dandawate, P., Ambike, V., Adsule, S., Unni, D., Swamy, K. V., & Padhye, S. (2013). Novel dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors targeting hyaluronan-CD44v6 pathway and inducing

cytotoxicity in colon cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(9), 2551-2559.

274. Капелька, І. Г., Штриголь, С. Ю., & Штрыголь, С. Ю. (2019). Скринінгове дослідження фригопротекторних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 13(5), 338-343.

275. Бондарев, Є. В., & Штриголь, С. Ю. (2017). Вплив препаратів глюкозаміну та ацетилсаліцилової кислоти на артеріальний тиск і показники ЕКГ за умов експериментальної холодової травми. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, (6), 31-36.

276. Бондарев, Є. В. (2012). Дослідження глюкозаміну гідрохлориду як засобу фригопротекторної дії при поєднаній алкогольно-холодовій травмі. *Фармацевтичний часопис*, (3), 140-142.

277. Lino, R. C., da Silva, D. P. B., Florentino, I. F., da Silva, D. M., Martins, J. L. R., da Costa Batista, D., de Siqueira Leite, K. C., Villavicencio, B., Vasconcelos, G. A., Silva, A. L. P., de Ávila, R. I., Verli, H., Valadares, M. C., de Souza Gil, E., Vaz, B. G., Lião, L. M., Menegatti, R., & Costa, E. A. (2017). Pharmacological evaluation and molecular docking of new di-tert-butylphenol compound, LQFM-091, a new dual 5-LOX/COX inhibitor. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 231-243.

278. Che, X. H., Chen, C. L., Ye, X. L., Weng, G. B., Guo, X. Z., Yu, W. Y., Tao, J., Chen, Y.C., & Chen, X. (2016). Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. *Oncology reports*, 35(3), 1680-1688.

279. Florentino, I. F., Silva, D. P., Silva, D. M., Cardoso, C. S., Moreira, A. L., Borges, C. L., de A. Soares, C. M., Galdino, P., M., Lião, L. M., Ghedini, P. C., Menegatti, R., & Costa, E. A. (2017). Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 69, 35-44.

280. Food and Drug Administration. (2005). Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, 7(0.001).
281. Institute of Laboratory Animal Resources (US). Committee on Care, & Use of Laboratory Animals. (1986). *Guide for the care and use of laboratory animals* (No. 86). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
282. Suckow, M. A., Stevens, K. A., & Wilson, R. P. (Eds.). (2012). *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Academic Press.
283. Fischbach, F. T., & Dunning, M. B. (2009). *A manual of laboratory and diagnostic tests*. Lippincott Williams & Wilkins.
284. Грушка, О. І., Туркіна, В. А., & Кузьмінов, Б. П. (2019). Імуномодельююча активність вісмуту цитрату в експерименті. *Клінічна та профілактична медицина*, (3-4), 134-139.
285. Keohane, E., Otto, C. N., & Walenga, J. (2019). *Rodak's hematology-e-book: clinical principles and applications*. Elsevier Health Sciences.
286. Pagana, K. D., Pagana, T. J., & Pagana, T. N. (2021). *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
287. Clemons, D. J., & Seeman, J. L. (2018). *The laboratory guinea pig* (p. 177). Taylor & Francis.
288. Romanyshyn, Y. M., Temnyk, I. V., & Lapovets, L. I. (1999). Metodichni rekomendatsii dlia otsinky imunnoho statusu liudyny: vyznachennia pokaznykiv klitynnoho imunitetu: metod. *Rekomendatsii. Lviv (in Ukrainian)*.
289. Трахтенберг, І. М., Дмитруха, Н. М., Моложава, О. С., & Миронюк, Ю. М. (2013). Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення. *Інфекційні хвороби*, 4, 82-89.
290. Paull, K. D., Shoemaker, R. H., Hodes, L., Monks, A., Scudiero, D. A., Rubinstein, L., Plowman, J., & Boyd, M. R. (1989). Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean



graph and COMPARE algorithm. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 81(14), 1088-1092.

291. Paull, K. D., Lin, C. M., Malspeis, L., & Hamel, E. (1992). Identification of novel antimetabolic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. *Cancer research*, 52(14), 3892-3900.

292. Zaharevitz, D. W., Holbeck, S. L., Bowerman, C., & Svetlik, P. A. (2002). COMPARE: a web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 20(4), 297-303.

293. SwissADME [Swiss Institute of Bioinformatics web service]. (2021). Retrieved from <http://www.swissadme.ch/index.php>.

294. MOE, 2007.09 [Molecular Operating Environment software]. (2007). Retrieved from <http://www.chemcomp.com>.

295. Lukevits, E. (1995). Pyridine derivatives in the drug arsenal (150 years of pyridine chemistry). *Chemistry of heterocyclic compounds*, 31(6), 639-650.

296. LS Kishbaugh, T. (2016). Pyridines and Imidazopyridines with medicinal significance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(28), 3274-3302.

297. Damani, L. A., Crooks, P. A., Shaker, M. S., Caldwell, J., D'souza, J., & Smith, R. L. (1982). Species differences in the metabolic C- and N-oxidation, and N-methylation of [ $^{14}\text{C}$ ] pyridine *in vivo*. *Xenobiotica*, 12(8), 527-534.

298. Carlson, G. P. (1996). Comparison of the effects of pyridine and its metabolites on rat liver and kidney. *Toxicology letters*, 85(3), 173-178.

299. Cronin, M. T. D., Dearden, J. C., Duffy, J. C., Edwards, R., Manga, N., Worth, A. P., & Worgan, A. D. P. (2002). The importance of hydrophobicity and electrophilicity descriptors in mechanistically-based QSARs for toxicological endpoints. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 13(1), 167-176.

300. Salem, M. S., & Ali, M. A. M. (2016). Novel pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives: synthesis, characterization, antimicrobial and antiproliferative profile. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(4), 473-483.

301. Al-Tel, T. H., Al-Qawasmeh, R. A., & Zaarour, R. (2011). Design, synthesis and *in vitro* antimicrobial evaluation of novel Imidazo[1,2-*a*]pyridine and

imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazole motifs. *European journal of medicinal chemistry*, 46(5), 1874-1881.

302. Arabshahi, H. J., Van Rensburg, M., Pilkington, L. I., Jeon, C. Y., Song, M., Gridel, L. M., Leung, E., Barker, D., Vuica-Ross, M., Volcho, K. P., Zakharenko, A. L., Lavrik, O. I., & Reynisson, J. (2015). A synthesis, *in silico*, *in vitro* and *in vivo* study of thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer analogues. *MedChemComm*, 6(11), 1987-1997.

303. Eissa, I. H., El-Naggar, A. M., & El-Hashash, M. A. (2016). Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorganic chemistry*, 67, 43-56.

304. Dias, L. R., Santos, M. B., de Albuquerque, S., Castro, H. C., de Souza, A. M., Freitas, A. C., DiVaio, M. A. V., Cabral, L. M., & Rodrigues, C. R. (2007). Synthesis, *in vitro* evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine series. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(1), 211-219.

305. Shi, F., Li, C., Xia, M., Miao, K., Zhao, Y., Tu, S., Zheng, W., Zhang, G., & Ma, N. (2009). Green chemoselective synthesis of thiazolo[3,2-*a*]pyridine derivatives and evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(19), 5565-5568.

306. Al-Omar, M. A., Youssef, K. M., El-Sherbeny, M. A., Awadalla, S. A. A., & El-Subbagh, H. I. (2005). Synthesis and *in vitro* antioxidant activity of some new fused pyridine analogs. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 338(4), 175-180.

307. Abdelgawad, M. A., Bakr, R. B., & Azouz, A. A. (2018). Novel pyrimidine-pyridine hybrids: synthesis, cyclooxygenase inhibition, anti-inflammatory activity and ulcerogenic liability. *Bioorganic Chemistry*, 77, 339-348.

308. Chung, S. T., Huang, W. H., Huang, C. K., Liu, F. C., Huang, R. Y., Wu, C. C., & Lee, A. R. (2016). Synthesis and anti-inflammatory activities of 4*H*-chromene and chromeno[2,3-*b*]pyridine derivatives. *Research on Chemical Intermediates*, 42, 1195-1215.

309. Witherington, J., Bordas, V., Garland, S. L., Hickey, D. M., Ife, R. J., Liddle, J., Saunders, M., Smith, D. G., & Ward, R. W. (2003). 5-Aryl-pyrazolo[3,4-*b*]pyridines: potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *13*(9), 1577-1580.
310. Chioua, M., Samadi, A., Soriano, E., Lozach, O., Meijer, L., & Marco-Contelles, J. (2009). Synthesis and biological evaluation of 3,6-diamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives as protein kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *19*(16), 4566-4569.
311. Othman, I. M., Gad-Elkareem, M. A., Snoussi, M., Aouadi, K., & Kadri, A. (2020). Novel fused pyridine derivatives containing pyrimidine moiety as prospective tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: Design, synthesis, pharmacokinetics and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, *1219*, 128651.
312. Sun, Q. Z., Lin, G. F., Li, L. L., Jin, X. T., Huang, L. Y., Zhang, G., Yang, W., Chen, K., Xiang, R., Chen, C., Wei, Y. Q., Lu, G. W., & Yang, S. Y. (2017). Discovery of potent and selective inhibitors of cdc2-like kinase 1 (clk1) as a new class of autophagy inducers. *Journal of medicinal chemistry*, *60*(14), 6337-6352.
313. Fujita, M., Seki, T., & Ikeda, N. (2002). Synthesis and bioactivities of novel bicyclic thiophenes and 4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridines as inhibitors of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *12*(15), 1897-1900.
314. Das, D., Sikdar, P., & Bairagi, M. (2016). Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *109*, 89-98.
315. Bondock, S., Albormani, O., Fouda, A. M., & Abu Safieh, K. A. (2016). Progress in the chemistry of 5-acetylthiazoles. *Synthetic Communications*, *46*(13), 1081-1117.
316. Chebanov, V. A., Saraev, V. E., Desenko, S. M., Chernenko, V. N., Knyazeva, I. V., Groth, U., Glasnov, T. N., & Kappe, C. O. (2008). Tuning of chemo- and regioselectivities in multicomponent condensations of 5-aminopyrazoles, dimedone, and aldehydes. *The Journal of Organic Chemistry*, *73*(13), 5110-5118.

317. Chebanov, V. A., Sakhno, Y. I., Desenko, S. M., Chernenko, V. N., Musatov, V. I., Shishkina, S. V., Shishkin, O. V., & Kappe, C. O. (2007). Cyclocondensation reactions of 5-aminopyrazoles, pyruvic acids and aldehydes. Multicomponent approaches to pyrazolopyridines and related products. *Tetrahedron*, 63(5), 1229-1242.
318. Chebanov, V. A., & Desenko, S. M. (2006). Dihydroazines based on alpha, beta-unsaturated ketones reactions. *Current Organic Chemistry*, 10(3), 297.
319. Десенко, С. М., & Орлов, В. Д. (1998). Азагетероциклы на основе ароматических непредельных кетонов. Харьков: Фолио, 148, 3.
320. Чебанов, В. А., & Десенко, С. М. (2012). Многокомпонентные реакции гетероциклизации с управляемой селективностью. *Химия гетероциклических соединений*, (4), 607-625.
321. Lozynskiy, A., Zimenkovsky, B., Nektgayev, I., & Lesyk, R. (2015). Arylidene pyruvic acids motif in the synthesis of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles as potential biologically active compounds. *Heterocyclic communications*, 21(1), 55-59.
322. Lozynskiy, A., Zimenkovsky, B., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2015). Arylidene pyruvic acids motif in the synthesis of new 2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles via tandem hetero-Diels–Alder-hemiacetal reaction. *Synthetic Communications*, 45(19), 2266-2270.
323. Khodarahmi, G., Asadi, P., Farrokhpour, H., Hassanzadeh, F., & Dinari, M. (2015). Design of novel potential aromatase inhibitors via hybrid pharmacophore approach: docking improvement using the QM/MM method. *RSC advances*, 5(71), 58055-58064.
324. Chaban, T. I., Ogurtsov, V. V., Chaban, I. G., Klenina, O. V., & Komarytsia, J. D. (2013). Synthesis and antioxidant activity evaluation of novel 5,7-dimethyl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridines. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 188(11), 1611-1620.
325. Chaban, T. I., Ogurtsov, V. V., Matyichuk, V. S., Chaban, I. G., Demchuk, I. L., & Nektgayev, I. A. (2019). Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant

activities of novel 3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridines. *Acta Chimica Slovenica*, 66(1), 103-111.

326. El-Gaby, M. S. A., Al-Sehemi, A. G., Mohamed, Y. A., & Ammar, Y. A. (2006). Recent trends in chemistry of thiazolopyridines. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 181(3), 631-674.

327. Chaban, T. I., Panchuk, R. R., Klenina, O. V., Skorokhyd, N. R., Ogurtsov, V. V., & Chaban, I. G. (2012). Synthesis and evaluation of antitumor activity of some thiazolo[4,5-*b*]pyridines. *Biopolymers and Cell*, 28(5), 389-396..

328. Hegde, S. G., & Mahoney, M. D. (1993). Synthesis and herbicidal activity of 5-(haloalkyl)-substituted thiazolo[4,5-*b*]pyridine-3(2*H*)-acetic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2131-2134.

329. Lin, R., Johnson, S. G., Connolly, P. J., Wetter, S. K., Binnun, E., Hughes, T. V., Murray, W. V., Pandey, N. B., Moreno-Mazza, S. J., Adams, M., Fuentes-Pesquera, A. R., & Middleton, S. A. (2009). Synthesis and evaluation of 2,7-diamino-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine analogues as anti-tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(8), 2333-2337.

330. Kulkarni, S. S., & Newman, A. H. (2007). Discovery of heterobicyclic templates for novel metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(11), 2987-2991.

331. Singh, B., Bacon, E. R., Leshner, G. Y., Robinson, S., Pennock, P. O., Bode, D. C., Pagani, E. D., Bentley, R. J., Connell, M. J., Hamel, L. T., & Silver, P. J. (1995). Novel and potent adenosine 3', 5'-cyclic phosphate phosphodiesterase III inhibitors: thiazolo[4,5-*b*][1,6]naphthyridin-2-ones. *Journal of medicinal chemistry*, 38(14), 2546-2550.

332. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., Radko, L., Stypula-Trebas, S., Roman, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2018). Synthesis and cytotoxicity of new thiazolo [4,5-*b*]pyridine-2(3*H*)-one derivatives based on  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones and  $\alpha$ -ketoacids. *Chemical Papers*, 72, 669-681.

333. Lozynskiy, A., Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2015, 9-13 November). Synthesis of New Thiazolo[4,5-*b*]pyridines Based on Arylidene Pyruvic Acids and Chalcones via Reaction of [3+3]-Cyclocondensation. *VII International Conference Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles*, Kharkov, P-5.
334. Лозинський, А. В., & Лесик, Р.Б. (2017, 28-31 травня) Синтез нових похідних на основі тiazоло[4,5-*b*]піридину як потенційних біологічно активних сполук. *XVI наукова конференція «Львівські хімічні читання-2017»*, Львів, У31.
335. Komaritsa, I. D. (1968). Studies on azolidones and their derivatives: I. Preparation and properties of 4-iminothiazolid-2-one. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 4(3), 324-325.
336. Lozynskiy, A., Konechniy, Y., Senkiv, J., Yushyn, I., Khylyuk, D., Karpenko, O., Shepeta, Y., & Lesyk, R. (2021). Synthesis and Biological Activity Evaluation of Novel 5-Methyl-7-phenyl-3*H*-thiazolo[4,5-*b*]pyridin-2-ones. *Scientia Pharmaceutica*, 89(4), 52.
337. Skrobiszewski, A., Ogórek, R., Płaskowska, E., & Gładkowski, W. (2013). Pleurotus ostreatus as a source of enoate reductase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(1), 26-31.
338. Shiri, M., Heravi, M. M., & Soleymanifard, B. (2012). Arylidene pyruvic acids (APAs) in the synthesis of organic compounds. *Tetrahedron*, 68(33), 6593-6650.
339. Lozynskiy, A., Zimenkovsky, B., Ivasechko, I., Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., Stoika, R., & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2,3-dihydrothiazolo[4,5-*b*]pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157.
340. Лозинський, А. В., Матійків, О.В., & Лесик, Р.Б.(2016, 08 квітня). Синтез амідів тiazоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонових кислот як потенційних біологічно активних сполук. *XXXIII Всеукраїнська науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів «Ліки-людині»*, Харків, 119.
341. Lozynskiy, A., Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2016, 7-10 April). Selected concepts and investigations among thiazolo[4,5-*b*]pyridines as perspective

anticancer and anti-inflammatory agents. *Bridges in Life Sciences 11<sup>th</sup> Annual Scientific Conference*, Prague, 76.

342. Lozynskyi, A. V., Sementsiv, G. M., & Lesyk, R. (2016, 19-22 September). Synthesis and anticancer activity of novel thiazolo[4,5-*b*]pyridine-carboxylic acid amides. *IX International meeting «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies»*, Lviv, 311.

343. Lozynskyi, A. V., Derkach, H. O., Zasidko, V. V., Konechnyi, Y. T., Finiuk, N. S., Len, Y. T., Kutsyk, R.V., Regeda, M. S., & Lesyk, R. B. (2021). Antimicrobial and cytotoxic activities of thiazolo[4,5-*b*]pyridine derivatives. *Biopolymers & Cell*, 37(2), 153.

344. Лозинський, А. В., Лесик, Р. Б., Куцик Р. В., Засідко, В. В., Деркач, Г.О. (2016). 4-Хлорофеніламід 7-(4-хлорофеніл)-2-оксо-2,3-дегідро-тіазоло[4,5-*b*]піридин-5-карбонової кислоти, що проявляє протимікробну дію. (Патент № 108770). Укрпатент.

345. Kim, E., Lee, S. H., Lee, S. J., Kwon, O. P., & Yoon, H. (2017). New antibacterial-core structures based on styryl quinolinium. *Food science and biotechnology*, 26, 521-529.

346. Patel, H. M., Bhardwaj, V., Sharma, P., Noolvi, M. N., Lohan, S., Bansal, S., & Sharma, A. (2019). Quinoxaline-PABA bipartite hybrid derivatization approach: Design and search for antimicrobial agents. *Journal of Molecular Structure*, 1184, 562-568.

347. Hadda, T. B., Srivastava, S., Das, B., Salgado-Zamora, H., Shaheen, U., Bader, A., & Naseer, M. M. (2014). POM analyses of antimicrobial activity of some 2,3-armed 4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophenes: Favourable and unfavourable physico-chemical parameters in design of antibacterial and mycolytic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 995-1003.

348. Hafez, H. N., Alsalamah, S. A., & El-Gazzar, A. R. (2017). Synthesis of thiophene and N-substituted thieno[3,2-*d*]pyrimidine derivatives as potent antitumor and antibacterial agents. *Acta Pharmaceutica*, 67(3), 275-292.

349. Abdel Reheim, M. A., & Baker, S. M. (2017). Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel fused pyrazolo[3,4-*c*]pyridazine, pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine, thieno[3,2-*c*]pyrazole and pyrazolo[3',4':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. *Chemistry Central Journal*, *11*, 1-14.
350. Zidar, N., Tomašić, T., Šink, R., Kovač, A., Patin, D., Blanot, D., Contreras-Martel, C., Dessen, A., Premru, M. M., Zega, A., Gobec, S., Mašič, L. P., & Kikelj, D. (2011). New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, *46*(11), 5512-5523.
351. Bax, B. D., Chan, P. F., Eggleston, D. S., Fosberry, A., Gentry, D. R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M. M., Hennessy, A., Hibbs, M., Huang, J., Jones, E., Jones, J., Brown, K. K., Lewis, C. J., May, E. W., Saunders, M. R., Singh, O., Spitzfaden, C. F., Shen, C., Shillings, A., Theobald, A. J., Wohlkonig, A., Pearson, N. D., & Gwynn, M. N. (2010). Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*, *466*(7309), 935-940.
352. Tomašić, T., Zidar, N., Rupnik, V., Kovač, A., Blanot, D., Gobec, S., Kikelj, D., & Mašič, L. P. (2009). Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid-based inhibitors of MurD ligase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*(1), 153-157.
353. Tomasic, T., Katsamakos, S., Hodnik, Z., Ilaš, J., Brvar, M., Solmajer, T., Montalvão, S., Tammela, P., Banjanac, M., Ergović, G., Anderluh, M., Mašič, L. P., & Kikelj, D. (2015). Discovery of 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP-binding site. *Journal of medicinal chemistry*, *58*(14), 5501-5521.
354. Лозинський, А. В., Матійків, О.В., Семенців, Г. М., Грельє, Ф., & Лесик, Р.Б.(2017, 30-31 березня). Вивчення протитрипаносомної активності серед похідних тiazоло[4,5-*b*]піридину. *I Міжнародна науково-практична конференція «Ліки-людині»*, Харків, 201.



355. Tripathi, A. C., Gupta, S. J., Fatima, G. N., Sonar, P. K., Verma, A., & Saraf, S. K. (2014). 4-Thiazolidinones: the advances continue.... *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 52-77.
356. Spassova, M., & Enchev, V. (2004). Ab initio investigation of the structure and nonlinear optical properties of five-membered heterocycles containing sulfur. *Chemical Physics*, 298(1-3), 29-36.
357. Tejchman, W., Michalski, M., Zborowski, K. K., & Berski, S. (2019). Why are rhodanines less efficient reagents in Diels–Alder reactions than isorhodanines? A quantum chemical study. *Journal of Molecular Modeling*, 25, 1-11.
358. Michalski, M., & Berski, S. (2023). Exploring the Relationship between Reactivity and Electronic Structure in Isorhodanine Derivatives Using Computer Simulations. *Molecules*, 28(5), 2360.
359. Enchev, V., Chorbadjiev, S., & Jordanov, B. (2002). Comparative study of the structure of rhodanine, isorhodanine, thiazolidine-2,4-dione, and thiorhodanine. *Chemistry of heterocyclic compounds*, 38, 1110-1120.
360. Metwally, N. H., Badawy, M. A., & Okpy, D. S. (2015). Synthesis and anticancer activity of some new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles incorporating pyrazole moiety. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(7), 495-503.
361. Metwally, N. H. (2007). Synthesis of some new fused thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles and their derivatives. *Journal of Sulfur Chemistry*, 28(3), 275-284.
362. Лозинський, А. В. (2015). Синтез та біологічна активність поліфункціональних похідних на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазольної гетероциклічної системи [Дисертація кандидата фармацевтичних наук, ЛНМУ імені Данила Галицького].
363. Zelisko, N., Atamanyuk, D., Ostapiuk, Y., Bryhas, A., Matyichuk, V., Gzella, A., & Lesyk, R. (2015). Synthesis of fused thiopyrano[2,3-*d*][1,3]thiazoles via hetero-Diels-Alder reaction related tandem and domino processes. *Tetrahedron*, 71(50), 9501-9508.
364. Zelisko, N., Atamanyuk, D., Vasylenko, O., Bryhas, A., Matyichuk, V., Gzella, A., & Lesyk, R. (2014). Crotonic, cinnamic, and propiolic acids motifs in the

synthesis of thiopyrano[2,3-*d*][1,3]thiazoles via hetero-Diels-Alder reaction and related tandem processes. *Tetrahedron*, 70(3), 720-729.

365. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2014). Synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles based on cinnamic acid amides. *Scientia pharmaceutica*, 82(4), 723-734.

366. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., Karkhut, A., Polovkovych, S., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2016). Application of the 2(5*H*)furanone motif in the synthesis of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles via the hetero-Diels-Alder reaction and related tandem processes. *Tetrahedron Letters*, 57(30), 3318-3321.

367. Atamanyuk, D., Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2008). Synthesis and anticancer activity of novel thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-based compounds containing norbornane moiety. *Journal of Sulfur Chemistry*, 29(2), 151-162.

368. Matyichuk, V. S., Lesyk, R. B., Obushak, M. D., Gzella, A., Atamanyuk, D. V., Ostapiuk, Y. V., & Kryshchyshyn, A. P. (2008). A new domino-Knoevenagel-hetero-Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 49(31), 4648-4651.

369. Bryhas, A. O., Horak, Y. I., Ostapiuk, Y. V., Obushak, M. D., & Matyichuk, V. S. (2011). A new three-step domino Knoevenagel-hetero-Diels-Alder oxidation reaction. *Tetrahedron Letters*, 52(18), 2324-2326.

370. Bryhas, A. O., Matyichuk, V. S., Lis, T., Kinzhybalo, V., Smalius, V. V., & Obushak, M. D. (2013). A four-step domino Knoevenagel-hetero-Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 54(42), 5667-5670.

371. Abd Allah, S. O., Ead, H. A., Kassab, N. A., & Metwali, N. H. (1983). Activated nitriles in heterocyclic synthesis: novel synthesis of thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles. *Chemischer Informationsdienst*, 14(38), 637-639.

372. Abdelrazek, F. M., Kandeel, Z. E. S., Himly, K. M. H., & Elnagdi, M. H. (1985). Substituted acrylonitriles in heterocyclic synthesis. The reaction of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -(2-furyl)-acrylonitriles with some active-methylene heterocycles. *Synthesis (Stuttgart)*, (4), 432-434.

373. Wu, S., Li, Y., Zhang, Y., Fang, K., Dong, G., Liu, N., Miao, Z., Yao, J., Wang, W., Zhang, W., & Sheng, C. (2016). Enantioselective organocatalytic Michael

addition of isorhodanines to  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(16), 3926-3933.

374. Zhang, Y., Wang, S., Wu, S., Zhu, S., Dong, G., Miao, Z., Yao, J., Zhang, W., Sheng, C., & Wang, W. (2013). Facile construction of structurally diverse thiazolidinedione-derived compounds via divergent stereoselective cascade organocatalysis and their biological exploratory studies. *ACS Combinatorial Science*, 15(6), 298-308.

375. Kaminsky, D., Subtel'na, I., Pyrih, A., Shtoyko, D., Susel, A., Gzella, A., & Lesyk, R. (2017). One-Pot Synthesis of 5-Ene-4-aminothiazol-2(5H)-ones and Chromeno[2,3-d]thiazol-2-ones. *Synlett*, 28(07), 811-814.

376. Li, Q., Wu, J., Zheng, H., Liu, K., Guo, T. L., Liu, Y., Eblen, S. T., Grant, S., & Zhang, S. (2010). Discovery of 3-(2-aminoethyl)-5-(3-phenyl-propylidene)-thiazolidine-2, 4-dione as a dual inhibitor of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt signaling pathways. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(15), 4526-4530.

377. Liu, K., Rao, W., Parikh, H., Li, Q., Guo, T. L., Grant, S., Kellogg, G. E., & Zhang, S. (2012). 3,5-Disubstituted-thiazolidine-2,4-dione analogs as anticancer agents: design, synthesis and biological characterization. *European journal of medicinal chemistry*, 47, 125-137.

378. Keihanfar, M., & Mirjalili, B. B. F. (2022). Catalyst-free synthesis of tetrahydrodipyrzolo-pyridines via an one-pot tandem and green pseudo-six-component reaction in water. *BMC chemistry*, 16(1), 1-6.

379. Lozynskyi, A., Karkhut, A., Polovkovych, S., Karpenko, O., Holota, S., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2022). 3-Phenylpropanal and citral in the multicomponent synthesis of novel thiopyrano[2,3-d]thiazoles. *Results in Chemistry*, 4, 100464.

380. Koviell, M. (2016). *Investigation of the structure of 2-amino(imino)-1,3-thiazolidin-4-one derivatives with potential pharmacological activity and new software tools for the analysis of the crystal structure of the bioorganic materials* [Doctoral thesis, Poznan University of Medical Sciences].

381. Allen, F. H., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor R. (2006). Typical interatomic distances: organic compounds. *International Tables for Crystallography. C*, 9.5, 790-811.
382. Cremer, D. T., & Pople, J. A. (1975). General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, 97(6), 1354-1358.
383. Lozynskyy, A., Zimenkovsky, B., Yushyn, I., Kaminsky, D., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2020). Synthesis of new structurally diverse thiazolidinone-derived compounds based on reaction of isorhodanine with ortho-substituted aldehydes,  $\alpha$ -keto- and  $\beta$ -aroylacrylic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1217, 128448.
384. Kaminsky, D., Lozynskyy, A., & Lesyk, R. (2018, 12-16 November). Thiazolidinone-based one-pot synthesis of (thio)chromeno[2,3-*d*]-thiazol-2-ones and 5-ene-4-aminothiazol-2(5*H*)-ones. 8<sup>th</sup> International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles» in memoriam of Prof. Valeriy Orlov, Kharkiv, 94.
385. Lignier, P., Estager, J., Kardos, N., Gravouil, L., Gazza, J., Naffrechoux, E., & Draye, M. (2011). Swift and efficient sono-hydrolysis of nitriles to carboxylic acids under basic condition: role of the oxide anion radical in the hydrolysis mechanism. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(1), 28-31.
386. Rey, P., Rossi, J. C., Taillades, J., Gros, G., & Nore, O. (2004). Hydrolysis of nitriles using an immobilized nitrilase: applications to the synthesis of methionine hydroxy analogue derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8155-8162.
387. Lozynskyy, A., Yushyn, I., Shepeta, Y., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2022). Synthesis and structure elucidation of thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carbonitriles as adducts of Michael reaction. *Journal of Molecular Structure*, 1256, 132574.
388. Hook, I., Mills, C., & Sheridan, H. (2014). Bioactive naphthoquinones from higher plants. *Studies in natural products chemistry*, 41, 119-160.

389. Medic, A., Zamljen, T., Hudina, M., Solar, A., & Veberic, R. (2022). Seasonal variations of naphthoquinone contents (juglone and hydrojuglone glycosides) in *Juglans regia* L. *Scientia Horticulturae*, *300*, 111065.
390. Halder, M., Petsophonsakul, P., Akbulut, A. C., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2019). Vitamin K: double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *International journal of molecular sciences*, *20*(4), 896.
391. Thijssen, H. H., Vervoort, L. M., Schurgers, L. J., & Shearer, M. J. (2006). Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *British journal of nutrition*, *95*(2), 260-266.
392. Comley, J. C., & Sterling, A. M. (1995). Effect of atovaquone and atovaquone drug combinations on prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in SCID mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *39*(4), 806-811.
393. Bakshi, R. P., Tatham, L. M., Savage, A. C., Tripathi, A. K., Mlambo, G., Ippolito, M. M., Nenortas, E., Rannard, S. P., Owen, A., & Shapiro, T. A. (2018). Long-acting injectable atovaquone nanomedicines for malaria prophylaxis. *Nature communications*, *9*(1), 315.
394. Gopinath, P., Mahammed, A., Ohayon, S., Gross, Z., & Brik, A. (2016). Understanding and predicting the potency of ROS-based enzyme inhibitors, exemplified by naphthoquinones and ubiquitin specific protease-2. *Chemical Science*, *7*(12), 7079-7086.
395. Klaus, V., Hartmann, T., Gambini, J., Graf, P., Stahl, W., Hartwig, A., & Klotz, L. O. (2010). 1, 4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, *496*(2), 93-100.
396. Pereyra, C. E., Dantas, R. F., Ferreira, S. B., Gomes, L. P., & Silva-Jr, F. P. (2019). The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell International*, *19*(1), 1-20.

397. Tandon, V. K., & Kumar, S. (2013). Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(9), 1087-1108.
398. Kretschmer, N., Rinner, B., Deutsch, A. J., Lohberger, B., Knausz, H., Kunert, O., Blunder, M., Boechzelt, H., Schaidler, H., & Bauer, R. (2012). Naphthoquinones from *Onosma paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma Cells. *Journal of natural products*, 75(5), 865-869.
399. Kuete, V., Tangmouo, J. G., Meyer, J. M., & Lall, N. (2009). Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp. *International journal of antimicrobial agents*, 34(4), 322-325.
400. Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Rahamim, Y., Sionov, E., Segal, E., Carmeli, S., & Zilberstein, A. (2010). Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 911-922.
401. Tessele, P. B., Delle Monache, F., Quintão, N. L. M., da Silva, G. F., Rocha, L. W., Lucena, G. M., Ferreira, V. M. M., Prediger, R. D.S., & Cechinel Filho, V. (2011). A new naphthoquinone isolated from the bulbs of *Cipura paludosa* and pharmacological activity of two main constituents. *Planta medica*, 77(10), 1035-1043.
402. Milackova, I., Prnova, M. S., Majekova, M., Sotnikova, R., Stasko, M., Kovacikova, L., Banerjee, S., Veverka, M., & Stefek, M. (2015). 2-Chloro-1, 4-naphthoquinone derivative of quercetin as an inhibitor of aldose reductase and anti-inflammatory agent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(1), 107-113.
403. Onegi, B., Kraft, C., Köhler, I., Freund, M., Jenett-Siems, K., Siems, K., Beyer, G., Melzig, M. F., Bienzle, U., & Eich, E. (2002). Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*. *Phytochemistry*, 60(1), 39-44.

404. Fotie, J. (2006). Quinones and malaria. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 5(4), 357-366.
405. González, A., Becerra, N., Kashif, M., González, M., Cerecetto, H., Aguilera, E., Noguera-Torres, B., Chacón-Vargas, K. F., Zarate-Ramos, J. J., Castillo-Velázquez, U., Salas, C. O., Rivera, G., & Vázquez, K. (2020). In vitro and in silico evaluations of new aryloxy-1,4-naphthoquinones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Medicinal Chemistry Research*, 29, 665-674.
406. Pinto, A. V., & de Castro, S. L. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*, 14(11), 4570.
407. Lawrence, H. R., Kazi, A., Luo, Y., Kendig, R., Ge, Y., Jain, S., Daniel, K., Santiago, D., Guida, W. C., & Sebti, S. M. (2010). Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone analogs as a novel class of proteasome inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(15), 5576-5592.
408. Kar, S., Wang, M., Ham, S. W., & Carr, B. I. (2006). Fluorinated Cpd 5, a pure arylating K-vitamin derivative, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting Cdc25 and activating MAPK. *Biochemical pharmacology*, 72(10), 1217-1227.
409. Krishnan, P., & Bastow, K. F. (2000). Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—Eleutherin,  $\alpha$  lapachone, and  $\beta$  lapachone\*. *Biochemical pharmacology*, 60(9), 1367-1379.
410. Chae, G. H., Song, G. Y., Kim, Y., Cho, H., Sok, D. E., & Ahn, B. Z. (1999). 2- or 6-(1-azidoalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Synthesis, evaluation of cytotoxic activity; antitumor activity and inhibitory effect on DNA topoisomerase-I. *Archives of Pharmacal Research*, 22, 507-514.
411. Godoy-Castillo, C., Bravo-Acuña, N., Arriagada, G., Faunes, F., León, R., & Soto-Delgado, J. (2021). Identification of the naphthoquinone derivative inhibitors binding site in heat shock protein 90: an induced-fit docking, molecular dynamics and 3D-QSAR study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(16), 5977-5987.

412. Karkare, S., Chung, T. T., Collin, F., Mitchenall, L. A., McKay, A. R., Greive, S. J., Meyer, J. J. M., Lall, N., & Maxwell, A. (2013). The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 5149-5156.
413. Kim, T. J., & Yun, Y. P. (2007). Antiproliferative activity of NQ304, a synthetic 1,4-naphthoquinone, is mediated via the suppressions of the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cells. *Vascular pharmacology*, 46(1), 43-51.
414. Song, H., Wang, R., Wang, S., & Lin, J. (2005). A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(13), 4700-4705.
415. Komiyama, T., Takaguchi, Y., & Tsuboi, S. (2006). Synthesis of anthraquinone derivatives: Tandem Diels-Alder-decarboxylation-oxidation reaction of 3-hydroxy-2-pyrone with 1,4-naphthoquinone. *Synlett*, 2006(01), 0124-0126.
416. Carreño, M. C., García-Cerrada, S., Urbano, A., & Di Vitta, C. (2000). Studies of Diastereoselectivity in Diels-Alder Reactions of Enantiopure (*SS*)-2-(*p*-Tolylsulfinyl)-1,4-naphthoquinone and Chiral Racemic Acyclic Dienes. *The Journal of Organic Chemistry*, 65(14), 4355-4363.
417. Carreño, M. C., Urbano, A., & Di Vitta, C. (1998). Enantioselective Diels-Alder Cycloadditions with (*SS*)-2-(*p*-Tolylsulfinyl)-1,4-naphthoquinone: Efficient Kinetic Resolution of Chiral Racemic Vinylcyclohexenes. *The Journal of Organic Chemistry*, 63(23), 8320-8330.
418. Brimble, M. A., & McEwan, J. F. (1997). Use of bis (oxazoline)-metal complexes as chiral catalysts for asymmetric Diels-Alder reactions using 2-acetyl-1,4-naphthoquinone as a dienophile. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(24), 4069-4078.
419. Carreño, M. C., Urbano, A., & Di Vitta, C. (2000). Enantioselective Diels-Alder Approach to C-3-Oxygenated Angucyclinones from (*SS*)-2-(*p*-Tolylsulfinyl)-1,4-naphthoquinone. *Chemistry—A European Journal*, 6(5), 906-913.



420. Khatri, A. I., & Samant, S. D. (2014). Facile, Diversity-Oriented, Normal-Electron-Demand Diels-Alder Reactions of 6-Amino-2*H*-pyran-2-ones with Diethyl Acetylenedicarboxylate, 1,4-Naphthoquinone, and *N*-Phenylmaleimide. *Synthesis*, 343-350.

421. Landells, J. S., Larsen, D. S., & Simpson, J. (2003). Remote stereochemical control in asymmetric Diels-Alder reactions: synthesis of the angucycline antibiotics, (-)-tetrangomycin and MM 47755. *Tetrahedron letters*, 44(28), 5193-5196.

422. Lozynskyi, A., Senkiv, J., Ivasechko, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Levytska, O., Karpenko, O., Boshkayeva, A., Sayakova, G., Gzella, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). 1,4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575.

423. Ivasechko, I., Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, R., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khylyuk, D., Gzella, A., Bielawski, A., Bielawska, A., Dzubak, P., Gurska, S., Hajduch, M., Stoika, R., & Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles based on 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (juglone). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 115304.

424. Лозинський, А. В., Половкович, С. В., Кархут, А. І., & Лесик Р.Б. (2021, 25-26 травня). Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі 1,4-нафтохінону та юглону як дієнофілів. *Науково-практична конференція з міжнародною участю «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines»*, Тернопіль, 11.

425. Лозинський, А., Івасечко, І., Кархут, А., Половкович, С., Стойка, Р., & Лесик, Р.Б. (2023, 29-31 травня). Синтез похідних тіазоло[2,3-*d*]тіопірану на основі 5-гідрокси-1,4-нафтохінону (юглону) як протипухлинних агентів. *XIX наукова конференція «Львівські хімічні читання-2023»*, Львів, У2.

426. Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor, R. (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), S1-S19.

427. Frish, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, V., Barone, G. A., Petersson, H., Nakatsuji, X., Li, M., Caricato, A., Marenich, J., Bloino, B. G., Janesko, R., Gomperts, B., Mennucci, H. P., Hratchian, J. V., Ortiz, A. F., Izmaylov, J. L., Sonnenberg, D., Williams-Young, F., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, J., Goings, B., Peng, A., Petrone, T., Henderson, D., Ranasinghe, V. G., Zakrzewski, J., Gao, N., Rega, G., Zheng, W., Liang, M., Hada, M., Ehara, K., Toyota, R., Fukuda, J., Hasegawa, M., Ishida, T., Nakajima, Y., Honda, O., Kitao, H., Nakai, T., Vreven, K., Throssell, J. A., Montgomery, Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B., Fox, D. J. & Paterson, G. (2009). Gaussian 09, revision A. 02. *Gaussian Inc, Wallingford CT*.

428. Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical chemistry accounts*, 120, 215-241.

429. Mardirossian, N., & Head-Gordon, M. (2016). How accurate are the Minnesota density functionals for noncovalent interactions, isomerization energies, thermochemistry, and barrier heights involving molecules composed of main-group elements? *Journal of chemical theory and computation*, 12(9), 4303-4325.

430. Modrzejewski, M., Hapka, M., Chalasinski, G., & Szczesniak, M. M. (2016). Employing range separation on the meta-GGA rung: New functional suitable for both covalent and noncovalent interactions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(8), 3662-3673.

431. Tomasi, J., Mennucci, B., & Cammi, R. (2005). Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical reviews*, *105*(8), 2999-3094.
432. Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus biological significance: are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Frontiers in pharmacology*, *9*, 71.
433. Podolski-Renić, A., Dinić, J., Stanković, T., Tsakovska, I., Pajeva, I., Tuccinardi, T., Botta, L., Schenone, S., & Pešić, M. (2021). New therapeutic strategy for overcoming multidrug resistance in cancer cells with pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Cancers*, *13*(21), 5308.
434. Dabiri, Y., Abu el Maaty, M. A., Chan, H. Y., Wölker, J., Ott, I., Wölfl, S., & Cheng, X. (2019). p53-dependent anti-proliferative and pro-apoptotic effects of a gold(I) *N*-heterocyclic carbene (NHC) complex in colorectal cancer cells. *Frontiers in Oncology*, *9*, 438.
435. Theodossiou, T. A., Ali, M., Grigalavicius, M., Grallert, B., Dillard, P., Schink, K. O., Olsen, K. E., Wälchli, S., Inderberg, E. M., Kubin, A., Peng, Q., & Berg, K. (2019). Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT-tamoxifen hybrid therapy. *NPJ breast cancer*, *5*(1), 13.
436. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death & Differentiation*, *15*(7), 1153-1162.
437. Bai, J., Li, Y., & Zhang, G. (2017). Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer biology & medicine*, *14*(4), 348.
438. Darzynkiewicz, Z., & Juan, G. (1997). DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. *Current protocols in cytometry*, (1), 7-5.
439. Zhang, W., Liu, A., Li, Y., Zhao, X., Lv, S., Zhu, W., & Jin, Y. (2012). Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *90*(11), 1553-1558.

440. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, *107*(7), 881-891.
441. Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular cell*, *69*(2), 169-181.
442. Van Osdol, W. W., Myers, T. G., Paull, K. D., Kohn, K. W., & Weinstein, J. N. (1994). Use of the Kohonen self-organizing map to study the mechanisms of action of chemotherapeutic agents. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *86*(24), 1853-1859.
443. Лозинський, А. В. (2023). *In silico* дослідження лікоподібності, параметрів токсичності та механізму протипухлинної активності 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2*H*-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону (Les-6400). *Фармацевтичний часопис*, *2*, 5-10.
444. Fauvarque, M. O., Mortier, M., Pillet, C., Aguilar, C., Soleilhac, E., Barette, C., Remusat, V., Terme, T., & Vanelle, P. (2022). *Heterocyclic naphthoquinones derivatives for use in the treatment of cancers including Cushing disease (U.S. Patent No. 11,306,063)*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
445. Son, M. Y., Deng, C. X., Hoeijmakers, J. H., Rebel, V. I., & Hasty, P. (2016). A mechanism for 1,4-Benzoquinone-induced genotoxicity. *Oncotarget*, *7*(29), 46433.
446. Zuo, Z., Liu, X., Qian, X., Zeng, T., Sang, N., Liu, H., Zhou, H., Tao, L., Zhou, X., Su, N., Yu, Y., Chen, Q., Luo, Y., & Zhao, Y. (2020). Bifunctional naphtho[2,3-*d*][1,2,3]triazole-4,9-dione compounds exhibit antitumor effects in vitro and in vivo by inhibiting dihydroorotate dehydrogenase and inducing reactive oxygen species production. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(14), 7633-7652.
447. Gellibert, F., Woolven, J., Fouchet, M. H., Mathews, N., Goodland, H., Lovegrove, V., Laroze, A., Nguyen, V.-L., Sautet, S., Wang, R., Janson, C., Smith, W., Krysa, G., Boullay, V., de Gouville, A.-C., & Hartley, D. (2004). Identification of 1,5-

naphthyridine derivatives as a novel series of potent and selective TGF- $\beta$  type I receptor inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 47(18), 4494-4506.

448. Filyak, Y., Filyak, O., Souchelnytskyi, S., & Stoika, R. (2008). Doxorubicin inhibits TGF- $\beta$  signaling in human lung carcinoma A549 cells. *European journal of pharmacology*, 590(1-3), 67-73.

449. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.

450. Urbani, A., Prosdocimi, E., Carrer, A., Checchetto, V., & Szabò, I. (2021). Mitochondrial ion channels of the inner membrane and their regulation in cell death signaling. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 620081.

451. Czarnomysy, R., Muszyńska, A., Rok, J., Rzepka, Z., & Bielawski, K. (2021). Mechanism of Anticancer Action of Novel Imidazole Platinum (II) Complex Conjugated with G2 PAMAM-OH Dendrimer in Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5581.

452. Palchauthuri, R., & Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current opinion in biotechnology*, 18(6), 497-503.

453. Martinez, R., & Chacon-Garcia, L. (2005). The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Current medicinal chemistry*, 12(2), 127-151.

454. Saibaba, G., Janani, B., Mohamed Asik, R., Rajesh, D., Pugalenth, G., Angayarkanni, J., & Archunan, G. (2019). Natural Lovastatin (NL) as an Anticancer Agent: Docking and Experimental Studies: Anticancer Study Against Dalton's Ascites Lymphoma (DAL). In *ICTMI 2017: Proceedings of the International Conference on Translational Medicine and Imaging* (pp. 115-135). Springer Singapore.

455. Garas, A., Webb, E., Pillay, V., MacPhee, D., Denny, W., Zeller, H., & Cotton, R. (2009). A novel and simple method of screening compounds for interaction with DNA: A validation study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 678(1), 20-29.

456. Muhammad, S., Saqib, A., & Amin, B. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *124*, 1-19.
457. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, *224*, 164-175.
458. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, *5*, 9-19.
459. Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J., & van Bladeren, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental toxicology and pharmacology*, *10*(4), 141-152.
460. de Lima Junior, E. A., Yamashita, A. S., Pimentel, G. D., De Sousa, L. G., Santos, R. V. T., Gonçalves, C. L., Streck, E. L., de Lira, F. S., & Rosa Neto, J. C. (2016). Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *7*(5), 615-625.
461. Biondo, L. A., Silveira, L. S., de Souza Teixeira, A. A., & Neto, J. C. R. (2020). White adipose tissue and cancer: Impacts of doxorubicin and potential co-therapies. *Immunometabolism*, *2*(4) e200030.
462. Hiensch, A. E., Bolam, K. A., Mijwel, S., Jeneson, J. A., Huitema, A. D., Kranenburg, O., van der Wall, E., Rundqvist, H., Wengstrom, Y., & May, A. M. (2020). Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: elucidating the underlying molecular pathways. *Acta physiologica*, *229*(2), e13400.
463. Ray, M. R., Lakshmi, C., Deb, C., Ray, C., & Lahiri, T. (2001). Modulatory effect of dopamine on doxorubicin-induced myelosuppression. *Comparative Clinical Pathology*, *10*(4), 212.
464. Chen, T., Shen, H. M., Deng, Z. Y., Yang, Z. Z., Zhao, R. L., Wang, L., Feng, Z.P., Liu, C., Li, W. H., & Liu, Z. J. (2017). A herbal formula, SYKT, reverses doxorubicin-induced myelosuppression and cardiotoxicity by inhibiting ROS-mediated apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, *15*(4), 2057-2066.

465. Bally, M. B., Nayar, R., Masin, D., Cullis, P. R., & Mayer, L. D. (1990). Studies on the myelosuppressive activity of doxorubicin entrapped in liposomes. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 27, 13-19.
466. Repetto, L. (2009). Incidence and clinical impact of chemotherapy induced myelotoxicity in cancer patients: an observational retrospective survey. *Critical reviews in oncology/hematology*, 72(2), 170-179.
467. Nurgalieva, Z., Liu, C. C., & Du, X. L. (2011). Chemotherapy use and risk of bone marrow suppression in a large population-based cohort of older women with breast and ovarian cancer. *Medical oncology*, 28, 716-725.
468. Daniel, D., & Crawford, J. (2006, February). Myelotoxicity from chemotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 1, pp. 74-85). WB Saunders.
469. Bally, M. B., Nayar, R., Masin, D., Cullis, P. R., & Mayer, L. D. (1990). Studies on the myelosuppressive activity of doxorubicin entrapped in liposomes. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 27, 13-19.
470. Owumi, S. E., Nwozo, S. O., Arunsi, U. O., Oyelere, A. K., & Odunola, O. A. (2021). Co-administration of Luteolin mitigated toxicity in rats' lungs associated with doxorubicin treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 411, 115380.
471. Shaldoum, F., El-kott, A. F., Ouda, M. M. A., & Abd-Ella, E. M. (2021). Immunomodulatory effects of bee pollen on doxorubicin-induced bone marrow/spleen immunosuppression in rat. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6), e13747.
472. Nugroho, A. E., Hermawan, A., Nastiti, K., Suven, S., Elisa, P., Hadibarata, T., & Meiyanto, E. (2012). Immunomodulatory effects of hexane insoluble fraction of *Ficus septica* Burm. F. in doxorubicin-treated rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(11), 5785-5790.
473. Lamas, D., Nicoud, M. B., Sterle, H. A., Carabajal, E., Tesan, F., Perazzo, J. C., Cremaschi, G. A., Rivera, E. S., & Medina, V. A. (2015). Selective cytoprotective effect of histamine on doxorubicin-induced hepatic and cardiac toxicity in animal models. *Cell death discovery*, 1(1), 1-11.
474. Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular

mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(6), 1213-1225.

475. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229.

476. Chen, X., Zhang, Y., Zhu, Z., Liu, H., Guo, H., Xiong, C., ... & Su, S. (2016). Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 3953-3960.

477. Prasanna, P. L., Renu, K., & Gopalakrishnan, A. V. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, 250, 117599.

478. Favreau-Lessard, A. J., Blaszyk, H., Jones, M. A., Sawyer, D. B., & Pinz, I. M. (2019). Systemic and cardiac susceptibility of immune compromised mice to doxorubicin. *Cardio-oncology*, 5(1), 1-10.

479. Favreau-Lessard, A. J., Blaszyk, H., Jones, M. A., Sawyer, D. B., & Pinz, I. M. (2019). Systemic and cardiac susceptibility of immune compromised mice to doxorubicin. *Cardio-oncology*, 5(1), 1-10.

480. Baell, J. B., Ferrins, L., Falk, H., & Nikolakopoulos, G. (2013). PAINS: Relevance to tool compound discovery and fragment-based screening. *Australian Journal of Chemistry*, 66(12), 1483-1494.

481. Lozynskyi, A., Zasadko, V., Atamanyuk, D., Kaminsky, D., Derkach, H., Karpenko, O., Ogurtsov, V., Kutsyk, R., & Lesyk, R. (2017). Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of novel thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles based on aroylacrylic acids. *Molecular Diversity*, 21, 427-436.

482. Lozynskyi, A., Zasadko, V., Derkach, H., & Lesyk, R. (2017, 26-29 September). Antimicrobial activity of some thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles and their structure-related analogues. *7<sup>th</sup> International Weigl Conference*, Lviv, 54.

483. Лозинський, А. В., Засідко, В. В., Семенців, Г. М., Зіменковський, Б. С., & Лесик, Р. Б. (2016, 13-16 вересня). Синтез нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу на основі ароїлакрилових кислот та вивчення їх протимікробної



активності. *VIII Національний з'їзд фармацевтів України: Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*, Харків, 37.

484. Винницька, Р. Б., Девіняк, О. Т., Лозинський, А. В., Голота, С. М., Деркач, Г. О., Деяк, Я. І., Куцик, Р. В., & Lesyk, R. В. (2020). Фармакофорна модель для скринінгу протистафілококової активності серед тiazолідинон-споріднених структур. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*, 18(4), 44-49.

485. Lozynskyi, A., Mاتيychuk, V., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2017). Tandem *hetero*-Diels–Alder-hemiacetal reaction in the synthesis of new chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles. *Heterocyclic Communications*, 23(1), 1-5.

486. Kaminskyu, D., Vasylenko, O., Atamanyuk, D., Gzella, A., & Lesyk, R. (2011). Isorhodanine and thiorhodanine motifs in the synthesis of fused thiopyrano[2,3-*d*][1,3]thiazoles. *Synlett*, 2011(10), 1385-1388.

487. Zelisko, N., Atamanyuk, D., Vasylenko, O., Grellier, P., & Lesyk, R. (2012). Synthesis and antitrypanosomal activity of new 6,6,7-trisubstituted thiopyrano[2,3-*d*][1,3]thiazoles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(23), 7071-7074.

488. Kryshchyshyn, A., Kaminskyu, D., Grellier, P., & Lesyk, R. (2014). Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 51-64.

489. Kryshchyshyn, A., Kaminskyu, D., Karpenko, O., Gzella, A., Grellier, P., & Lesyk, R. (2019). Thiazolidinone/thiazole based hybrids–New class of antitrypanosomal agents. *European journal of medicinal chemistry*, 174, 292-308.

490. Havrylyuk, D., Zimenkovsky, B., Vasylenko, O., Day, C. W., Smeє, D. F., Grellier, P., & Lesyk, R. (2013). Synthesis and biological activity evaluation of 5-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 228-237.

491. Havrylyuk, D., Zimenkovsky, B., Karpenko, O., Grellier, P., & Lesyk, R. (2014). Synthesis of pyrazoline–thiazolidinone hybrids with trypanocidal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 245-254.

492. Holota, S., Kryshchyshyn, A., Derkach, H., Trufin, Y., Demchuk, I., Gzella, A., Grellier, P., & Lesyk, R. (2019). Synthesis of 5-enamine-4-thiazolidinone derivatives with trypanocidal and anticancer activity. *Bioorganic chemistry*, 86, 126-136.
493. Kryshchyshyn, A. P., Atamanyuk, D. V., Kaminsky, D. V., Grellier, P., & Lesyk, R. B. (2017). Investigation of anticancer and anti-parasitic activity of thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles bearing norbornane moiety. *Biopolymers and Cell*, 33(3), 183-205.
494. Sharon, N. (2008). Lectins: past, present and future1. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1457-1460.
495. Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(9), 1593-1608.
496. Kennedy, J. F., Palva, P. M. G., Corella, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M., & Coelho, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate polymers*, 26(3), 219-230.
497. Lozynskyi, A., Golota, S., Zimenkovsky, B., Atamanyuk, D., Gzella, A., & Lesyk, R. (2016). Synthesis, anticancer and antiviral activities of novel thiopyrano[2,3-*d*]thiazole-6-carbaldehydes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 191(9), 1245-1249.
498. Antonyuk, V. O., Klyuchivska, O. Y., Antonyuk, R. V., Lozynskyi, A. V., Pohranychna, K. R., Lesyk, R. B., & Stoika, R. S. (2016). Use of lectin as a vector molecule for delivery of medicinal products to cells and tissues. *Biopolymers and Cell*, 32(6), 461-467.
499. Antonyuk, V. O., Skorohyd, N. R., Lozynskyi, A. V., Antonyuk, R. V., Lesyk, R. B., & Stoika, R. S. (2019). Use of lectins as vector molecules for delivery of drugs to cells and tissues. Report 2. *Biopolymers and Cell*, 35(1), 54-63.
500. Antonyuk, V., Klyuchivska, O., Antonyuk, R., Lozynskyj, A., & Lesyk, R. (2017, 26-29 September). Lectins in the purposeful delivery of drugs to body tissues and individual cells. *7<sup>th</sup> International Weigl Conference*, Lviv, 177.

501. Lozynskyi, A., Senkiv, J., Antonyuk, V., Stoika, R., & Lesyk, R. (2018, 12-15 April). The ways for improving the bioavailability among biologically active 4-thiazolidinones and their structure-related analogs. *Bridges in Life Sciences 13<sup>th</sup> Annual Scientific Conference*, Zagreb, 106.
502. Naisbett, B., & Woodley, J. (1994). The potential use of tomato lectin for oral drug delivery: 2. Mechanism of uptake in vitro. *International journal of pharmaceutics*, 110(2), 127-136.
503. Hauri, H. P., Appenzeller, C., Kuhn, F., & Nufer, O. (2000). Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS letters*, 476(1-2), 32-37.
504. Kumar, P., & Dwivedi, P. (2018). Plant lectins, agricultural advancements and mammalian toxicity. *Molecular Physiology of Abiotic Stresses in Plant Productivity*, 360.
505. Miyake, K., Tanaka, T., & McNeil, P. L. (2007). Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity. *PloS one*, 2(8), e687.
506. Olsnes, S., & Pihl, A. (1982). Toxic lectins and related proteins. *Molecular aspects of cellular regulation*, 2, 51-105.
507. Licastro, F., Franceschi, C., Barbieri, L., & Stirpe, F. (1980). Toxicity of *Momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukaemic lymphocytes. *Virchows Archiv B*, 33, 257-265.
508. Finiuk, N., Zelisko, N., Klyuchivska, O., Yushyn, I., Lozynskyi, A., Cherniienko, A., Manko, N., Senkiv, J., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Thiopyrano[2,3-*d*]thiazole structures as promising scaffold with anticancer potential. *Chemico-Biological Interactions*, 368, 110246.
509. Calderón-Montaña, J. M., Martínez-Sánchez, S. M., Jiménez-González, V., Burgos-Morón, E., Guillén-Mancina, E., Jiménez-Alonso, J. J., Díaz-Ortega, P., García, P., Aparicio, A., & López-Lázaro, M. (2021). Screening for selective anticancer activity of 65 extracts of plants collected in Western Andalusia, Spain. *Plants*, 10(10), 2193.
510. Peña-Morán, O. A., Villarreal, M. L., Álvarez-Berber, L., Meneses-Acosta, A., & Rodríguez-López, V. (2016). Cytotoxicity, post-treatment recovery, and

selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules*, *21*(8), 1013.

511. Balachandran, C., Arun, Y., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., Balakrishna, K., & Al-Dhabi, N. A. (2014). Antimicrobial and cytotoxicity properties of 2,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone isolated from *Streptomyces galbus* (ERINLG-127). *Applied biochemistry and biotechnology*, *172*, 3513-3528.

512. Schinazi, R. F., Chu, C. K., Babu, J. R., Oswald, B. J., Saalman, V., Cannon, D. L., Eriksson, B. F. H., & Nasr, M. (1990). Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral research*, *13*(5), 265-272.

513. Agbandje, M., Jenkins, T. C., McKenna, R., Reszka, A. P., & Neidle, S. (1992). Anthracene-9,10-diones as potential anticancer agents. Synthesis, DNA-binding, and biological studies on a series of 2,6-disubstituted derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, *35*(8), 1418-1429.

514. Teng, C. H., Won, S. J., & Lin, C. N. (2005). Design, synthesis and cytotoxic effect of hydroxy-and 3-alkylaminopropoxy-9,10-anthraquinone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *13*(10), 3439-3445.

515. Wei, B. L., Wu, S. H., Chung, M. I., Won, S. J., & Lin, C. N. (2000). Synthesis and cytotoxic effect of 1,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, *35*(12), 1089-1098.

516. Gatto, B., Zagotto, G., Sissi, C., Cera, C., Uriarte, E., Palù, G., Capranico, G., & Palumbo, M. (1996). Peptidyl anthraquinones as potential antineoplastic drugs: synthesis, DNA binding, redox cycling, and biological activity. *Journal of medicinal chemistry*, *39*(16), 3114-3122.

517. Perry, P. J., Gowan, S. M., Reszka, A. P., Polucci, P., Jenkins, T. C., Kelland, L. R., & Neidle, S. (1998). 1,4-and 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase. *Journal of medicinal chemistry*, *41*(17), 3253-3260.

518. Venitt, S., Crofton-Sleigh, C., Agbandje, M., Jenkins, T. C., & Neidle, S. (1998). Anthracene-9,10-diones as potential anticancer agents: bacterial mutation

studies of amido-substituted derivatives reveal an unexpected lack of mutagenicity. *Journal of medicinal chemistry*, 41(19), 3748-3752.

519. Konishi, M., Ohkuma, H., Matsumoto, K., Tsuno, T., Kamei, H., Miyaki, T., Oki, T., Kawaguchi, H., Vanduyne, G. D. & Clardy, J. (1989). Dynemicin A, a novel antibiotic with the anthraquinone and 1,5-diyne-3-ene subunit. *The Journal of antibiotics*, 42(9), 1449-1452.

520. Malik, E. M., & Müller, C. E. (2016). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal research reviews*, 36(4), 705-748.

521. Sehgal, V. N., Verma, P., & Khurana, A. (2014). Anthralin/dithranol in dermatology. *International journal of dermatology*, 53(10), e449-e460.

522. Almezgagi, M., Zhang, Y., Hezam, K., Shamsan, E., Gamah, M., Al-Shaebi, F., Abbas, A. B., Shoaib, M., Saif, B., Han, H., & Zhang, W. (2020). Diacerein: Recent insight into pharmacological activities and molecular pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110594.

523. Singh, R., & Chauhan, S. M. S. (2004). 9,10-Anthraquinones and other biologically active compounds from the genus *Rubia*. *Chemistry & biodiversity*, 1(9), 1241-1264.

524. Mahmudov, K. T., Kopylovich, M. N., & Pombeiro, A. J. (2013). Coordination chemistry of arylhydrazones of methylene active compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(7-8), 1244-1281.

525. Francisco, A. P., Mendes, E., Santos, A. R., & Perry, M. J. (2019). Anticancer triazenes: from bioprecursors to hybrid molecules. *Current Pharmaceutical Design*, 25(14), 1623-1642.

526. Gescher, A., & Threadgill, M. D. (1987). The metabolism of triazene antitumor drugs. *Pharmacology & therapeutics*, 32(2), 191-205.

527. Zagotto, G., Supino, R., Favini, E., Moro, S., & Palumbo, M. (2000). New 1, 4-anthracene-9,10-dione derivatives as potential anticancer agents. *Il Farmaco*, 55(1), 1-5.

528. Vaughan, K. (2001). Recent progress in the synthesis of bis-triazenes. *Organic Preparations and Procedures International*, 33(1), 59-74.

529. Сабадах, О. П. (2019). *Синтез, властивості та біологічна активність триазенів 9,10-антрацендіону і його похідних* [Дисертація кандидата хімічних наук, Національний університет «Львівська політехніка»].

530. Lozynskyi, A., Sabadakh, O., Luchkevich, E., Taras, T., Vynnytska, R., Karpenko, O., Novikov, V., & Lesyk, R. (2018). The application of anthraquinone-based triazenes as equivalents of diazonium salts in reaction with methylene active compounds. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 193(7), 409-414.

531. Lozynskyi, A., Holota, S., Yushyn, I., Sabadakh, O., Karpenko, O., Novikov, V., & Lesyk, R. (2021). Synthesis and Biological Activity Evaluation of Polyfunctionalized Anthraquinonehydrazones. *Letters in Drug Design & Discovery*, 18(2), 199-209.

532. Gescher, A., & Threadgill, M. D. (1987). The metabolism of triazene antitumor drugs. *Pharmacology & therapeutics*, 32(2), 191-205.

533. Marten, J., Seichter, W., Weber, E., & Böhme, U. (2007). Synthesis and structural study of 2'-and 2',6'-positioned methyl-and nitro-substituted 3-(arylhydrazono) pentane-2,4-diones. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 20(10), 716-731.

534. Lozynskyi, A. V., Konechnyi, Y. T., Roman, O. M., Horishny, V. Y., Sabadakh, O. P., Pasichnyk, S. M., Konechna, R. T., Shupeniuk, V. I., Taras, T. M., & Lesyk, R. B. (2023). New polyfunctionalized 2-hydrazinoanthraquinone derivatives as potential antimicrobial agents. *Biopolymers & Cell*, 39(1) 42-53.

535. Хаблак Я.В., Штриголь С.Ю., Лозинський А.В., Лесик Р.Б. (2022, 21-22 жовтня). Дослідження антиконвульсивної дії антрахінонгідразонових кон'югатів на основі тіобарбітурової кислоти. *Міжнародна науково-практична конференція «протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування»*, Харків, 51-52.

536. Gilli, G., Bellucci, F., Ferretti, V., & Bertolasi, V. (1989). Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding from crystal-structure correlations on the enol

form of the. beta.-diketone fragment. *Journal of the American Chemical Society*, *111*(3), 1023-1028.

537. Sandhu, H. S., Sapra, S., Gupta, M., Nepali, K., Gautam, R., Yadav, S., Kumar, R., Jachak, S. M., Chugh, M., Gupta, M. K., Suri, O. P., & Dhar, K. L. (2010). Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *18*(15), 5626-5633.

538. Lawrence, N. J., & McGown, A. T. (2005). The chemistry and biology of antimetabolic chalcones and related enone systems. *Current pharmaceutical design*, *11*(13), 1679-1693.

539. Gaonkar, S. L., & Vignesh, U. N. (2017). Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Research on chemical intermediates*, *43*, 6043-6077.

540. Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, *6*(10), 92.

541. Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Bonorino Figueiredo, M. S. R., Folador, P., Damazio, R. G., Guollo, R., Geraldo, P. M., Silva, B., & Barreto Silva, F. R. M. (2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *8*(13), 1429-1440.

542. Bandgar, B. P., Gawande, S. S., Bodade, R. G., Gawande, N. M., & Khobragade, C. N. (2009). Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *17*(24), 8168-8173.

543. Kumari, A., & Singh, R. K. (2019). Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic perspectives. *Bioorganic chemistry*, *89*, 103021.

544. Kumar, S. (2020). A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *6*(1), 1-19.

545. Хом'як, С. В. (2014). Синтез гетероциклів на основі халкону з просторово екранованим фенолом. *Вісник Національного університету*

Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування, (787), 230-234.

546. Губрій, З. В., Литвин, Б. Л., Хоміцька, Г. М., Шиян, Г. Б., & Хом'як, С. В. (2013). Синтез амінонафтохінонів з просторово екранованим фенолом. *Вісник Національного університету Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування*, (761), 91-95.

547. Sriram, D., Yogeewari, P., & Devakaram, R. V. (2006). Synthesis, in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(9), 3113-3118.

548. Hamed, M. M., Sayed, M., Abdel-Mohsen, S. A., Saddik, A. A., Ibrahim, O. A., El-Dean, A. M. K., & Tolba, M. S. (2023). Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel diclofenac derivatives as antibacterial agents. *Journal of Molecular Structure*, 1273, 134371.

549. Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 10.

550. Tang, Y. Z., & Liu, Z. Q. (2006). Evaluation of the free-radical-scavenging activity of diclofenac acid on the free-radical-induced haemolysis of human erythrocytes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(5), 625-631.

551. Mendelson, M., & Matsoso, M. P. (2015). The World Health Organization global action plan for antimicrobial resistance. *SAMJ: South African Medical Journal*, 105(5), 325-325.

552. Piggott, A. M., & Karuso, P. (2004). Quality, not quantity: the role of natural products and chemical proteomics in modern drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 7(7), 607-630.

553. Kaminsky, D., Kryshchyshyn, A., & Lesyk, R. (2017). Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(12), 1233-1252.

554. Krzysztof Bielawski, Agnieszka Gornowicz, Robert Czarnomysy, Andrii Lozynskyi, Wojciech Szymanowski, Roman Lesyk. (2023, September 14-16).



Synthesis and cytotoxic activity of a new 4-thiazolidinone derivative against cancer cells. *XI Konferencja Chemii Medycznej*, Lublin, P. 51.

555. Roman Lesyk, Serhii Holota, Andrii Lozynskyi, Anna Bielawska, Krzysztof Bielawski. (2023, September 3-7). Anticancer drug design and discovery: 4-thiazolidinone/thiazole derivatives applications. *EFMC-ASMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry*, Zagreb, P. 237.

556. Kryshchyshyn, A., Kaminsky, D., Grellier, P., & Lesyk, R. (2020). Thiazolidinone-related heterocyclic compounds as potential antitrypanosomal agents. *Azoles-Synthesis, Properties, Applications and Perspectives*.

557. El-Sabbagh, O. I., Baraka, M. M., Ibrahim, S. M., Pannecouque, C., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J., & Rashad, A. A. (2009). Synthesis and antiviral activity of new pyrazole and thiazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 44(9), 3746-3753.

558. Wang, S., Zhao, Y., Zhu, W., Liu, Y., Guo, K., & Gong, P. (2012). Synthesis and Anticancer Activity of Indolin-2-one Derivatives Bearing the 4-Thiazolidinone Moiety. *Archiv der Pharmazie*, 345(1), 73-80.

559. Geronikaki, A. A., Pitta, E. P., & Liaras, K. S. (2013). Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 20(36), 4460-4480.

560. Fomenko, I., Bondarchuk, T., Emelyanenko, V., Denysenko, N., Pavlo, S., Ilkiv, I., Lesyk, R., & Sklyarov, A. (2015). Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 28(1), 37-41.

561. Horishny, V., Kartsev, V., Geronikaki, A., Matychuk, V., Petrou, A., Glamoclija, J., Ciric, A., & Sokovic, M. (2020). 5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)alkancarboxylic Acids as Antimicrobial Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Studies. *Molecules*, 25(8), 1964.

562. Vicini, P., Geronikaki, A., Anastasia, K., Incerti, M., & Zani, F. (2006). Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(11), 3859-3864.

563. Carlson, E. E., May, J. F., & Kiessling, L. L. (2006). Chemical probes of UDP-galactopyranose mutase. *Chemistry & biology*, 13(8), 825-837.
564. Smith, T. K., Young, B. L., Denton, H., Hughes, D. L., & Wagner, G. K. (2009). First small molecular inhibitors of *T. brucei* dolicholphosphate mannose synthase (DPMS), a validated drug target in African sleeping sickness. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1749-1752.
565. Tejchman, W., Korona-Glowniak, I., Malm, A., Zylewski, M., & Suder, P. (2017). Antibacterial properties of 5-substituted derivatives of rhodanine-3-carboxyalkyl acids. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 1316-1324.
566. Konechnyi, Y. T., Lozynskyi, A. V., Horishny, V. Y., Konechna, R. T., Vynnytska, R. B., Korniychuk, O. P., & Lesyk, R. B. (2020). Synthesis of indoline-thiazolidinone hybrids with antibacterial and antifungal activities. *Biopolymers and Cell*, 36(5), 381-391.
567. Конечний, Ю.Т., Корнійчук, О.П., Конечна, Р.Т., Лозинський, А.В., Лесик, Р.Б. (2020). 3-[5-(1H-Індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксо-тіазолідин-3-іл]-пропіонова кислота, що проявляє протигрибкову дію. (Патент № 140203). Укрпатент.
568. Конечний, Ю.Т., Корнійчук, О.П., Тимчук, Р.Т., Конечна, Р.Т., Лозинський, А.В., Лесик, Р.Б. (2020). 2-[5-(1індол-3-ілметилен)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-етансульфонова кислота, що проявляє протигрибкову дію, що проявляє протимікробну дію. (Патент № 142763). Укрпатент.
569. Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in biotechnology*, 31(3), 177-184.
570. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.

571. Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection*, *20*(4), O255-O266.
572. Chowdhary, A., Singh, P. K., Kathuria, S., Hagen, F., & Meis, J. F. (2015). Comparison of the EUCAST and CLSI broth microdilution methods for testing isavuconazole, posaconazole, and amphotericin B against molecularly identified Mucorales species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(12), 7882-7887.
573. Konechnyi, Y., Hrushka, O., Pryzyhley, H., Konechna, R., Lozynskyi, A., Korniychuk, O., & Lesyk, R. (2021). Cell immunity of laboratory animals under the influence of 5-indolylmethylene rhodanine-3-carboxylic/sulphonic acid derivative. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, *1*(29), 76–81.
574. Murlykina, M. V., Morozova, A. D., Zviagin, I. M., Sakhno, Y. I., Desenko, S. M., & Chebanov, V. A. (2018). Aminoazole-based diversity-oriented synthesis of heterocycles. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 527.
575. Lozynskyi, A. V., Yushyn, I. M., Konechnyi, Y. T., Roman, O. M., Matiykiv, O. V., Smaliukh, O. V., Mosula, L. M., Polovkovych, S. V., & Lesyk, R. B. (2021). Synthesis and evaluation of biological activity of 1-[2-amino-4-methylthiazol-5-yl]-3-arylpropenones. *Biopolymers and Cell*, *(5)*, 389-399.
576. Wondrak, G. T., Cabello, C. M., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Ley, S., Li, Y., Sun Z., & Zhang, D. D. (2008). Cinnamoyl-based Nrf2-activators targeting human skin cell photo-oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(4), 385-395.
577. Anderson, A. C. (2003). The process of structure-based drug design. *Chemistry & biology*, *10*(9), 787-797.
578. Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *Journal of molecular medicine*, *78*, 269-281.
579. Dutta, N. K., Annadurai, S., Mazumdar, K., Dastidar, S. G., Kristiansen, J. E., Molnar, J., Martins, M., & Amaral, L. (2007). Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *International journal of antimicrobial agents*, *30*(3), 242-249.

580. Шепета, Ю. Л. (2020). *Синтез, перетворення та біологічна активність похідних 4-тіазолідинону, оксадіазолу та тріазолу з фрагментами нестероїдних протизапальних засобів диклофенаку та ібупрофену в молекулах* [Дисертація кандидата фармацевтичних наук, ЛНМУ імені Данила Галицького].
581. Shepeta, Y., Lozynskyi, A., Sulyma, M., Nektegayev, I., Grellier, P., & Lesyk, R. (2020). Synthesis and biological activity evaluation of new thiazolidinone-diclofenac hybrid molecules. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 195(10), 836-841.
582. Shepeta, Y. L., Lozynskyi, A. V., Tomkiv, Z. V., Grellier, P., & Lesyk, R. B. (2020). Synthesis and evaluation of biological activity of rhodanine-pyrazoline hybrid molecules with 2-(2,6-dichlorophenylamino)-phenylacetamide fragment. *Biopolymers and Cell*, 36(2), 133-145.
583. Likhitwitayawuid, K., Klongsiriwet, C., Jongbunprasert, V., Sritularak, B., & Wongseripipatana, S. (2006). Flavones with free radical scavenging activity from *Goniothalamus tenuifolius*. *Archives of pharmacal research*, 29, 199-202.
584. Mohsin, N. U. A., & Ahmad, M. (2018). Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents; a review of structural features and biological activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(1), 1-20.
585. Sparatore, A., Santus, G., Giustarini, D., Rossi, R., & Del Soldato, P. (2011). Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids. *Expert review of clinical pharmacology*, 4(1), 109-121.
586. Юшин, І. М. (2023). *Синтез та біологічна активність похідних тіазолідину з піразоліновим фрагментом у молекулах* [Дисертація доктора філософії, ЛНМУ імені Данила Галицького].
587. Шепета, Ю. Л., Лозинський, А. В., Нектегаєв, І. О., & Лесик, Р. Б. (2019). Дослідження антиексудативної активності S-алкілованих похідних 1,3,4-оксадіазол-2-тіолу. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, (12, № 3), 266-269.
588. Юшин, І. М., Лозинський, А. В., Федусевич, О. М., Вовчук, О. Я., & Лесик, Р. Б. (2020). Синтез нових 5-заміщених 2-піразолілтіазол-4-онів як

потенційних біологічно активних сполук. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*, 13(2), 214-218.

589. Elgarhi, R., Shehata, M. M., Abdelsameea, A. A., & Salem, A. E. (2020). Effects of Diclofenac versus meloxicam in pentylenetetrazol-kindled mice. *Neurochemical Research*, 45, 1913-1919.

590. Міщенко, М. В. (2022). *Експериментальне дослідження нових похідних тiazолідину як потенційних протисудомних препаратів* [Дисертація доктора філософії, Національний фармацевтичний університет].

591. Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689-701.

592. Dalic, L., & Cook, M. J. (2016). Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2605-2616.

593. Wahab, A. (2010). Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2090-2110.

594. Johnson, M. R., & Kaminski, R. M. (2020). A systems-level framework for anti-epilepsy drug discovery. *Neuropharmacology*, 170, 107868.

595. Wang, Y., & Chen, Z. (2019). An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: Toward precise circuit therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 201, 77-93.

596. Barker-Haliski, M. L., Löscher, W., White, H. S., & Galanopoulou, A. S. (2017). Neuroinflammation in epileptogenesis: Insights and translational perspectives from new models of epilepsy. *Epilepsia*, 58, 39-47.

597. Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 15(8), 459-472.

598. Kleen, J. K., & Holmes, G. L. (2008). Brain inflammation initiates seizures. *Nature medicine*, 14(12), 1309-1310.

599. Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L. J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, 124(5), 307-321.

600. Kleinewietfeld, M., & Hafler, D. A. (2014). Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews*, 259(1), 231-244.
601. Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49-59.
602. Agostinho, P., A Cunha, R., & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design*, 16(25), 2766-2778.
603. Yang, W., Xiong, G., & Lin, B. (2020). Cyclooxygenase-1 mediates neuroinflammation and neurotoxicity in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 1-17.
604. Rawat, C., Kukal, S., Dahiya, U. R., & Kukreti, R. (2019). Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 1-15.
605. Radu, B. M., Epureanu, F. B., Radu, M., Fabene, P. F., & Bertini, G. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. *Epilepsy research*, 131, 15-27.
606. Dhir, A. (2019). An update of cyclooxygenase (COX)-inhibitors in epilepsy disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(2), 191-205.
607. Suemaru, K., Yoshikawa, M., Tanaka, A., Araki, H., Aso, H., & Watanabe, M. (2018). Anticonvulsant effects of acetaminophen in mice: Comparison with the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Epilepsy Research*, 140, 22-28.
608. Vieira, V., Glassmann, D., Marafon, P., Pereira, P., Gomez, R., & Coitinho, A. S. (2016). Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy research*, 127, 107-113.
609. Akula, K. K., Dhir, A., & Kulkarni, S. K. (2008). Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy research*, 78(1), 60-70.

610. Zhou, L., Zhou, L., Cao, S. L., Xie, Y. J., Wang, N., Shao, C. Y., Wang, Y. N., Zhou, J. H., Cowell, J. K., & Shen, Y. (2018). Celecoxib ameliorates seizure susceptibility in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 38(13), 3346-3357.
611. Dhir, A., Naidu, P. S., & Kulkarni, S. K. (2005). Effect of naproxen, a non-selective cyclo-oxygenase inhibitor, on pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 32(7), 574-584.
612. Darvishi, H., Rezaei, M., Khodayar, M. J., Zargar, H. R., Dehghani, M. A., Vardanjani, H. R., & Ghanbari, S. (2017). Differential effects of meloxicam on pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced convulsions in mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(2).
613. Barbalho, P. G., Carvalho, B. D. S., Lopes-Cendes, I., & Maurer-Morelli, C. V. (2016). Cyclooxygenase-1 as a potential therapeutic target for seizure suppression: evidences from zebrafish pentylenetetrazole-seizure model. *Frontiers in neurology*, 7, 200.
614. Mishchenko, M. V., Shtrygol, S. Y., Lesyk, R. B., Lozynskyi, A. V., & Holota, S. M. (2020). Screening study of new thiazolidinone derivatives for anticonvulsant activity. *Zaporozhye Med. J*, 22, 840-846.
615. Mishchenko, M., Shtrygol', S., Lozynskyi, A., Khomyak, S., Novikov, V., Karpenko, O., Holota, S., & Lesyk, R. (2021). Evaluation of anticonvulsant activity of dual COX-2/5-LOX inhibitor darbufelon and its novel analogues. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2), 22.
616. Martin, L., Rabasseda, X., & Castaner, J. (1999). Darbufelone mesilate. *Drugs of the Future*, 24(8).
617. Голота, С. М. (2006). Синтез арил- та гетерилзаміщених 4-тіазолідонів та їх біологічна активність [Дисертація кандидата фармацевтичних наук, ЛНМУ імені Данила Галицького].
618. Bertram, E. (2007). The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*, 48, 65-74.

619. Oliveira, M. S., Furian, A. F., Royes, L. F. F., Figuera, M. R., Fiorenza, N. G., Castelli, M., Machado, P., Bohrer, D., Veiga, M., Ferreira, J., Cavalheiro, E. A., & Mello, C. F. (2008). Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy research*, 79(1), 14-21.
620. Katyal, J., Kumar, H., & Gupta, Y. K. (2015). Anticonvulsant activity of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor etoricoxib in pentylentetrazole-kindled rats is associated with memory impairment. *Epilepsy & Behavior*, 44, 98-103.
621. Mishchenko, M., Shtrygol', S., Lozynskyi, A., Hoidyk, M., Khylyuk, D., Gorbach, T., & Lesyk, R. (2022). Evaluation of 5-[(Z)-(4-nitrobenzylidene)]-2-(thiazol-2-ylimino)-4-thiazolidinone (Les-6222) as Potential Anticonvulsant Agent. *Scientia Pharmaceutica*, 90(3), 56.
622. Mokuno, K., Kato, K., Kawai, K., Matsuoka, Y., Yanagi, T., & Sobue, I. (1983). Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *Journal of the neurological sciences*, 60(3), 443-451.
623. Liu, Z., Li, J., Yang, F., Hu, Y., Liu, J., Hu, H., & Su, W. (2020). Sodium valproate combined with levetiracetam in pediatric epilepsy and its influence on NSE, IL-6, hs-CRP and electroencephalogram improvement. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(3), 2043-2048.
624. Payandemehr, B., Khoshneviszadeh, M., Varastehmoradi, B., Gholizadeh, R., Bahreman, T., Attar, H., Bahreman, A., & Dehpour, A. R. (2015). A COX/5-LOX inhibitor licofelone revealed anticonvulsant properties through iNOS diminution in mice. *Neurochemical research*, 40, 1819-1828.
625. Rojas, A., Chen, D., Ganesh, T., Varvel, N. H., & Dingledine, R. (2019). The COX-2/prostanoid signaling cascades in seizure disorders. *Expert opinion on therapeutic targets*, 23(1), 1-13.
626. Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986-1000.
627. Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M. S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., & Dingledine, R. (2014). Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*, 55(1), 17-25.



628. Geronikaki, A. A., Lagunin, A. A., Hadjipavlou-Litina, D. I., Eleftheriou, P. T., Filimonov, D. A., Poroikov, V. V., Alam, I., & Saxena, A. K. (2008). Computer-aided discovery of anti-inflammatory thiazolidinones with dual cyclooxygenase/lipoxygenase inhibition. *Journal of medicinal chemistry*, *51*(6), 1601-1609.
629. Zhu, X., Yao, Y., Yang, J., Zhengxie, J., Li, X., Hu, S., Zhang, A., Dong, J., Zhang, C., & Gan, G. (2020). COX-2-PGE2 signaling pathway contributes to hippocampal neuronal injury and cognitive impairment in PTZ-kindled epilepsy mice. *International Immunopharmacology*, *87*, 106801.
630. Melekh, B., Ilkiv, I., Lozynskyi, A., & Sklyarov, A. (2017). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in rat liver exposed to celecoxib and lansoprazole under epinephrine-induced stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *7*(10), 094-099.
631. Tanaka, S., Nakamura, T., Sumitani, K., Takahashi, F., Konishi, R., Itano, T., & Miyamoto, O. (2009). Stage-and region-specific cyclooxygenase expression and effects of a selective COX-1 inhibitor in the mouse amygdala kindling model. *Neuroscience research*, *65*(1), 79-87.
632. Jiang, J., Yang, M. S., Quan, Y., Gueorguieva, P., Ganesh, T., & Dingledine, R. (2015). Therapeutic window for cyclooxygenase-2 related anti-inflammatory therapy after status epilepticus. *Neurobiology of disease*, *76*, 126-136.
633. Sang, N., Zhang, J., Marcheselli, V., Bazan, N. G., & Chen, C. (2005). Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *Journal of Neuroscience*, *25*(43), 9858-9870.
634. Chen, C., & Bazan, N. G. (2005). Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, *93*(2), 929-941.
635. Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B. L., Pozzan, T., & Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, *391*(6664), 281-285.

636. Akaike, A., Kaneko, S., Tamura, Y., Nakata, N., Shiomi, H., Ushikabi, F., & Narumiya, S. (1994). Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain research*, *663*(2), 237-243.
637. Yagami, T., Koma, H., & Yamamoto, Y. (2016). Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous system. *Molecular neurobiology*, *53*, 4754-4771.
638. Gryglewski, R. J. (1979). Prostacyclin as a circulatory hormone. *Biochemical Pharmacology*, *28*(21), 3161-3166.
639. Steinhauer, H. B., Anhut, H., & Hertting, G. (1979). The synthesis of prostaglandins and thromboxane in the mouse brain in vivo. Influence of drug induced convulsions, hypoxia and the anticonvulsants trimethadione and diazepam. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *310*(1), 53-58.
640. Manev, H., Uz, T., Sugaya, K., & Qu, T. (2000). Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in an aging brain. *The FASEB Journal*, *14*(10), 1464-1469.
641. Razavi, S. M., Khayatan, D., Arab, Z. N., Momtaz, S., Zare, K., Jafari, R. M., Dehpour, A. R., & Abdolghaffari, A. H. (2021). Licofelone, a potent COX/5-LOX inhibitor and a novel option for treatment of neurological disorders. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *157*, 106587.
642. Qu, T., Uz, T., & Manev, H. (2000). Inflammatory 5-LOX mRNA and protein are increased in brain of aging rats. *Neurobiology of aging*, *21*(5), 647-652.
643. Aguiar, C. C. T., Almeida, A. B., Araújo, P. V. P., Abreu, R. N. D. C. D., Chaves, E. M. C., Vale, O. C. D., Macêdo, D. S., Woods, D. J., de França Fonteles, M. M., & Vasconcelos, S. M. M. (2012). Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2012*.
644. Garga, N., & Lowenstein, D. H. (2006). Posttraumatic epilepsy: a major problem in desperate need of major advances. *Epilepsy currents*, *6*(1), 1-5.
645. Міщенко, М. В., Штриголь, С. Ю., Лозинський, А. В., & Лесик, Р. Б. (2021). Психотропні властивості потенційного антиконвульсанту 5-[(Z)-(4-

нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону. *News of Pharmacy*, (2 (102)), 96-103.

646. Міщенко, М. В., & Штриголь, С. Ю. (2020). Спектр антиконвульсантної активності та гостра токсичність 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 14(6), 389-396.

647. Greenblatt, H. K., & Greenblatt, D. J. (2018). Gabapentin and pregabalin for the treatment of anxiety disorders. *Clinical pharmacology in drug development*, 7(3), 228-232.

648. Kent, C. N., Park, C., & Lindsley, C. W. (2020). Classics in chemical neuroscience: baclofen. *ACS chemical neuroscience*, 11(12), 1740-1755.

649. Stephen, L. J., Wishart, A., & Brodie, M. J. (2017). Psychiatric side effects and antiepileptic drugs: observations from prospective audits. *Epilepsy & Behavior*, 71, 73-78.

650. Imray, C., Grieve, A., Dhillon, S., & Caudwell Xtreme Everest Research Group. (2009). Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries. *Postgraduate medical journal*, 85(1007), 481-488.

651. McIntosh, S. E., Freer, L., Grissom, C. K., Auerbach, P. S., Rodway, G. W., Cochran, A., Giesbrecht, G. G., McDevitt, M., Imray, C. H., Johnson, E. L., Pandey, P., Dow, J., & Hackett, P. H. (2019). Wilderness medical society clinical practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite: 2019 update. *Wilderness & Environmental Medicine*, 30(4), S19-S32.

652. Sachs, C., Lehnhardt, M., Daigeler, A., & Goertz, O. (2015). The triaging and treatment of cold-induced injuries. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(44), 741.

653. Hu, C., & Ma, S. (2018). Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents. *Medchemcomm*, 9(2), 212-225.

654. Капелька, І. Г., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., Лозинський, А. В., Хом'як, С. В., & Новіков, В. П. (2020). Скринінг низки інгібіторів каскаду

арахідонової кислоти на фригопротекторні властивості. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 14(2), 122-128.

655. Капелька, І.Г., Міщенко, М.В., Штриголь, С.Ю., Голота, С.М., Лесик, Р.Б., Лозинський, А.В. (2023). застосування дарбуфелону метансульфонату як засобу фригопротекторної та протисудомної дії. (Патент № 127082).

Укрпатент.

656. Fosslie, E. (2005). Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 35(4), 347-385.

657. Johnson, A. R., Marletta, M. A., & Dyer, R. D. (2001). Slow-binding inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 with darbufelone, an isoform-selective antiinflammatory di-tert-butyl phenol. *Biochemistry*, 40(25), 7736-7745.

658. Peters-Golden, M., & Henderson Jr, W. R. (2007). Leukotrienes. *New England Journal of Medicine*, 357(18), 1841-1854.