

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

СЕВЕРІНА ГАННА ІВАНІВНА



УДК 54.057:547.853:611.81:615.217

**СИНТЕЗ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦНС-АГЕНТІВ СЕРЕД
ПОХІДНИХ ПРИМІДИН-4-ОНУ ТА ПРИМІДИН-2(4)-ТІОНУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фармацевтичних наук**

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий консультант: доктор фармацевтичних наук, професор
ГЕОРГІЯНЦ ВІКТОРІЯ АКОПІВНА
Національний фармацевтичний університет,
завідувачка кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
ЖУРАВЕЛЬ ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА
Харківська медична академія післядипломної освіти,
завідувачка кафедри клінічної біохімії, судово-
медичної токсикології та фармації;

доктор фармацевтичних наук, професор
КАПЛАУШЕНКО АНДРІЙ ГРИГОРОВИЧ
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри фізикоїдної хімії;

доктор фармацевтичних наук, професор
ЛОГОЙДА ЛІЛІЯ СВЯТОСЛАВІВНА
Тернопільський національний медичний університет
ім. І. Я. Горбачевського, завідувачка кафедри
фармацевтичної хімії.

Захист відбудеться «22» квітня 2021 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська,4).

Автореферат розіслано «20» березня 2021 р.

В. о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
професор

О. А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Захворювання центральної нервової системи (ЦНС) спричинюються безліччю етіологічних факторів і характеризуються різноманітним напрямом патогенезу. Магістральним вектором пошуку ЦНС-агентів у поданому дослідженні обрано протиепілептичну дію. Зумовлено це тим, що епілепсія є не лише одним із найпоширеніших неврологічних захворювань, з динамічними, щораз більшими показниками розвитку рефрактерних форм, а й складним системним процесом, пов'язаним зі схильністю до спонтанних судом і цілим спектром когнітивних, поведінкових, психіатричних розладів та супутнім розвитком коморбідних станів – нейропатичних болей, депресії, тривожності, психозу, неврозу тощо. Таргетами для фармакокорекції судомних нападів та запобігання епілептогенезу постають різноманітні біомішені, які після ортостеричного або алостеричного зв'язування з ЦНС-лігандом здатні давати диференційовану фармакологічну відповідь – позитивну або негативну алостеричну модуляцію (ПАР, НАР), агоністичну або антагоністичну дію. Усі протиепілептичні біомішені є таргетами і для лікування інших патологій ЦНС. Наявні сьогодні протиепілептичні препарати (ПЕП), навіть новітньої генерації, характеризуються широким спектром побічних ефектів, левову частку яких становлять саме розлади ЦНС. Тому пошук нових інноваційних ПЕП з кращою ефективністю та переносністю залишається важливим завданням, розв'язання якого значною мірою залежить від комплексного доклінічного використання скринінгових моделей на тваринах (W. Löscher, 1978-2020; R.S. Fisher, 1989-2020). Водночас, в умовах якщо не тотальної заборони експериментів *in vivo*, то як мінімум обґрунтування виняткової їх необхідності, головним інструментом для оптимізації та аргументації фармакологічних досліджень постає віртуальний скринінг, зокрема молекулярний докінг (Л.О. Перехода, 2010-2020). І в цьому контексті надважливим є визначення чітких кореляцій відповідності біомішені в *in silico* експерименті та механізму реалізації фармакологічного ефекту експериментальної скринінгової моделі, що дозволить нівелювати або знизити відсоток випадків, коли високоафінні до бажаної біомішені ліганди не виявляють ефективності в експерименті *in vivo*.

Накопичені експериментальні дані щодо фармакологічної активності похідних піримідину та ролі окремих структурних фрагментів у реалізації активності дозволяють зарахувати піримідин до так званих «привілейованих структур» (“privileged scaffolds”) з пріоритетним впливом на ЦНС та з визначеною афінністю до відомих ЦНС-біомішеней, а також зі значним потенціалом для фармакокорекції судомних нападів та епілептогенезу (M. Matias, 2010-2020, В.А. Георгіянець 2007-2020). Більшість лікарських засобів з ядром піримідину, впроваджених у медичну практику, впливають саме на діяльність ЦНС. Наприклад, протисудомний – фенобарбітал, анксиолітик – буспірон, нейролептик – рисперидон, антипсихотик – ритансерин, антипаркінсонічний засіб – пірибедил, снодійні «Z-препарати» – залеплон та індіплон. Висока психотропна активність похідних піримідину підтверджує актуальність модифікації та функціоналізації структури «піримідинової» матриці з метою досягнення бажаного фармакологічного профілю з достатнім рівнем ефективності, безпеки та переносимості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до планів МОЗ та НАМН України, вона є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темою «Молекулярний дизайн і цілеспрямований синтез нових біологічно активних органічних речовин та їх фокусованих комбінаторних бібліотек» № державної реєстрації № 0114U000944.

Мета і завдання дослідження. Метою наукового дослідження є теоретичне обґрунтування сучасної методології таргет-орієнтованого пошуку ЦНС-агентів у ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону та її експериментальне підтвердження.

Для досягнення визначеної мети необхідно було вирішити такі завдання:

- скласти загальний дизайн таргет-орієнтованого дослідження щодо пошуку ЦНС-агентів на основі літературних даних відомих ЦНС-біомішеней та залежності фармакологічної відповіді від конформаційного розміщення лігандів, аналізу структурних особливостей відомих ЦНС-агентів;
- обґрунтувати вибір основного скафолду для дослідження та напрямків його функціоналізації, дотримуючись принципів сучасної фармакофорної моделі протисудомної активності, сконструювати віртуальну базу ЦНС-агентів;
- відповідно до механізму скринінгової моделі визначення протисудомної активності *in vivo* відібрати біомішені та здійснити селекцію структур-кандидатів для синтезу за показником афінності, а також визначити параметри «лікоподібності»;
- здійснити синтез відібраних структур-кандидатів, а саме: похідних 2-алкіл/арил-5,6-R¹,R²-піримідин-4(3*H*)-ону та дослідити реакцію їх алкілування хлорацетатною кислотою, її естером та амідами в різних умовах; 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину та продуктів їх амінування; похідних 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино-, 2-ацетил/бензоїлідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-ону;
- синтезувати та визначити напрямки алкілування похідних 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону;
- здійснити синтез тіопохідних піримідину, а саме 6-метил-2-тіоксопіримідин-4-ону, 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4-ону, 4,6-диметилпіримідин-2(1*H*)-тіону та 2-метил/арил-6-R-піримідин-4-тіону, дослідити реакцію їх алкілування хлорацетамідами та заміщеними фенацилбромідами в різних умовах;
- підтвердити будову та чистоту індивідуальних сполук з використанням елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ¹H, ¹³C, NOESY ЯМР-спектроскопії, ВЕРХ-МС, рентгеноструктурного аналізу.
- за результатами фармакологічного скринінгу синтезованих сполук на моделі судом, індукованих пентилентетразолом (PTZ), здійснити SAR-аналіз з визначенням важливих для прояву протисудомної активності фрагментів та відібрати «сполуки-хіти» для поглиблених фармакологічних досліджень;
- провести дослідження протисудомної активності «сполук-хітів» методами *in silico* та *in vivo* на моделі судом, індукованих електрошоком (МЕШ), та ранжувати сполуки за найбільш сприятливими показниками активності на PTZ та МЕШ-

моделях судом, гострої токсичності, дозозалежності антиконвульсивної дії, нейротоксичності та визначити сполуку-лідера;

- спрогнозувати методами *in silico* та довести в експериментах *in vivo* спектр протисудомної активності «сполуки-лідера» на моделі судом, індукованих тіосемікарбазидом, стрихніном, кофеїном, пікротоксином, на моделі PTZ-кіндлінгу; наявність протизапальної активності; передбачити можливі механізми впливу на ЦНС;
- виявити кореляцію між результатами молекулярного докінгу й експериментальними даними та розробити уніфікований алгоритм раціонального пошуку ПЕП;
- вивчити супутні фармакологічні властивості сполуки-лідера: вплив на м'язовий тонус і координацію рухів, на поведінкові реакції, ноотропні, анксиолітичні та антидепресивні властивості, стійкість до гіпоксії та взаємодію з етанолом; дослідити анальгетичну активність з різним механізмом дії та можливий адиктивний потенціал;
- модифікувати лабораторну методику синтезу «сполуки-лідера» з урахуванням принципів «зеленої хімії» та подальшого масштабування в умови промислового виробництва. Розробити методики контролю якості (МКЯ) та дослідити стабільність субстанції.

Об'єкт дослідження – молекулярне моделювання та цілеспрямований синтез потенційних протисудомних речовин.

Предмет дослідження – похідні піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону як перспективні ЦНС-агенти: дизайн структури; прогнозування протисудомних властивостей; методи синтезу, дослідження фізико-хімічних та фармакологічних властивостей; залежність «структура – протисудомна активність»; механізми реалізації фармакологічної дії.

Методи дослідження. Для синтезу речовин використовували загальні методи органічного синтезу; для доведення перебігу реакцій, хімічної будови, індивідуальності та ступеня чистоти синтезованих сполук застосовували сучасні фізико-хімічні методи – елементний аналіз, УФ-, ІЧ-, ^1H , ^{13}C , NOESY ЯМР-спектроскопію, РСА, ВЕРХ-МС. Для розробки МКЯ на сполуку-лідера використовували хімічні та фізико-хімічні методи, відповідно до вимог ДФУ. Для визначення кореляцій *in silico* та *in vivo* досліджень планували та узагальнювали результати фармакологічних досліджень: визначення протисудомної активності на семи моделях з різним патогенезом, седативної, анксиолітичної, антиамнестичної, антидепресантної, протизапальної, анальгетичної, міорелаксантної, антигіпоксичної активності, гострої та нейротоксичності, циркадіадних ритмів та дозозалежності протисудомної активності, адиктивного потенціалу. Статистичні обрахунки виконували з використанням програмного забезпечення ANOVA. Для проведення *in silico* досліджень використовували програми AutoDock Vina та AutoDockTools1.5.6, BIOVIADraw 2017R2, Chem3D, HyperChem 7.5, Discovery Studio Visualizer 2017/R2, SwissADME.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено сучасну методологію таргет-орієнтованого пошуку

ЦНС-агентів у ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону. Визначено ефективні методики синтезу й одержано 230 нових похідних піримідину, з'ясовано їх будову, вивчено фізико-хімічні властивості та проведено системний скринінг на PTZ-моделі судом. За результатами скринінгу визначено великий кластер значущих та критичних для прояву протисудомної активності фрагментів і сформульовано чіткі закономірності зв'язку «структура – антиконвульсанта активність».

Визначено умови регіоселективного перебігу реакції алкілування 2-алкіл/арил-5,6- R^1, R^2 -піримідин-4(3H)-онів: N-похідні утворюються за алкілування хлорацетамидами 2-алкілзаміщених похідних піримідину в середовищі діоксану в присутності натрій гідрокарбонату та 2-арилзаміщених похідних – у середовищі ДМФА в присутності калій карбонату. Продукти O-алкілування утворюються за взаємодії 2-арилпохідних піримідин-4(3H)-ону з хлорацетатною кислотою та її естером у середовищі діоксан/натрій гідрокарбонату. Методом РСА виявлено, що алкілування 1-арилпіразоло[3,4-d]піримідин-4-онів хлорацетамидами та хлор-1-(4-арилпіперазиніл)етаном відбувається за атомом нітрогену в 5 положенні піразолопіримідинового циклу. Розроблено оптимальні методики та одержано серії нових амінованих похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину: 4-гідразино-, 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6-R-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та -амінопропіонову кислоти. Одержано 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино- та N-ацетил/бензоїлгідразино-6-метил-піримідин-4(3H)-ону з використанням як вихідного інтермедіата 6-метил-2-метилтіопіримідин-4(3H)-ону.

З'ясовано, що продуктами алкілування тіопіримідинів, а саме: 6-метил- та 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(1H)-онів, 4,6-диметил-2-тіопіримідину, 2-метил/арил-6-R-піримідин-4-тіонів – різноманітними хлорацетамидами в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату або триетиламіну є індивідуальні S-ацетамідні похідні, що зумовлено взаємодією вихідних сполук тільки у SH-таутомерній форми.

Доведено, що взаємодія 6-метил-2-тіопіримідин-4-ону з заміщеними фенацилбромідами в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату як за нагрівання, так і без нього, не зупиняється на стадії утворення S-алкілованих похідних, а відбувається подальша внутрішньомолекулярна циклізація та утворюється суміш продуктів – 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4-ону і 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5H-тіазоло[3,2-a]піримідин-5-ону. З'ясовано, що витримування одержаної реакційної суміші в кислоті сульфатній приводить до утворення продуктів циклізації та ароматизації тіазольного циклу. Визначено, що умовами для одержання індивідуальних 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3H)-онів є проведення реакції в метанолі в присутності натрій метилату.

Уперше систематизовано та обґрунтовано вибір біомішеней для молекулярного докінгу щодо механізмів реалізації конвульсивної дії у скринінгових моделей та експериментально доведено можливість їх використання для прогнозування активності в експерименті *in vivo*. Виявлено такі взаємозв'язки:

- сайти діазепаму та бензамідину – ПAM ГАМК_A рецептора PTZ- та пікротоксинова модель судом;
- сайт вігабатрину – інгібітора ГАМК-амінотрансферази – PTZ- модель судом;

- сайти перампанелю та МРЕР інгібіторів іонотропних AMPA- та метаботропних mGlu5 рецепторів глутамату відповідно – МЕШ-модель судом;
- сайт івермектину інгібітора Gly рецептора – стрихнінова модель судом;
- сайт габапентину – інгібітора амінотрансферази амінокислот із розгалуженим ланцюгом – модель тіосемикарбазидових судом;
- сайт ZM241385 – інгібітора аденозинових рецепторів A₂A – кофеїнова модель судом;
- сайт DCPG – селективного агоніста mGlu8 III групи метаботропних рецепторів глутамату та сайт ТК-40 і фелбамату – антагоністів іонотропних NMDA-рецепторів глутамату – модель пентилентетразолового кіндлінгу.

На основі системного опрацювання даних *in silico* та *in vivo* експериментів сформовано уніфікований алгоритм пошуку інноваційних ПЕП, що складається з поетапного застосування докінгових досліджень та скринінгових моделей.

Реалізація сформованого алгоритму пошуку ПЕП дозволила визначити ряд інноваційних «сполук-хітів», з подальшою ідентифікацією абсолютного лідера з широким спектром протисудомної дії з мультитаргетним механізмом її реалізації і сприятливим супутнім впливом на ЦНС та низьким рівнем токсичності – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)піразол[3,4-*d*]піримідин-4-ону (Епімідин). Для епімідину модифіковано лабораторну методику в умови промислового виробництва, розроблено оригінальні методики контролю якості, зокрема й супровідних домішок, та вивчено стабільність у стресових умовах.

Новизна та пріоритет дослідження підтверджено 2 патентами України на винахід: пат. № 105242 «N-(3,4-диметоксифеніл)-2-{[2-метил-6-(піридин-2-іл)піримідин-4-іл]тіо}ацетамід, що виявляють протисудомну активність»; пат. №116226 «5-R-1-арил-1,5-дигідро-4*H*-піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-они, що виявляють протисудомну активність.»

Практичне значення отриманих результатів. За результатами виконання дисертаційної роботи синтезовано нові похідні піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону, визначено їхні фізичні характеристики та спектральні дані, що може бути використано для з'ясування будови їх нових структурних аналогів. Запропоновано доступні методики синтезу різних груп похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-онів, що можна застосовувати для цілеспрямованого пошуку нових перспективних біологічно активних речовин (БАР) в ряду похідних піримідину. Розроблені методики контролю якості «сполуки-лідера» – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-(4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл)-2-оксо-етил)-піразол[3,4-*d*]піримідин-4-ону (Епімідин).

Сформовано уніфікований алгоритм пошуку інноваційних ПЕП з використанням доступної програми AutoDockVina, прописано методології процесу докінгу з фіксацією координат активних сайтів та значущих для прояву активності амінокислотних залишків, що відкриває можливість практичного застосування алгоритму іншими науковцями й може стати інструментом оптимізації фармакологічного експерименту. Виявлені закономірності залежності протисудомної активності від будови синтезованих речовин створюють передумови для

раціонального дизайну нових синтетичних антиконвульсантів у ряду похідних піримідину.

Спосіб синтезу та МКЯ потенційного АФІ «Епімідин» апробовано в умовах промислового підприємства та внесено до плану наукових розробок АТ «Фармак» на 2019-2022 рр. Дослідну партію субстанції передано до департаменту досліджень та розробки АТ «Фармак» (акт впровадження №127/7 від 28.01.2021).

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено в науковий та навчальний процеси кафедр Одеського державного медичного університету, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Національного університету «Чернігівський колегіум» ім. Т. Г. Шевченка, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету (акти впровадження від 12.01.2021 р., 13.01.2021 р., 26.01.2021 р., 27.01.2021 р., 28.01.2021 р. відповідно).

Особистий внесок здобувача. Під час виконання дисертаційної роботи авторкою спільно з науковим консультантом розроблено дизайн дослідження, сформульовано основні вектори синтетичних та фармакологічних досліджень, визначено мету й необхідні для її досягнення завдання. Дисертанткою самостійно здійснено аналіз сучасної наукової літератури, обрано базові скафолди для подальшої хімічної модифікації та на основі принципів фармакофорної моделі протисудомної дії сформовано напрямки цієї модифікації. Розроблено й апробовано методики одержання цільових сполук та здійснено синтез більшості описаних в експериментальній частині речовин, інтерпретовано спектральні характеристики, вивчено й узагальнено фізико-хімічні дані всіх синтезованих сполук. Дисертантка брала участь у плануванні та здійсненні (підготовка зразків) фармакологічних досліджень. Авторкою самостійно інтерпретовано, систематизовано, описано отримані дані; разом з фармакологами визначено «сполуки-хіти» та після поглиблених досліджень – «сполуку-лідера». Дисертанткою самостійно сплановано та проведено *in silico* дослідження, інтерпретовано, систематизовано та описано одержані результати, сформовано алгоритм пошуку інноваційних ПЕП та проведено аналіз залежності «структура – активність». Самостійно здійснено дослідження щодо масштабування методики синтезу епімідину для імплементації в умови промислового виробництва, взято участь у її апробації в АТ «Фармак». Дисертантка брала участь у розробленні МКЯ епімідину та дослідженні стабільності, а також у визначенні впливу біофармацевтичних аспектів на прояв протисудомної активності.

Співавторами наукових праць є науковий консультант, а також науковці, з якими спільно проведено фізико-хімічні та фармакологічні дослідження. Фармакологічні дослідження здійснювали на кафедрі фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова під керівництвом д-ра мед. наук, проф. Н. І. Волощук та на кафедрі фармакології Національного фармацевтичного університету під керівництвом д-ра мед. наук, проф. С. Ю. Штриголя. Розробку методик контролю якості епімідину здійснювали на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ та департаменту з виробництва АФІ АТ «Фармак» за консультативної підтримки канд. фарм. наук С. М. Губарь та за консультативної підтримки д-ра біомед. наук,

завідувача кафедри аналітичної і токсикологічної хімії Литовського університету наук здоров'я Л. Іванаускаса. Масштабування методики синтезу та апробацію МКЯ епімідину здійснювали на базі департаменту з виробництва АФІ АТ «Фармак» (керівник – канд. фарм. наук В. М. Кушнірук). Мікроскопічне визначення дисперсності та розчинності виконували на кафедрі заводської технології ліків під керівництвом д-ра фарм. наук, проф. О. А. Рубан та д-ра фарм. наук І. В. Ковалевської. Фізико-хімічні методи аналізу здійснено за участі д-ра хім. наук, проф. С. М. Коваленка та канд. фарм. наук А. Р. Хайруліна. Рентгеноструктурний аналіз здійснено канд. хім. наук С. В. Шишкіною. Співавторами наукових праць здобувача захищено такі дисертації: Скупа О. О. «Синтез, фізико-хімічні властивості та протисудомна активність 2,5,6-заміщених похідних піримідин-4(3*H*)-ону(тіону)», Харків, 2013; Каврайський Д. П. «Експериментальне дослідження нових похідних піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону та триазолу як потенційних протисудомних препаратів», Харків, 2017.

Персональний внесок здобувача в кожному з опублікованих праць зі співавторами зазначено в дисертації та авторефераті в списку фахових публікацій. Усі наукові узагальнення, результати, висновки та рекомендації, наведені в дисертації, опрацьовано та виконано автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях: Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених, присвяченій 140-річчю з дня народження проф. М. О. Валяшка, «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 21 квітня 2011 р.), IV Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 29-30 вересня 2011 р.), Всеукраїнській конференції молодих вчених «Хист» (Чернівці, 2012 р.), III Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (м. Вінниця, 17-18 квітня 2012 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 19-20 квітня 2012 р.), Національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 21-22 березня 2013 р.), International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Kharkiv, 2015), 69 Научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Минск, 2015 г.), *CNCH-2015* (Kharkiv, 2015), X Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 20 травня 2016 р.), VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016 р.), Chemistry conference for young scientists «ChemCYS 2018» (Belgium, 21-23 February 2018), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 80-річчю з дня народження професора О. М. Гайдукевича, «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квіт. 2018 р.), I та II Науково-практичних інтернет-конференціях з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 18 жовтня 2018 р., 21

листопада 2019 р.), 9th International Pharmaceutical Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy «*Science and practice 2018*» (Kaunas, November 9, 2018), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 19-20 вересня 2019 р.), 10th International pharmaceutical conference «*Science and practice 2019*» (Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019), Науково-практичній дистанційній міжнародній конференції, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (Івано-Франківськ, 19-20 травня 2020 р.), IX Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова» (г. Алматы, 27 ноября 2020 г.).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано в 43 наукових роботах, серед яких 19 статей у наукових фахових виданнях України та інших країн (7 індексовано БД *Scopus*, 1 – БД *Web of Science*), 2 патенти України на винахід, 21 теза доповідей, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 448 найменувань, з них 381 латиницею та 67 кирилицею, 8 додатків. Обсяг основного тексту становить 310 сторінок. Роботу проілюстровано 15 схемами, 135 рисунками та 78 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Біомішені для пошуку ЦНС-агентів та їх піримідинвімісні ліганди (Огляд літератури). В огляді літератури наведено відомості щодо епідеміології епілепсії та її місця серед інших захворювань ЦНС, тенденцій її поширення в Україні та інших країнах світу, її неврологічних та психологічних коморбідних станів. Розглянуто сучасну класифікацію епілептичних нападів та можливості їх фармакокорекції. Деталізовано всі відомі напрями запобігання епілептогенезу, описано наявні інноваційні біомішені для протиепілептичних та інших ЦНС-агентів, схарактеризовано їх структуру та активні сайти, розглянуто можливі варіанти конформаційного розміщення лігандів у біомішенях з відповідною фармакологічною відповіддю рецептора/фермента. Проведено системний аналіз сучасних досягнень щодо впливу похідних піримідину на діяльність ЦНС та обґрунтовано актуальність і перспективи подальших досліджень зазначеного класу сполук.

Розділ 2. Дизайн таргет-орієнтованого дослідження та обґрунтування вибору цільових структур. Для раціоналізації експерименту розроблено дизайн дослідження (рис. 1), що охоплює: вибір основного скафолду; визначення векторів його функціоналізації та конструювання бібліотеки перспективних ЦНС-агентів; *in silico* таргет-орієнтований скринінг; синтез та виявлення фізико-хімічних властивостей сполук; експериментальні методи фармакологічних досліджень, виявлення «сполуки-лідера» та визначення механізмів реалізації фармакологічної дії; стандартизацію методики синтезу та розробку методів контролю якості (МКЯ) субстанції.

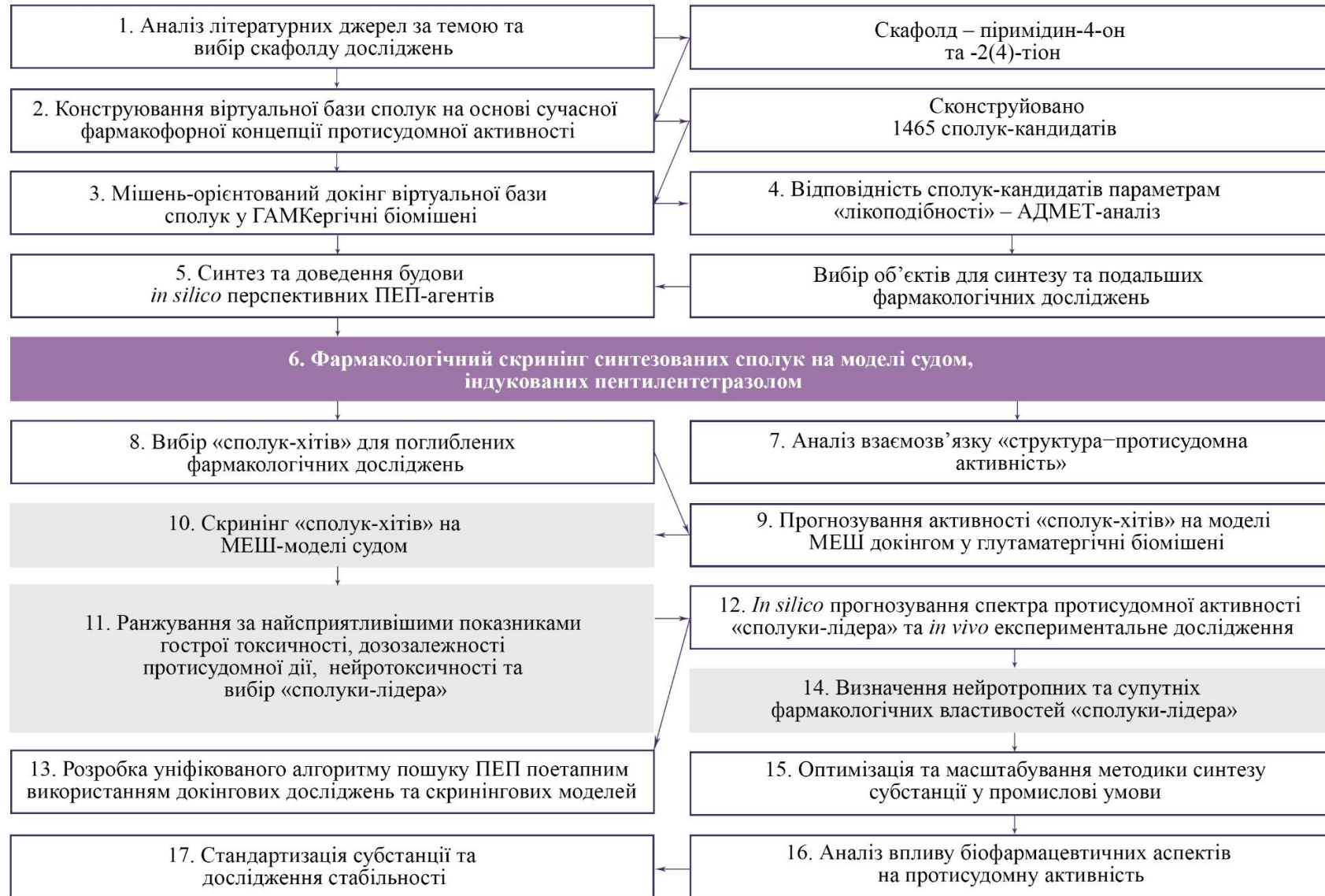


Рис. 1 Загальний дизайн дослідження

Початковий етап досліджень складався з таких етапів:

1. Вибір базового скафолду.
2. Конструювання віртуальної бази потенційних ПЕП:
 - логіко-структурний аналіз літературних даних щодо взаємозв'язку «структура – активність»;
 - застосування принципів фармакофорної моделі протиепілептичної активності;
 - конструювання віртуальної бази потенційних ПЕП.
3. Селекція структур-кандидатів для подальших досліджень:
 - відбір біомішеней для молекулярного докінгу згідно з механізмом дії конвульсанту відповідної фармакологічної скринінгової моделі;
 - докінг сконструйованих лігандів в активні сайти визначених біомішеней;
 - ранжування за показником афінності та сепарація найбільш перспективних сполук.
4. Оцінювання відповідності структур-кандидатів параметрам лікоподібності АДМЕТ(всмоктування, розподіл, метаболізм, виведення та токсичність).

Одним із найбільш пріоритетних напрямів раціонального «*drug design*» нових АФІ є структурна модифікація відомих лікарських засобів для досягнення більш сприятливого фармакологічного профілю. Фенобарбітал (ФБ) – позитивний алостеричний модулятор ГАМК_A рецептора, антиконвульсант першого покоління, який і досі застосовують в протоколах лікування різних форм епілепсії, зокрема її рефрактерних форм та епілептичного статусу в немовлят і дітей. Саме основний структурний фрагмент ФБ – піримідин-4-он **I** – обрано базовим скафолдом для модифікації, функціоналізації та виявлення фрагментарного впливу на протисудомну активність (рис. 2).

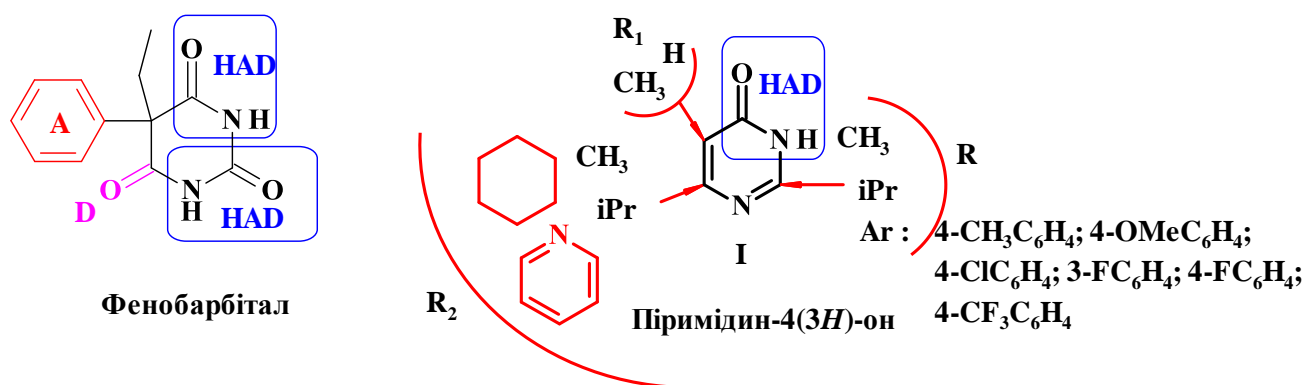


Рис. 2 Вибір базового скафолду та напрямків його функціоналізації

З метою створення бажаного фармакологічного профілю і пошуку оптимальної конформації ліганд-рецептор нами обрано сім піримідинвісних скафолдів, а саме: піримідин з карбонільною групою та тіогрупою в 4 положенні **I** та **II**; за сумісної їх присутності в 4 та 2 положеннях **III**; з додатковою аміногрупою як донора електронів для утворення водневих зв'язків **IV** та з гідрофобними метильними групами замість аміногрупи й карбонілу **V**. Також заплановано синтез 4-хлоропіримідину **VI** та конденсацію піримідин-4-ону з піразоловим циклом у рамках реалізації гібрид-фармакофорного підходу конструювання БАР (рис. 3). Під час конструювання

віртуальної бази структур дотримувалися принципів фармакофornoї моделі протисудомної дії та літературних даних щодо фрагментарного впливу на активність. Схематичне зображення напрямків конструювання віртуальної бази гіпотетичних ЦНС-агентів серед піримідин-4(3H)-ону та -2(4)-тіону наведено на рис. 3. Під час конструювання ЦНС-агентів обрано алкіл/арил/гетерилацетамідний фрагмент як конститутивний, що може стати доменом водневих зв'язків, а також забезпечити своєрідну конформаційну лабільність зазначеної ділянки під час взаємодії з рецептором.

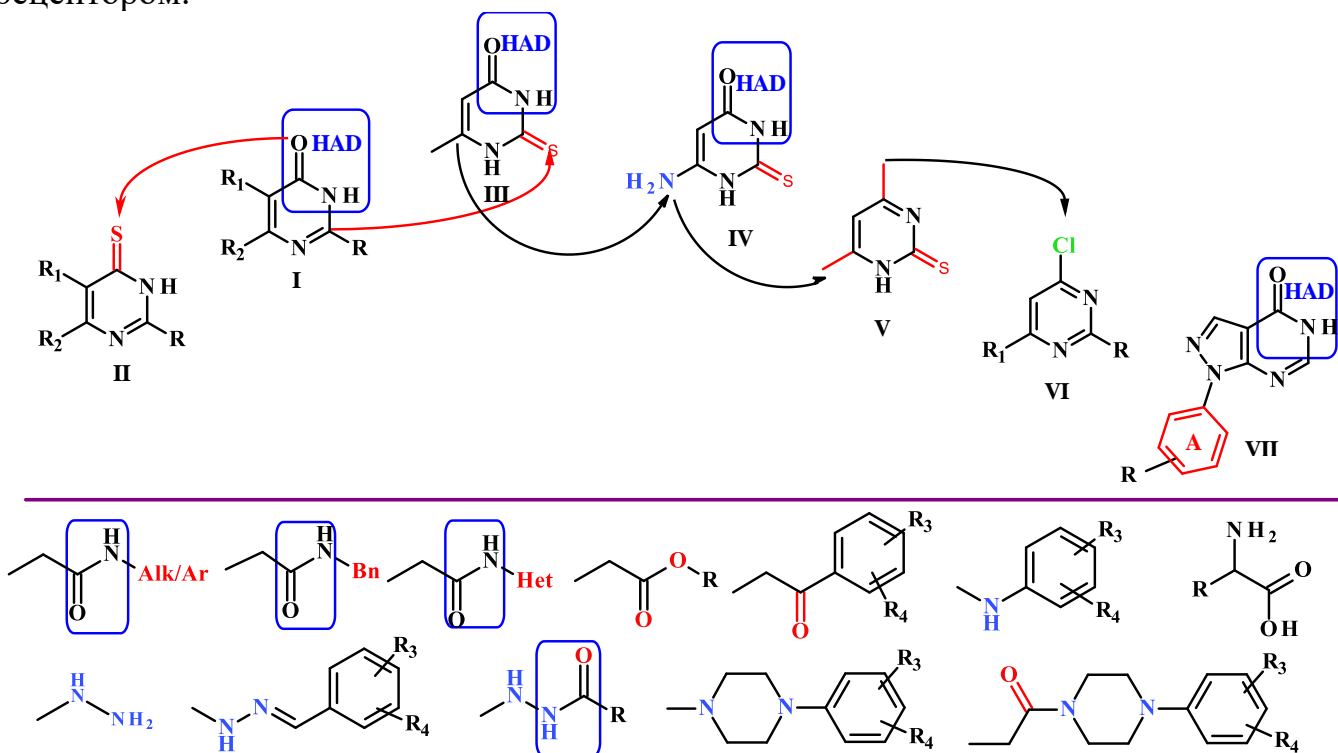


Рис. 3 Ключові скафолди та фармакофornoї фрагменти, обрані для конструювання віртуальної бази ЦНС-агентів

Першою *in vivo* скринінговою моделлю обрано «золотий стандарт» визначення ПЕП – модель RTZ-індукованих судом. З урахуванням механізму конвульсивної дії RTZ для прогнозування активності досліджуваних лігандів було здійснено ранжування віртуальної бібліотеки сполук за показником афінності до ГАМКергічних біомішеней після докінгу в активні сайти ПАМ бензамідину та діазепаму ГАМК_A рецептора та сайт інгібітора ГАМК_{AT} вігабатрину. Скорингову функцію оцінювали щодо значень енергії зв'язування нативних лігандів та референс-препарату ФБ (рис. 4). За результатами сформовано 14 груп структур-кандидатів для синтезу з потенційним впливом на ГАМКергічні біомішені. Для всіх структур з використанням онлайн-ресурсу SwissADME було додатково оцінено фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості, параметри лікоподібності та «medicinal chemistry friendliness», серед яких методи – BOILED-Egg, iLOGP та радар біодоступності.

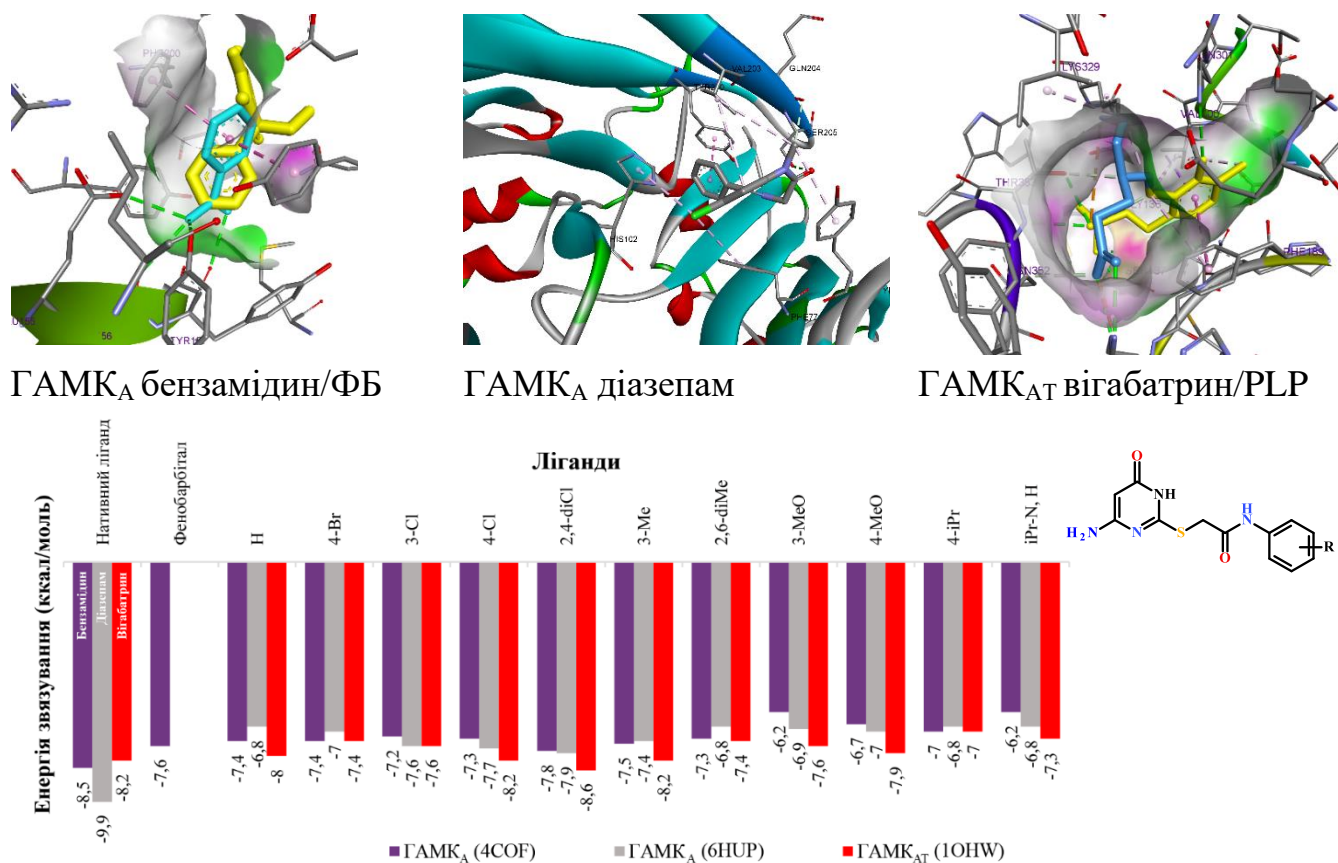
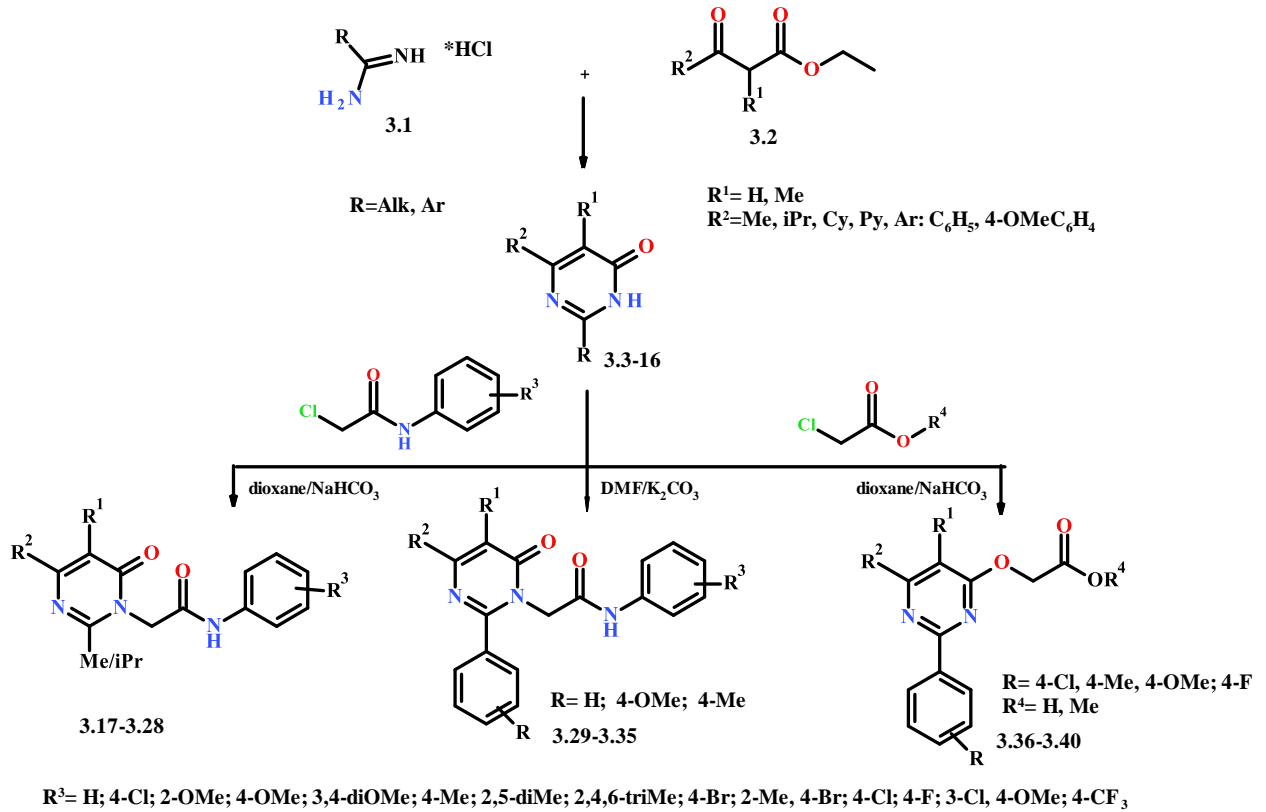


Рис. 4 Таргет-орієнтований віртуальний скринінг на прикладі похідних (6-аміно-4-гідрокси-піримідин-2-іл)тіо-N-арилацетамідів щодо референс-лігандів

Розділ 3. Синтез, фізико-хімічні властивості та результати скринінгу протисудомної активності похідних піримідин-4(3*H*)-ону. Формування піримідинового кільця скафолду **I** здійснено конденсацією алкіл/арилзаміщеного амідин гідрохлориду **3.1** та відповідних кетоестерів **3.2** в середовищі діоксану. В результаті одержано похідні 2-алкіл/арил-5,6-*R*¹,*R*²-піримідин-4(3*H*)-ону **3.3-3.16**. Наступну функціоналізацію здійснено введенням ацетамідного фрагмента (схема 1). У випадку 2-метил/ізопропілпохідних піримідин-4(3*H*)-ону (**3.3-3.8**) алкілування хлорацетамідами в діоксані в присутності натрій гідрокарбонату відбувається регіоселективно за атомом нітрогену з утворенням індивідуальних сполук **3.17-3.28**, що доведено даними ВЕРХ-МС та ЯМР-спектроскопії: хімічні зсуви сигналів протонів метиленової групи на ¹H та атома карбону на ¹³C (45,61 м.ч.), а також наявністю крос-пиків у кореляційних спектрах між метиленовими протонами ацетамідного фрагмента та метиновим протоном ізопропільного залишку в другому положенні піримідинового циклу. За даними ВЕРХ-МС, за алкілування 2-арилпіримідин-4(3*H*)-онів **3.9**, **3.15**, **3.16** в аналогічних умовах утворюється суміш продуктів N- та O-алкілування. Вірогідно, наявність об'ємного ароматичного радикала в 2 положенні стає стеричною перешкодою для перебігу процесу алкілування за атомом нітрогену, і паралельно відбувається реакція за атомом кисню. Продукти N-алкілування вдалося одержати в разі зміни умов проведення реакції, а саме за нагрівання в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату та інтенсивного перемішування впродовж 3 годин (схема 1).



Наявність крос-піків в NOESY-спектрах між метиленовими протонами та зближеними протонами 2,6-ароматичного кільця доводять утворення N-алкілованих продуктів **3.29-3.25** (рис. 5).

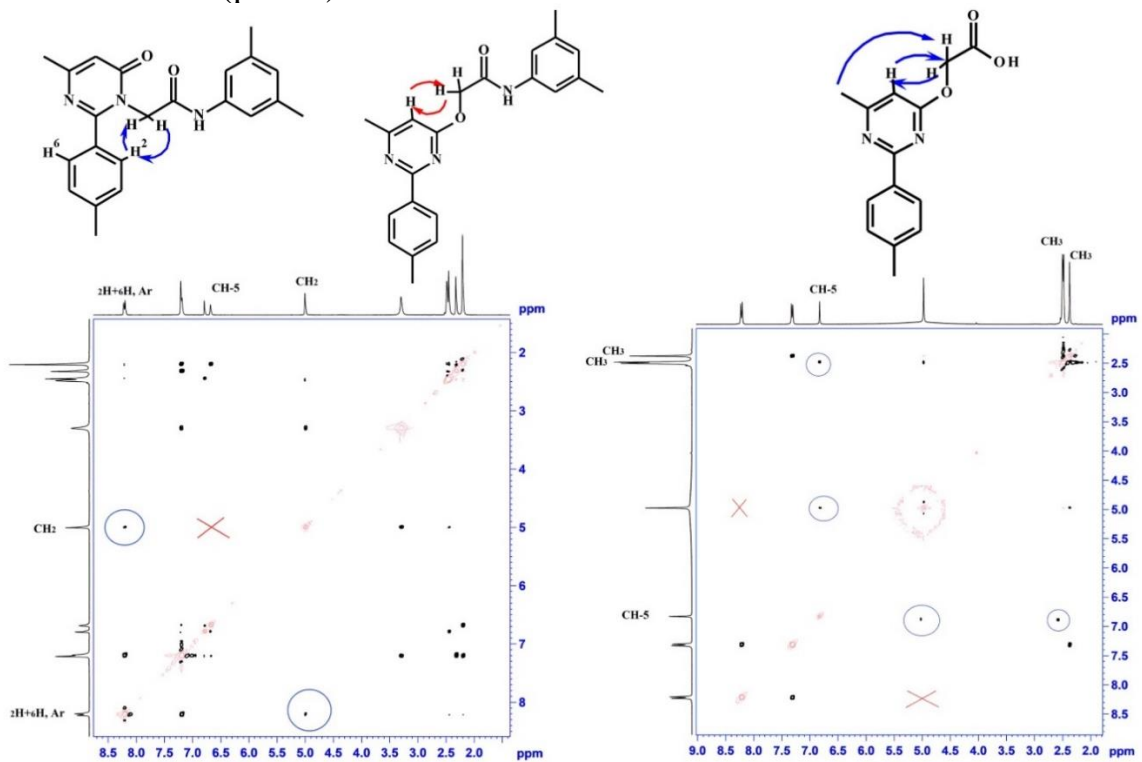


Рис. 5 NOESY-спектри N-ацетаміду **3.32** та 2-[2-(4-метилфеніл)-6-метилпіримідин-4-іл]оксоацетатної кислоти (**3.37**)

Для можливості визначення ролі циклічного карбонілу в реалізації протисудомної активності необхідним було одержати О-алкіловані похідні. Для цього алкілування вихідних 2-арилпіримідин-4(3*H*)-онів (**3.11**, **3.12**, **3.15**, **3.16**) здійснювали хлорацетатною кислотою та її метиловим естером у середовищі діоксану в присутності натрій гідрокарбонату (схема 1). На спектрах ^{13}C ЯМР маркерний атом карбону метиленової групи виявився більш слабкопольним (63,01 м.ч.) щодо N-заміщених похідних **3.17-3.35**, а на кореляційних спектрах було зафіксовано крос-піки просторово зближених протонів метиленової групи та протону СН-5 піримідинового циклу, а також протонів метильної групи у 6 положенні (рис. 5). Абсолютно всі досліджувані N- та О-алкіловані похідні виявили тенденцію до протисудомної активності на PTZ-моделі судом, тією чи іншою мірою захищаючи піддослідних тварин та перевищуючи за активністю вихідні сполуки (**3.6**, **3.8**, **3.7**, **3.11**). Це доводить вплив арилацетамідного фрагмента в реалізації активності (рис. 6). Виявлено зменшення активності щодо замісника у 2 положенні в такому порядку: $i\text{Pr} > \text{Me} > \text{Ar}$.

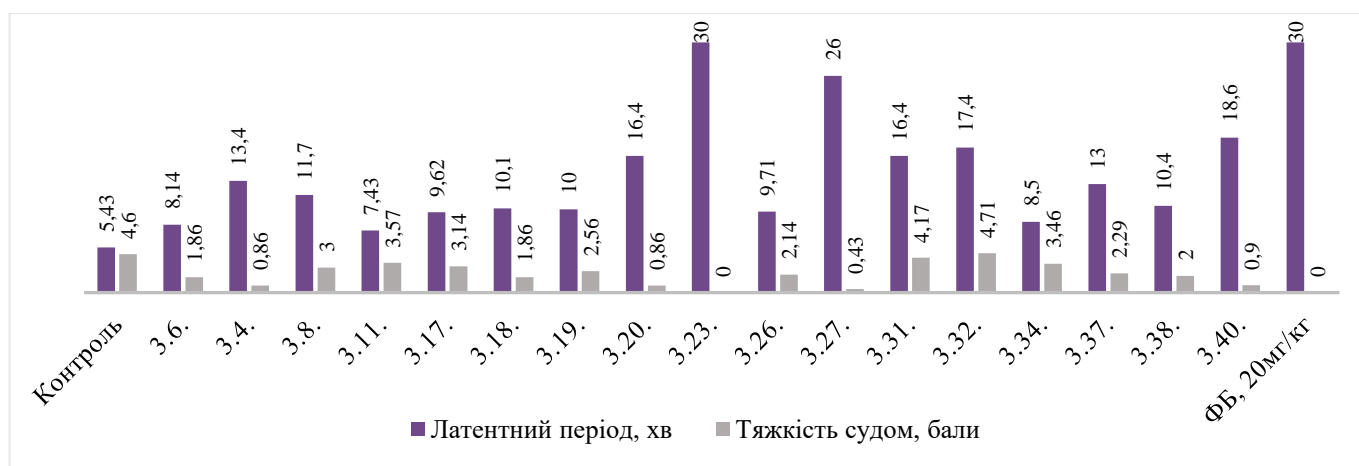
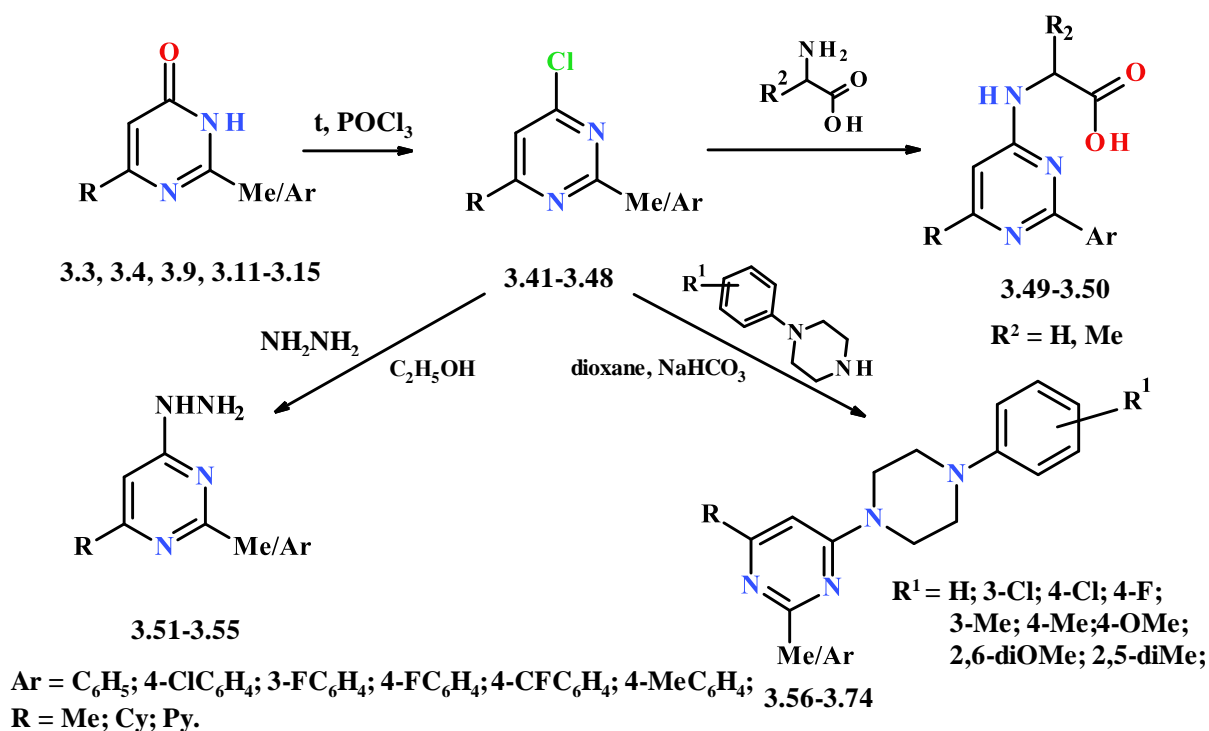


Рис. 6 Результати визначення антиконвульсантної активності N- та О-алкілованих похідних 2-алкіл/арил-5,6- R^1, R^2 -піримідин-4(3*H*)-онів на PTZ-моделі судом

Наступним етапом дослідження було одержання 4-хлоро-2-метил/арил-6- R -піримідинів та їх функціоналізація шляхом амінолізу та гідразінолізу (схема 2). Вихідні 4-хлоро-2-метил/арил-6- R -піримідини (**3.41-3.48**) одержано кип'ятінням відповідних оксопіримідинів **3.3**, **3.4**, **3.11-3.15** у хлороокисі фосфору. Під час взаємодії вихідних 4-хлоропіримідинів **3.41-3.48** з гліцином та аланіном у водному середовищі в присутності калій карбонату одержано 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатна та -амінопропіонова кислоти (**3.49**, **3.50**); з надлишком гідразин гідрату в спиртовому середовищі – відповідні 4-гідразінопохідні **3.51-3.55**; з N-арилпіперазинами в середовищі діоксану в присутності натрій гідрокарбонату – 4-арилпіперазино-2-метил/арил-6- R -піримідини (**3.56-3.74**). Стосовно активності 4-хлоропохідних **3.41-3.48**, то вони очікувано достовірно подовжували латентний період початку першого нападу щодо контрольної групи.



Достовірної активності не виявили 4-гідразинопхідні **3.51-3.55**, а перші неоднозначні результати, одержані в експерименті з 4-арилпіперазиновими похідними (**3.56-3.74**), були такі: разом із високоактивними речовинами **3.61**, **3.69-3.72** похідна **3.63** з 4-хлорофенільним- та 4-метоксифенільними фрагментами продемонструвала проконвульсивну активність, скорочуючи латентний період щодо контролю та викликаючи 100% летальність (рис.7). Також було виявлено негативний вплив 3-флуорофенільного замісника та позитивний – трифлуорометилфенільного замісника.

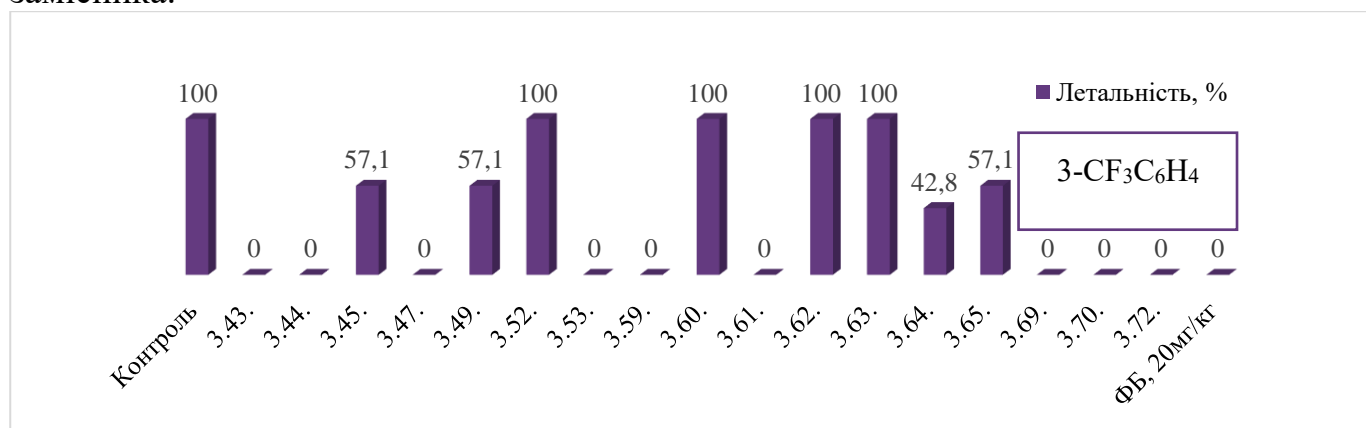
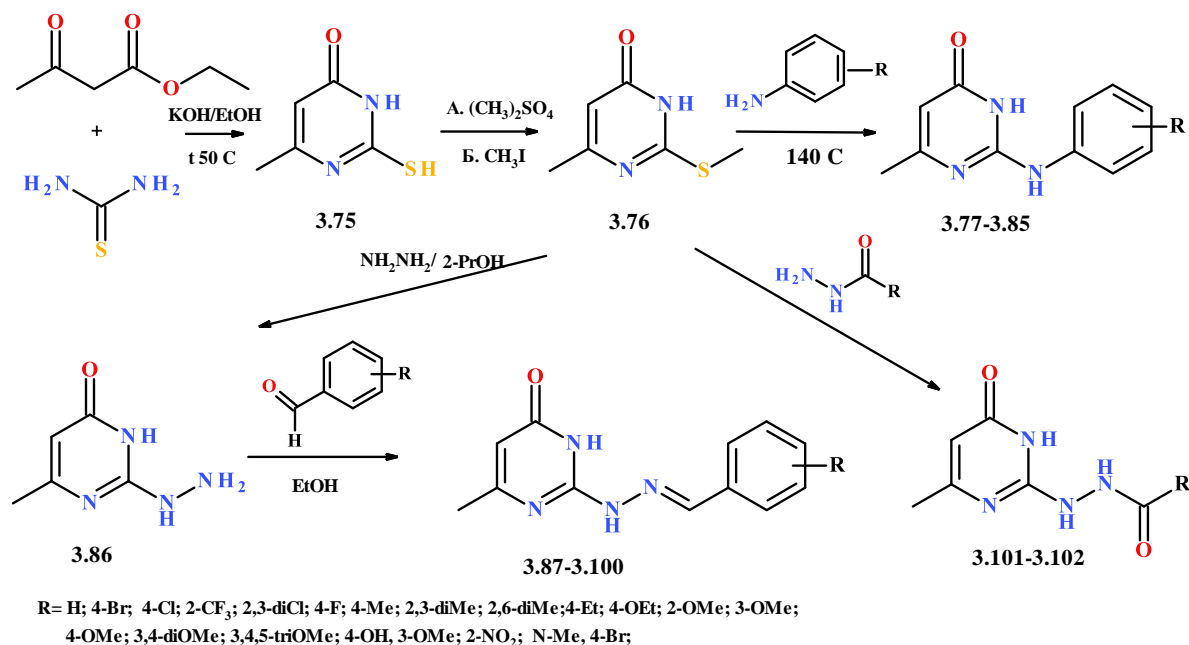


Рис. 7 Показники летальності 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідин-4(3H)-онів та їх амінованих похідних на PTZ-моделі судом

Далі у 2 положення 6-метил-піримідин-4(3H)-ону було введено залишки ариламінів та ариліденгідразинів (схема 3). Шляхом конденсації етил-3-оксобутаноату з тіосечовиною, за нагрівання в етанолі в присутності калій гідроксиду, одержано вихідний інтермедіат – 6-метил-2-тіопіримідин-4(3H)-он (**3.75**), який буде використано і в подальших етапах синтезу. Метилуванням тіогрупи диметилсульфатом або метилйодидом одержано 2-метилтіо-6-метилпіримідин-

4(3*H*)-он (**3.76**). 2-Ариламинопіримідини **3.77-3.85** синтезовано взаємодією з ароматичними амінами за нагрівання до 140 °С. Гідразінолізом метилтіопіримідину **3.76** з наступною конденсацією одержаного гідразину **3.86** з ароматичними альдегідами синтезовано 2-ариліденгідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-они (**3.87-3.100**). Також здійснено синтез *N*-ацетил- (**3.101**) та *N*-бензоїлгідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-ону (**3.102**).

Схема 3



В *in vivo* експерименті вихідний 2-метилтіоурацил **3.76** продемонстрував відсутність протисудомного ефекту, тоді як у разі введення ариламиінних фрагментів з'явилася тенденція до прояву протисудомної активності (рис. 8). Щодо 2-ариліденгідразинових похідних **3.87-3.100**, то значущих показників активності вони не продемонстрували, хоча достовірно подовжували латентний період початку першого нападу мінімум у 1,4 раза.

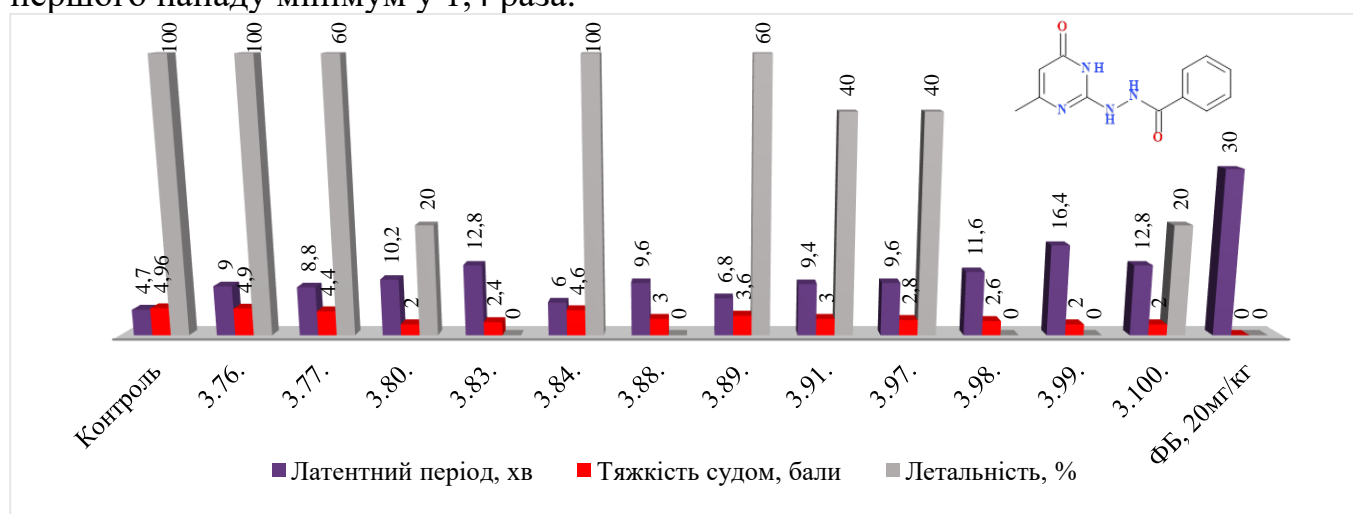
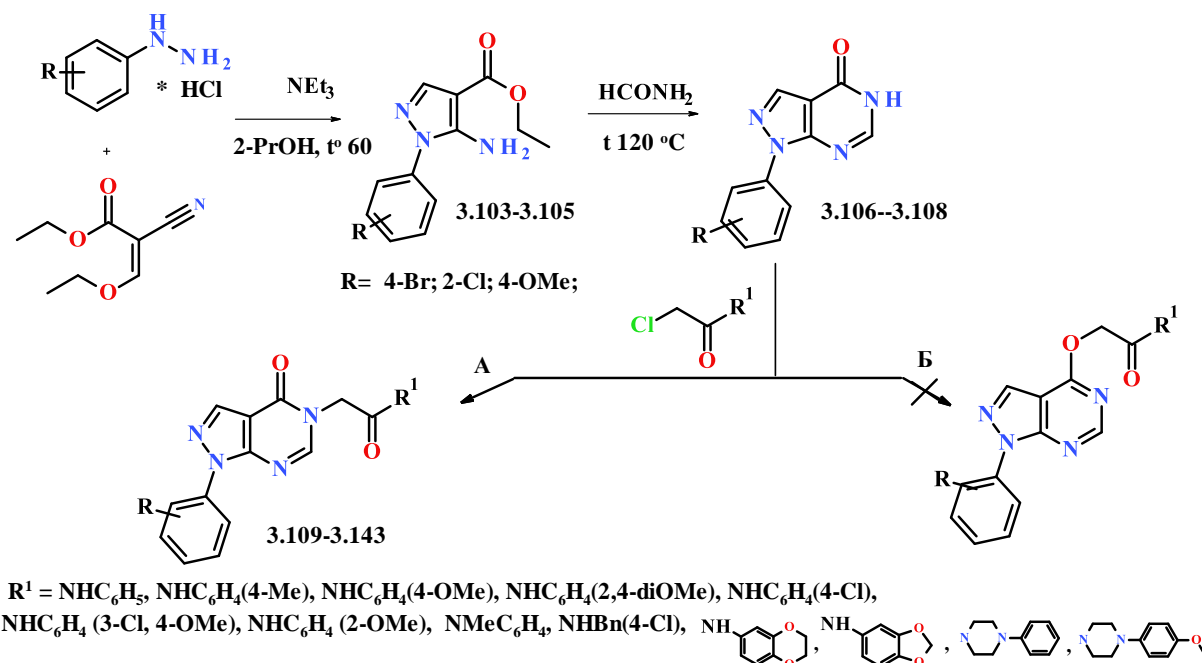


Рис. 8 Показники протисудомної активності 2-ариламіно- та 2-ариліденгідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-онів на PTZ-моделі судом

Наступною групою цільових речовин стали 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-

они (3.106-3.108). Взаємодією відповідних арилгідазинів гідрохлоридів та етилетоксиметиленціаноацетату синтезовано етил 5-аміно-1-арилпіразоло-4-карбоксилати (3.103-3.105) (схема 4).

Схема 4



Наступна конденсація карбоксилатів з формамідом дозволила одержати відповідні 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4(3*H*)-они (3.106-3.108). Функціоналізацію здійснювали алкілюванням *N*-(4-хлоробензил)-, *N*-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксин)-, *N*-(1,3-бензодіоксол)-хлорацетамідами та хлор-1-(4-арил-піперазиніл)етанонами. Методами LC/MS-аналізу доведено утворення індивідуальних речовин, ¹H та ¹³C ЯМР- спектроскопії, а також PCA (рис. 9) достовірно визначено напрямок алкілювання за атомом нітрогену в 5 положенні піразолопіримідинового циклу та утворення продуктів 3.109-3.143.

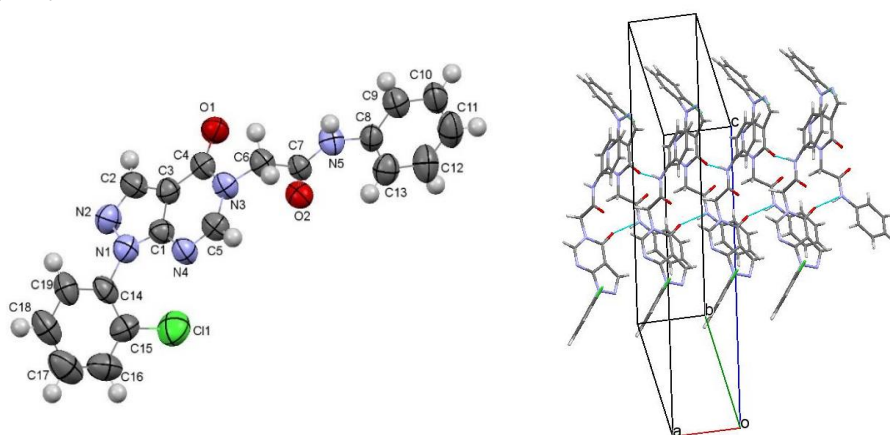


Рис. 9 Молекулярна будова та кристалічна гратка 2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-піразоло[3,4-*d*]піримідин-5-іл]-*N*-фенілацетаміду (3.122)

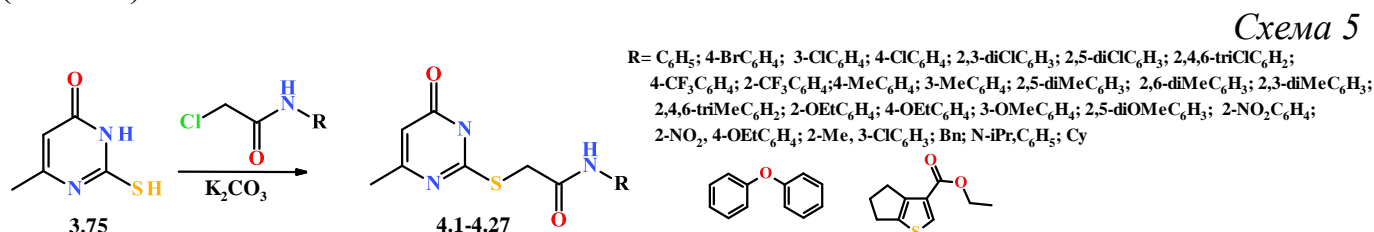
Одержані результати активності в *in vivo* експерименті похідних 3.109-3.143 були не зовсім зіставні з показниками афінності до ГАМКергічних біомішеней та продемонстрували неоднозначні результати. Разом з речовинами з потужною протисудомною активністю (рис. 10), зокрема 3.128, 3.142, 3.143, та великим кластером похідних з тенденцією до захисного антиконвульсивного ефекту виявлено речовини не лише без достовірного впливу на перебіг судом, а й з очевидними

проконвульсивними властивостями. Причому проконвульсанти ідентифіковано серед усіх трьох підгруп – заміщені у 1 положенні 4-бромо-, 2-хлоро- і 4-метоксифенільним радикалом. Виявлено також залежність протисудомної дії від замісника в арильному радикалі у 1 положенні: 4-OMe > 2-Cl > 4-Br. Доведено позитивний вплив піперазинових залишків, а також недоцільність введення оксовмісних гетероциклів.



Рис. 10 Результати визначення протисудомної активності похідних 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону (3.106-3.143)

Розділ 4. Синтез, фізико-хімічні властивості та скринінг на протисудомну активність похідних піримідин-2(4)-тіону. Відповідно до результатів віртуального таргет-орієнтованого пошуку наступними скафолдами експерименту стали піримідин-2- та 4-тіони (II, III, IV, V). Першим було функціоналізовано 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(3*H*)-он (3.75), одержаний на попередньому етапі експерименту (схема 5).



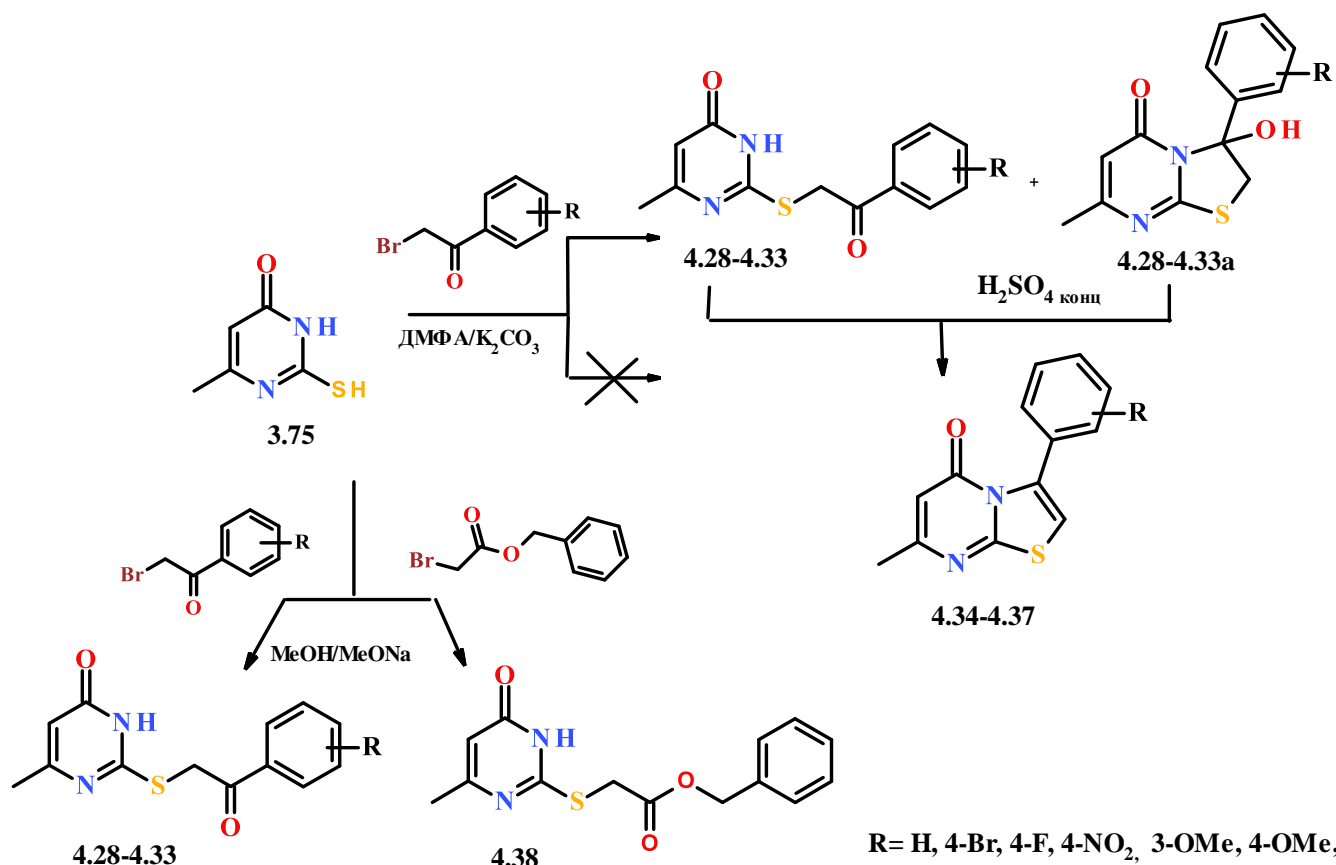
Найбільш очевидним підходом до регіоселективного перебігу реакції з утворенням саме S-ацетамідних похідних було проведення алкілування N-арил/бензил/циклогексил-хлорацетамідами, хлорфеноксифенілацетамідом та етил 2-

[(хлорацетил)аміно]-5,6-дигідро-4Н-циклопента[*b*]тіофен-3-карбоксилатом у середовищі ДМФА в присутності надлишку калій карбонату (схема 5). Абсолютно всі досліджувані похідні **4.1-4.27** знижували розвиток судомного синдрому на PTZ-моделі, достовірно подовжуючи латентний період щодо контрольної групи, сполуки **4.4, 4.7, 4.23, 4.26, 4.27** – меншою мірою (рис. 11). 4-Бромфенілацетамідна похідна **4.2** за всіма показниками була на рівні препарату порівняння фенобарбіталу. Виявлено негативний вплив атомів хору та визначено пропорційну залежність збільшення летальності піддослідних тварин зі збільшенням кількості атомів хлору: **4.4, 4.5, 4.7** = 4-Cl, 2,3-diCl, 2,4,6-triCl= 100%, 60%, 40% летальності.

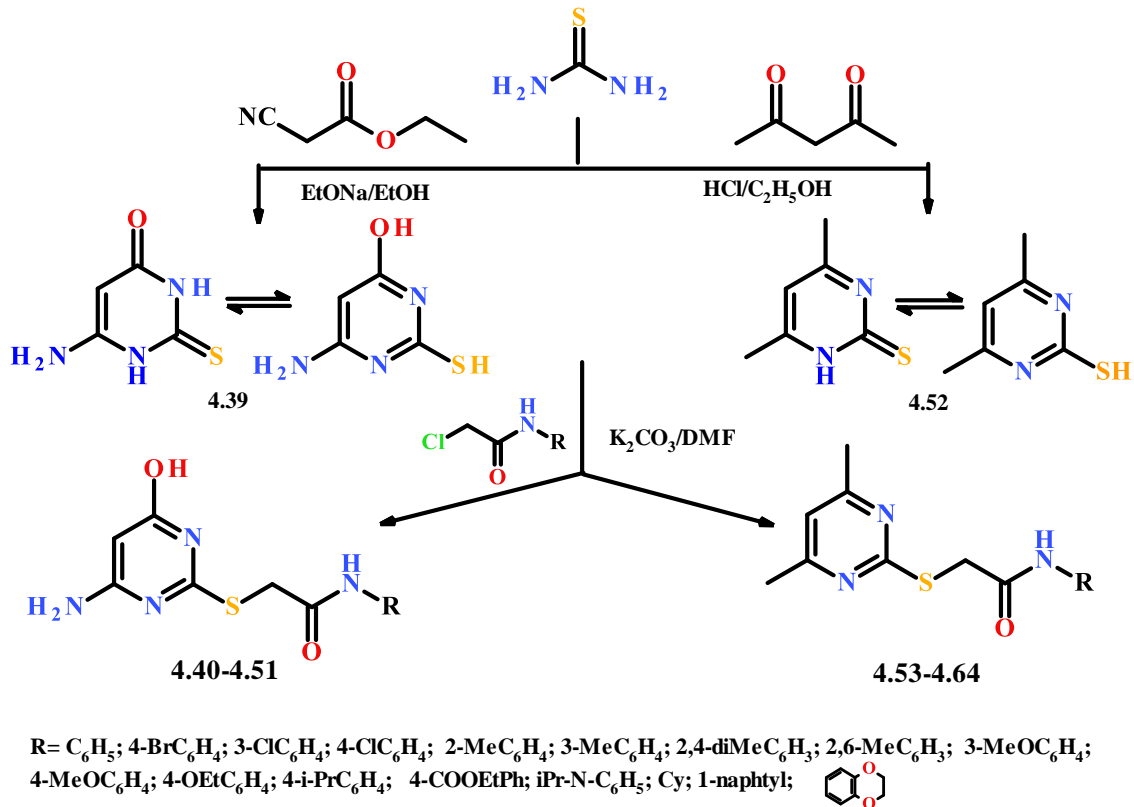


Рис. 11 Протисудомна активність S-ацетамідів 6-метил-2-тіопіримідин-4(3H)-ону (**4.1-4.27**) на PTZ-моделі судом

Під час проведення алкілування 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(3H)-ону (**3.75**) заміщеними фенацилбромідами в середовищі ДМФА в присутності калій карбонату як за нагрівання, так і за кімнатної температури, за даними LC/MS-аналізу та ¹H ЯМР-спектроскопії, утворюється суміш продуктів. Тобто реакція не зупиняється на стадії утворення S-похідних, а відбувається внутрішньомолекулярна циклізація за участю атома нітрогену в 3 положенні з утворенням біциклічної таутомерної форми – 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5H-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-5-онів (**4.28-4.33a**) (схема 6). Про утворення саме такого продукту свідчать два однопротонні дублети на ділянці близько 3,5 м.ч. на ¹H ЯМР-спектрі, тоді як у сполуки лінійної форми ці протони резонують синглетом, а також спостерігається синглет протона гідроксильної групи на ділянці 7,82-8,11 м.ч., що є типовим для ОН-протонів в умовах реєстрації спектра у ДМСО-*d*₆. Витримування суміші в кислоті сульфатній приводить до утворення продуктів циклізації та ароматизації тіазольного циклу з утворенням похідних 3-арил-7-метил-5H-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-5-ону (**4.34-4.37**). Індивідуальні S-алкіловані похідні – 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3H)-они (**4.28-4.33**) – вдалося одержати в результаті проведення реакції в метанолі в присутності натрій метилату без нагрівання впродовж 1 години. На жаль, усі досліджувані сполуки не виявили значного протисудомного ефекту в *in vivo* експерименті, зокрема й тіазолопіримідинові похідні **4.34-4.37**. Зіставлення даних активності дозволило підтвердити позитивний вплив на прояв антиконвульсантної дії саме амідного фрагмента.



Конденсацією тіосечовини з етилціаноацетатом у середовищі натрій етилату одержано 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(3*H*)-он (**4.39**), а конденсацією з ацетилацетоном у присутності соляної кислоти в середовищі етилового спирту – 4,6-диметил-2-тіоксопіримідин (**4.52**) (схема 7). Функціоналізацію здійснено алкілуванням хлорацетамідами в середовищі диметилформаміду в присутності надлишку калій карбонату за температури 70-80 °С. Одержано відповідні S-ацетамідні похідні **4.40-4.51** та **4.53-4.64**. Інтерпретацію протонних спектрів 6-амінопохідних проводили через порівняння зі спектрами ацетамідів 6-метилтіоурацилу (**4.1-4.27**). Визначено, що в умовах зняття спектра у ДМСО-*d*₆ похідні перебувають у гідроксиформі: уширений синглетний сигнал за 11,52-11,50 м.ч. віднесено до протона ОН-групи, бо за існування в лактамній формі протон ННС=О у третьому положенні піримідинового циклу резонує в більш слабкому полі δ 12,52-12,43 м.ч.; зміщення сигналу СН у 5 положенні піримідинового циклу в область сильного поля майже на 1 м.ч. – 5,02-4,99 м.ч. у 4-гідроксіпіримідинів **4.40-4.51** проти 6,05-5,98 м.ч. у піримідин-4-онів **4.1-4.27** свідчить про відсутність впливу електронноакцепторної карбонільної групи. За даними фармакологічного скринінгу (рис. 12), усі досліджувані 6-амінопіримідини продемонстрували антиконвульсивну дію.



Найактивнішими виявилася 4-бромфенільна **4.41** та 3-метилфенільна **4.44** похідні, а отже, доведено позитивний вплив аміногрупи на прояв активності.

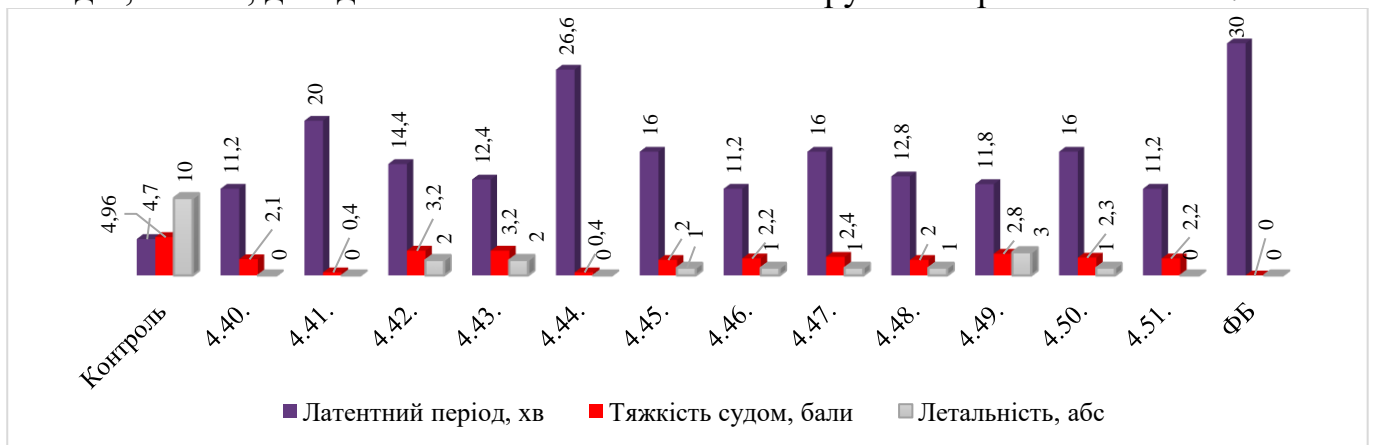
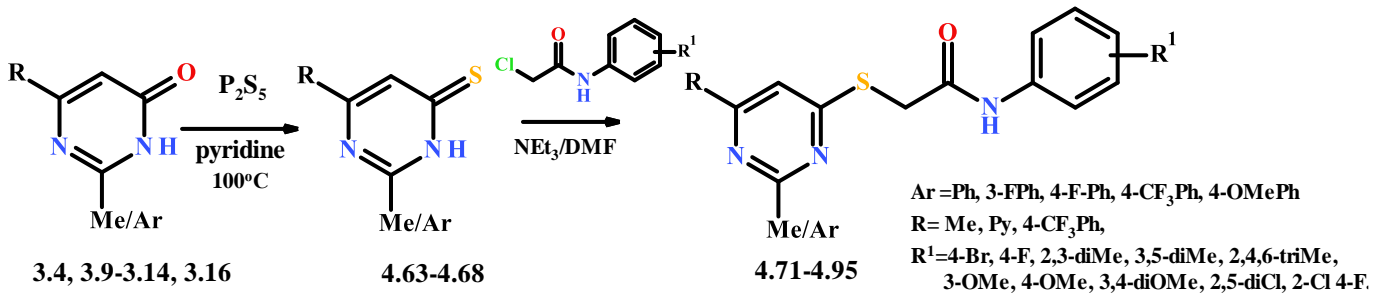


Рис. 12 Протисудомна активність (6-аміно-4-гідроксипіримідин-2-іл)тіо-N-арилацетамідів (**4.40-4.51**)

Стосовно протисудомної активності 4,6-диметилпіримідинів **4.53-4.64**, то жодна з досліджуваних сполук не продемонструвала статистично значущих результатів за показником зменшення летальності щодо контролю, окрім того, всі вони поступалися ФБ за всіма показниками перебігу судомного синдрому.

Для одержання похідних 4-тіопіримідину **4.63-4.68** було проведено взаємодію вихідних 2-метил/арил-6-R-піримідин-4-онів **3.4, 3.9-3.16** з пентасульфідом фосфору за 100 °C у піридині (схема 8). Алкілування 2-хлорацетамідами, проведене у ДМФА в присутності триетиламіну, зумовило утворення відповідних індивідуальних S-ацетамідів.



Зафіксовано наявність протисудомної активності практично у всіх похідних 4-тіопіримідину. Результати фармакологічного скринінгу 150 похідних на моделі PTZ-судом у порівнянні з ФБ і вальпроатом натрію та проведений SAR-аналіз дозволили визначити й зафіксувати деякі тенденції залежності структура – активність (рис. 13). Загалом, проти похідних піримідин-4(3*H*)-онів, похідні піримідин-2(4)-тіонів продемонстрували більш стабільні показники, серед них виявлено відносно більшу кількість речовин зі значною активністю.

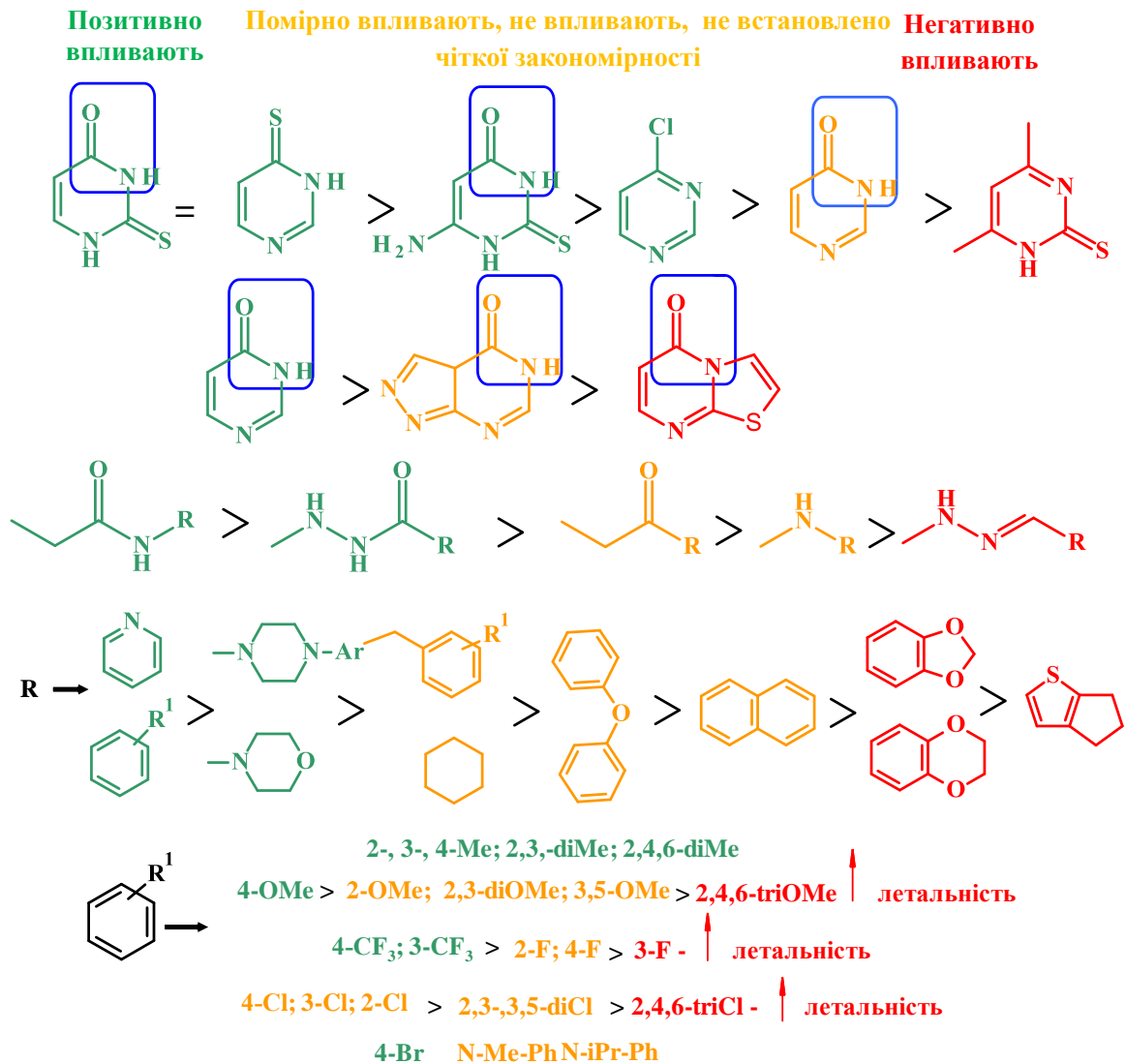


Рис. 13 Узагальнені дані щодо впливу замісників похідних піримідин-4-ону та -піримідин-2(4)-тіону на протисудомну активність на PTZ-моделі судом

Розділ 5. Обґрунтування та реалізація поглиблених фармакологічних досліджень сполук-хітів. За результатами *in silico* таргет-орієнтованого та *in vivo* скринінгу на PTZ-моделі судом для подальших поглиблених досліджень було відібрано сім «сполук-хітів» (рис. 14) – представників п'яти скафолдів, які повністю запобігали летальності піддослідних тварин, достовірно подовжували латентний період, достовірно зменшували тривалість та тяжкість судом на рівні референс-препарату вальпроату натрію або повністю запобігали прояву судом на рівні ФБ.

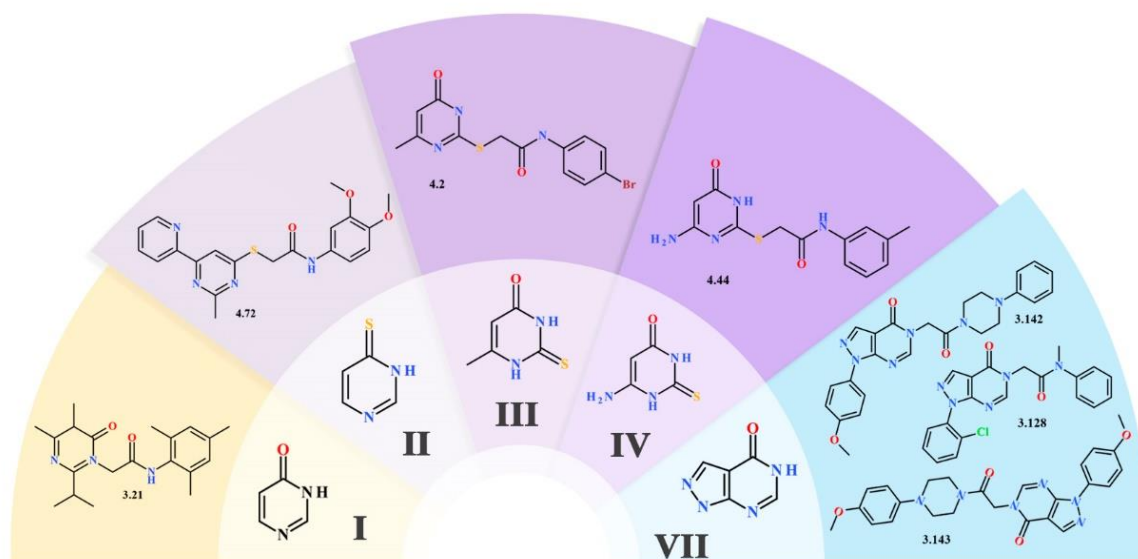


Рис. 14 «Сполук-хіти» за протисудомною активністю на PTZ-моделі

У репрезентованому дослідженні виявлено чіткий взаємозв'язок «біомішень – референс-ліганд – фармакологічна відповідь – скринінгова модель» з теоретичним обґрунтуванням вибору біомішені, *in silico* прогнозом та експериментальним підтвердженням. Визначена кореляція покликана доповнити наявні сьогодні схеми пошуку нових ПЕП з поетапним застосуванням *in vivo* моделей та молекулярного докінгу, що стане інструментом оптимізації фармакологічних досліджень, дозволить оминати емпіричний пошук, а також обґрунтувати доцільність проведення експерименту на тваринах. Для оцінювання перспективності досліджень «сполук-хітів» на моделі МЕШ обрано постсинаптичні мішені глутамату, а саме активні сайти інгібіторів іонотропних AMPA-рецепторів глутамату (PDB ID 5L1F) – перампанелю та метаботропних mGlu5 рецепторів глутамату I групи (PDB ID 6FF1) – МРЕР та топірамату, які виявляють ефективність на МЕШ-моделі судом (рис. 15,16).

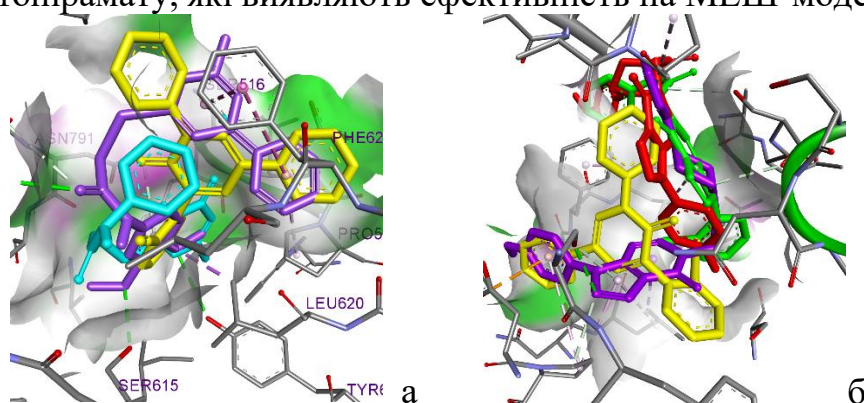


Рис. 15 Візуалізація сумісної конформації перампанелю (жовтий) в активному сайті AMPA-рецептора з а) **3.21** (сірий), **4.72** (бузковий), **4.2** (блакитний); б) **3.143** (фіолетовий), **3.142** (червоний), **3.128** (зелений)

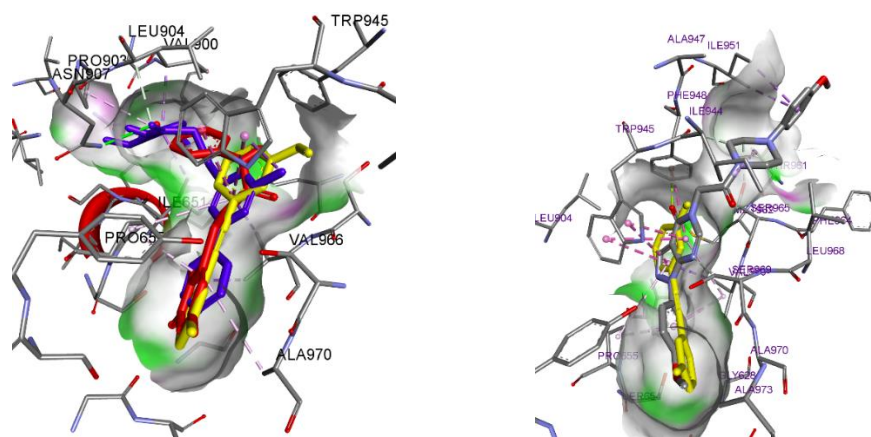


Рис. 16 Конформація в активному сайті mGluR5 лігандів **4.72** (синій), **4.2** (червоний), **3.143** (сірий), МРЕР (жовтий)

Перспективність дослідження на моделі МЕШ-судом оцінювали за показниками енергії зв'язування та аналізу конформаційного розміщення щодо нативних лігандів та участі магістральних, для фармакологічної відповіді, амінокислот активного сайту. Для трьох сполук з семи спрогнозовано активність на МЕШ-моделі: високоактивні тіопохідні піримідину **4.2** та **4.72**, помірноактивна – піразолопіримідинова похідна **3.143**. Прогностичну здатність запропонованих алгоритмів докінгу для оцінювання активності речовин на моделі МЕШ було підтверджено в *in vivo* експерименті. З семи досліджуваних похідних три виявили здатність достовірно захищати від судом піддослідних тварин як щодо контрольної групи, так і референс-препаратів – карбамазепіну та ламотриджину (рис. 17, 18).

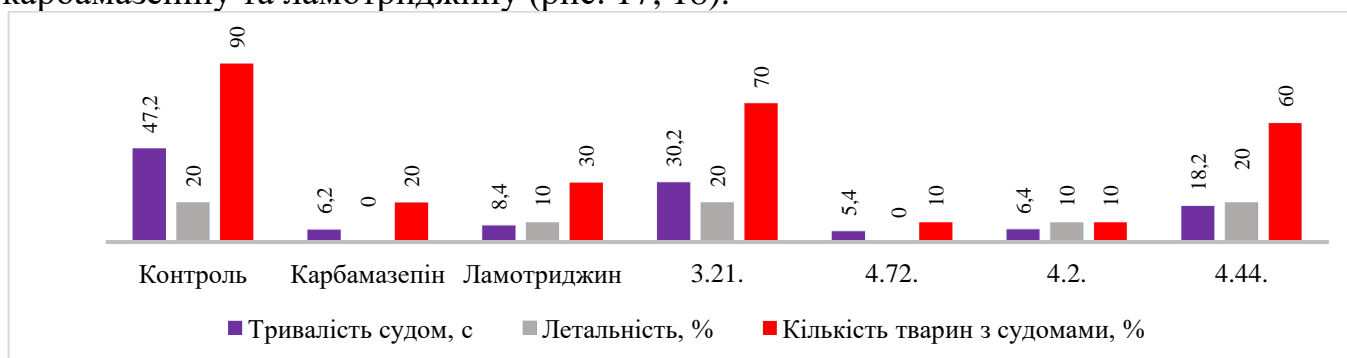


Рис. 17 Протисудомна активність неконденсованих похідних піримідину на моделі МЕШ

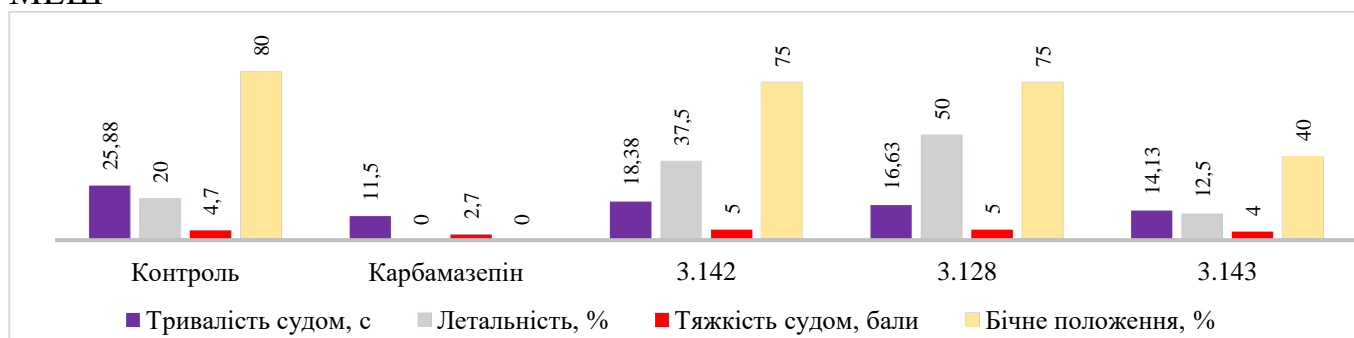


Рис. 18 Протисудомна активність похідних піразолопіримідину на моделі МЕШ

Три сполуки, які виявили ефективність на двох моделях судом, перейшли на наступний етап досліджень – визначення гострої токсичності (рис. 19). Визначити середньосмертельну дозу для піразолопіримідинової похідної не вдалося: введення навіть максимальної дози у 5000 мг/кг не супроводжувалося загибеллю тварин протягом 14 діб з моменту введення.

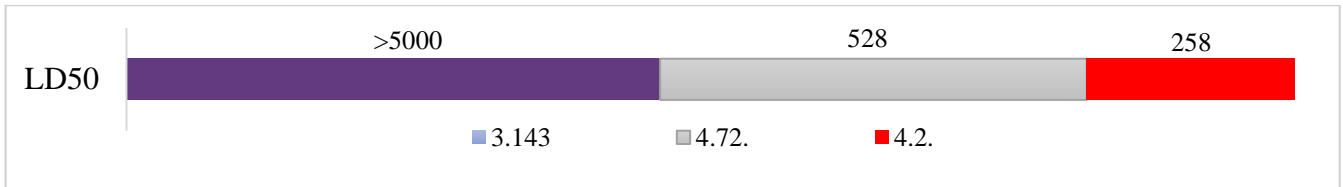


Рис. 19 Результати визначення LD₅₀ трьох «сполук-хітів»

Отже, за класифікацією Hodge и Sterner сполука **4.2** належить до III класу токсичності (помірнотоксичні речовини), **4.72** – до IV класу (малотоксичні речовини), **3.143** – до V класу (практично нетоксичні речовини).

Для наступного етапу досліджень – визначення дозозалежності протисудомного ефекту, впливу на поведінкові реакції та психо-емоційний стан – було відібрано дві сполуки з меншою токсичністю. Для похідної **3.143** виразність протисудомного ефекту дозозалежно зростає і досягає максимуму в дозі 200 мг/кг та 250 мг/кг, що доводить широкий діапазон ефективних доз. Похідна **4.72** найкраще захищала тварин від загибелі в дозі 50 мг/кг, подальше підвищення дози до 60 та 70 мг/кг не спричинило збільшення захисної здатності. За результатами визначення нейротоксичного впливу на моторну функцію піддослідних тварин у тесті стрижня, що обертається, з'ясовано, що похідна **4.72** чинить міорелаксатну активність та порушує координацію рухів (рис. 20).

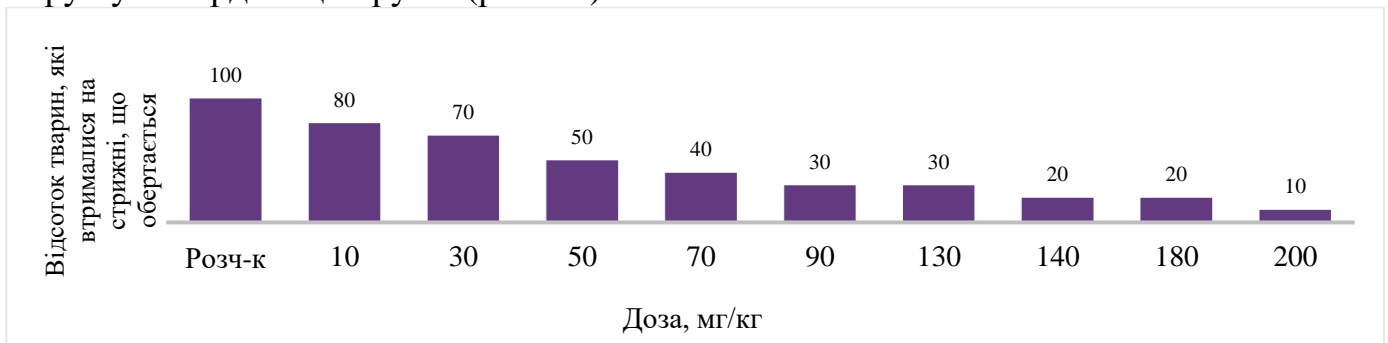


Рис. 20 Вплив похідної **4.72** на тонус м'язів

Натомість похідна **3.143** не впливає на ці показники, про що свідчить відсутність достовірних відмінностей з контролем (рис. 21).

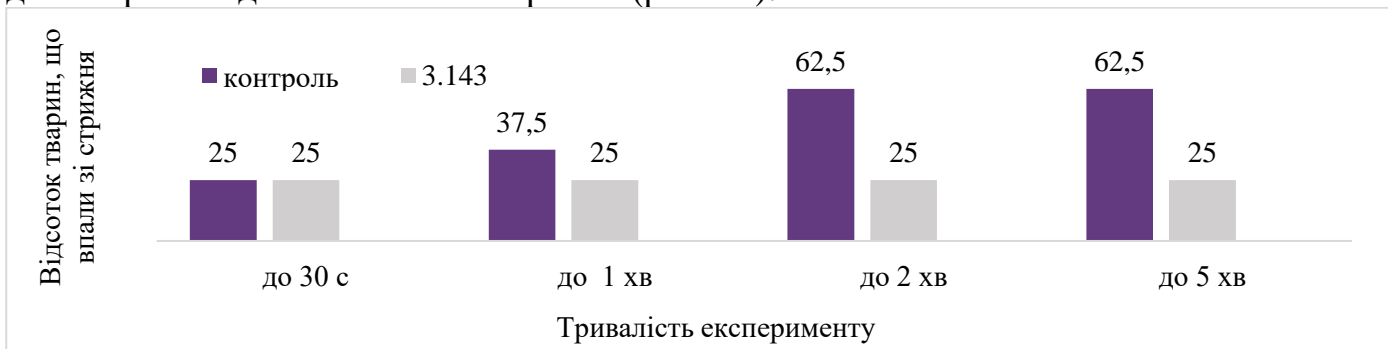


Рис. 21 Вплив похідної **3.143** на тонус м'язів

Під час дослідження впливу сполук на психоемоційний стан у тесті «відкрите поле» з'ясовано, що похідна **4.72** виявляє тенденцію до седатції, а **3.143** – має слабкий седативний ефект (рис. 22, 23).

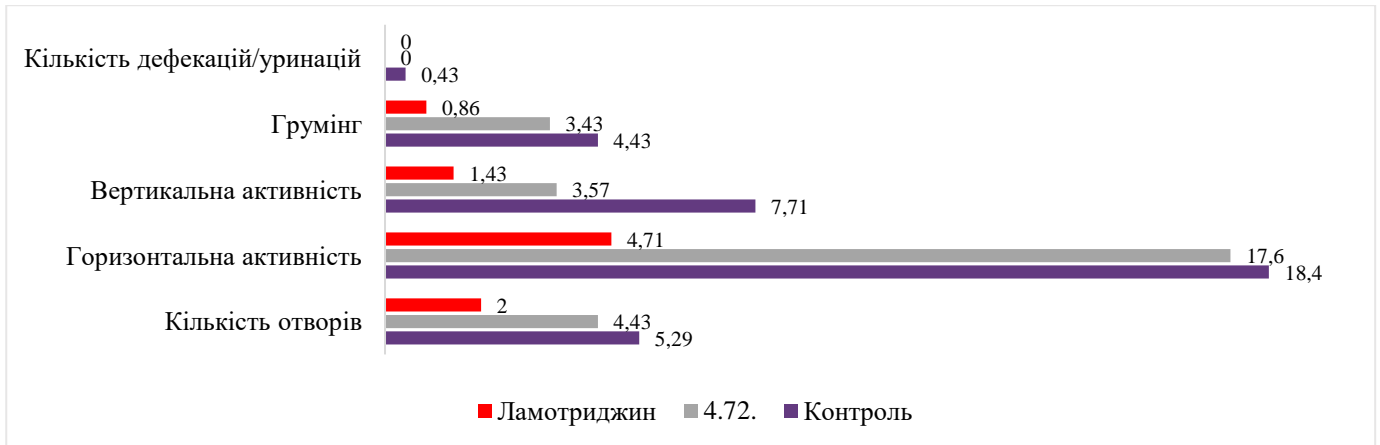


Рис. 22 Вплив 4.72 на психоемоційний стан

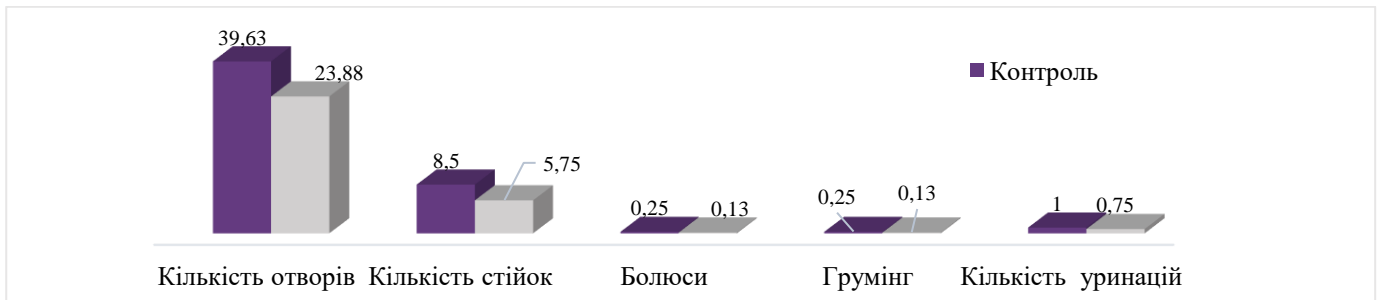
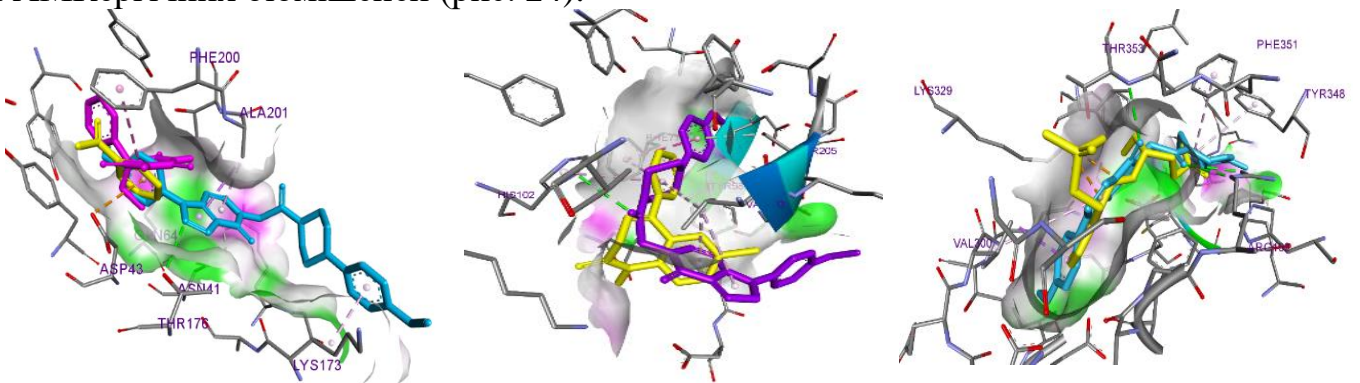


Рис. 23 Вплив похідної 3.143 на психоемоційний стан

За одержаними результатами більш сприятливий фармакологічний профіль як перспективного ПЕП має похідна **3.143** – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил)-піразоло[3,4-d]піримідин-4-он, яку обрано «сполукою-лідером» та присвоєно кодову назву «Епімідин».

Для визначення спектра протисудомної дії епімідину та можливих механізмів її реалізації проведено *in vivo* дослідження на моделях судом із різним патогенезом. Кожному етапу передувало прогнозування активності за результатами докінгу до відповідних біомішеней для визначення кореляцій. З метою визначення детального рецепторного механізму реалізації ефекту епімідину на RTZ-моделі судом проаналізовано конформаційне розміщення в активних сайтах та виявлено афінність до ГАМКергічних біомішеней (рис. 24).



ГАМК_A, ПАМ бензамідин (жовтий), ФБ (фіолетовий), епімідин (блакитний)

ГАМК_A, сайт БЗД, діазепам (жовтий), епімідин (фіолетовий)

ГАМК_A, інгібітор вігабатрин (жовтий), епімідин (блакитний)

Рис. 24 Конформаційне розміщення епімідину в ГАМКергічних біомішенях

Визначено, що найбільш вірогідною є реалізація ефекту через інгібування ГАМК-амінотрансферази – енергія зв'язування становить $-10,0$ ккал/моль проти $-8,4$ ккал/моль у нативного ліганду вігабатрину, а також виявлено помірну позитивну алостеричну модуляцію БЗД сайту ГАМК_A рецептора – енергія зв'язування $-8,7$ ккал/моль проти $-9,94$ ккал/моль у діазепаму. Модуляція ГАМК_A рецептора через сайт ПАМ бензамідину не можлива.

Модуляція ГАМК_A рецептора епімідину через бенздіазепіновий сайт викликає конформаційні зміни білкової молекули та може перешкодити фіксації у порі каналу іншого конвульсantu пікротоксину, тому вірогідним є і помірний прояв активності на пікротоксिनній моделі судом. Це припущення було підтверджено в експерименті *in vivo* (рис. 25): епімідин виявив помірний антагонізм до пікротоксину за відносно низької дози конвульсantu, помірно полегшуючи перебіг судом.

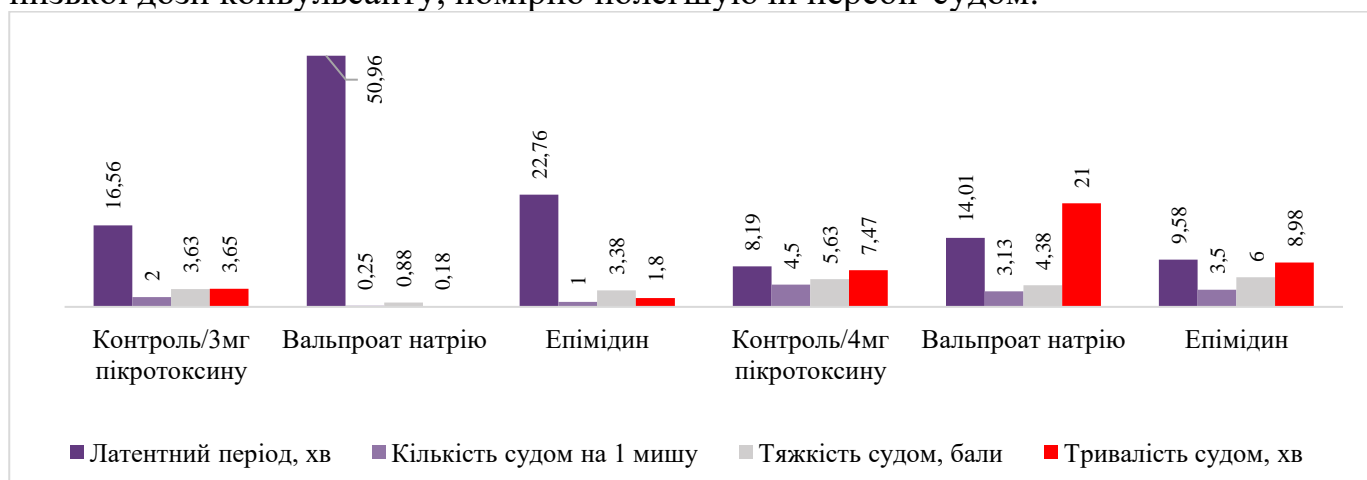


Рис. 25 Вплив епімідину на судом, індуковані пікротоксином

Прогноз активності епімідину на стрихніновій моделі судом здійснено докінгом в активний сайт Gly рецептора (PDB ID 5VDH) відносно конформаційного розміщення ПАМ івермектину, бо хемотоксин стрихнін є потужним селективним антагоністом постсинаптичних рецепторів гліцину. Розрахований рівень афінитету епімідину до GlyR ($-8,9$ ккал/моль,) поступається значенню енергії зв'язування нативного ліганду ($-10,4$ ккал/моль). Однак відповідність більшості зв'язків між епімідином та амінокислотними залишками експериментально визначеного активного сайту залишає незначну вірогідність прояву позитивної алостеричної модуляції GlyR (рис. 26).

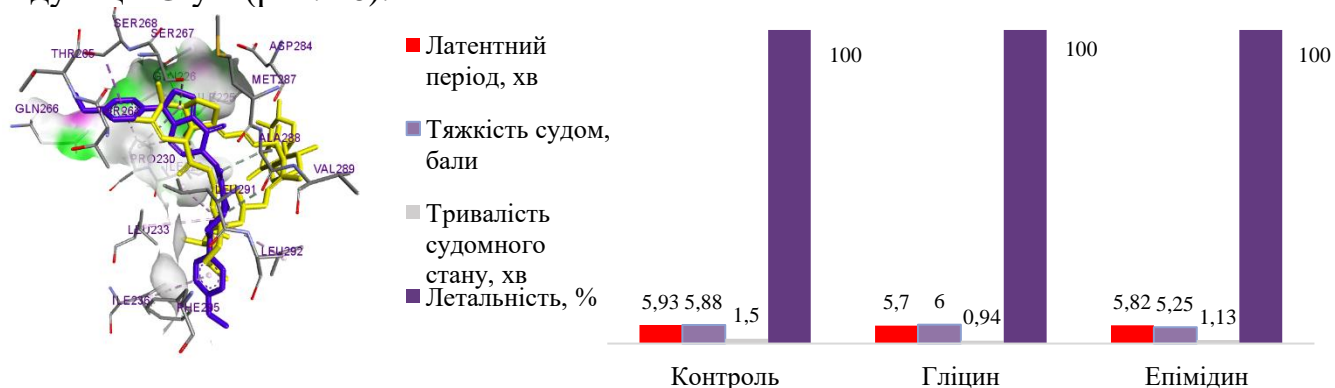


Рис. 26 Докінг епімідину до GlyR та дані *in vivo* експерименту на моделі стрихнінових судом

Результати дослідження на стрихніновій моделі судом підтвердили прогноз: визначено слабкий антагонізм зі стрихніном за показником достовірного зменшення тяжкості судом на 12,5 %. Отже, доведено незначну роль гліцинергічного механізму в реалізації протисудомного ефекту.

Для прогнозування активності епімідину на моделі тіосемікарбазид-індукованих судом використано оцінку інгібувальної здатності до амінотрансферази BCAT (PDB ID 2COI), щодо нативного ліганду – габапентину (рис. 27). Енергія зв'язування становила лише -3,1 ккал/моль проти -7,6 ккал/моль у габапентину, а візуалізація конформаційного розміщення в активному сайті з високою вірогідністю свідчить, що епімідин запобігати розвиткові тіосемікарбазидових судом не зможе. Це було підтверджено в *in vivo* експерименті, а отже, на утворення ГАМК із глутамату епімідин, очевидно, не впливає.

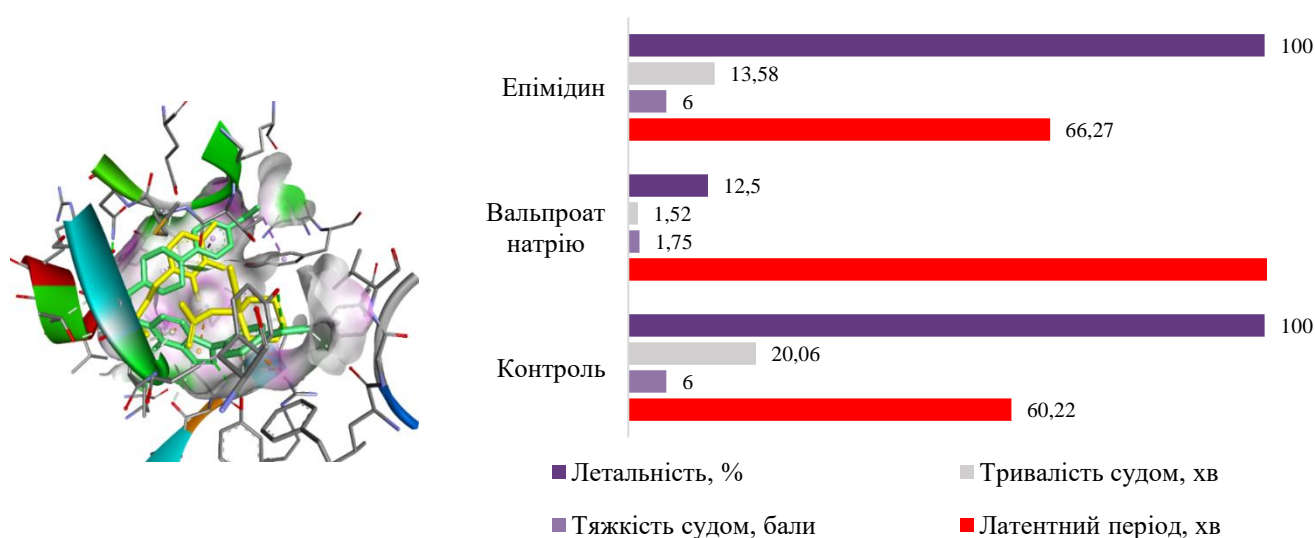


Рис. 27 Докінг епімідину до BCAT та показники протисудомної активності на тіосемікарбазид-індукованій моделі

Для прогнозування активності на моделі кофеїнових судом та визначення ролі аденозинергічної ланки в протисудомній активності епімідину використали докінг у аденозинові рецептори людини типу A_2A , сайт високоселективного інгібітора ZM241385 – 4-(2-[7-аміно-2-(2-фурил)-[1,2,4]триазол[2,3-а][1,3,5]триазин-5-іламіноетил)фенол (PDB ID 3EML). Спрогнозовано високу ступінь афінності до A_2A – енергія зв'язування епімідину склала -7,9 ккал/моль, що майже відповідає значенню нативного ліганда (-8,2 ккал/моль), а просторове розміщення та характер взаємодій з амінокислотними залишками активного сайту доводять можливий антагонізм до кофеїну. В експерименті *in vivo* верифіковано аденозинергічний механізм протисудомної активності через виразний антагонізм з кофеїном – достовірне зменшення летальності на 75 % та інших показників протисудомної дії (рис. 28).

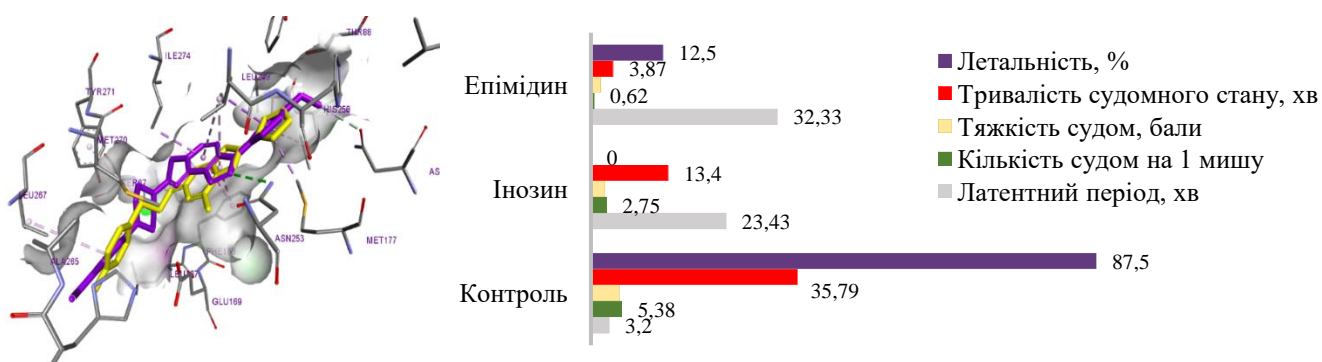


Рис. 28 Докінг епімідину до рецепторів A_2A та показники протисудомної активності на кофеїн-індукованій моделі

Прогноз активності епімідину на моделі хронічної епілепсії PTZ-кіндлінгу здійснено докінгом у пресинаптичні метаботропні рецептори глутамату III групи 8 типу, сайт агоніста 3,4-дикарбоксифенілгліцину (DCPG, PDB ID 6E5V), а також у постсинаптичні іонотропні NMDA-рецептори глутамату, активний сайт антагоніста гліцину – ТК-40 (PDB ID 4KFQ) (рис. 29). Спрогнозовано високу вірогідність модуляції рецепторів mGlu8 (скорингова функція -9,2 ккал/моль проти -7,6 ккал/моль у референс-препараті), а також можливий антагонізм до іонотропних NMDA-рецепторів глутамату (скорингова функція -9,6 ккал/моль проти -7,8 ккал/моль у ТК-40, -7,0 ккал/моль фелбамату).

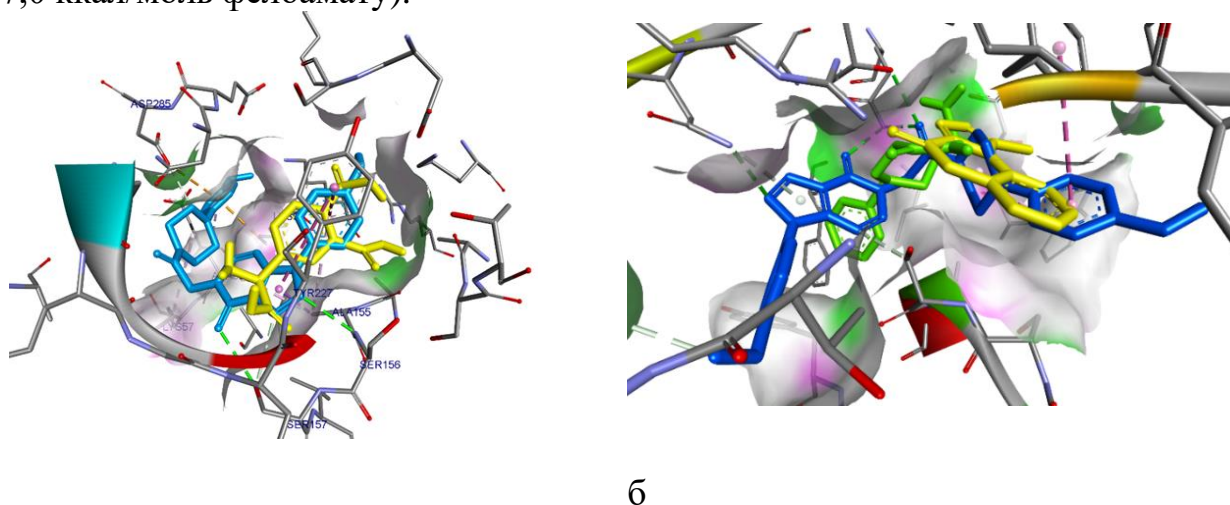


Рис. 29 Конформація епімідину в активному сайті а) рецептора mGlu8 – епімідин (блакитний), DCPG (жовтий); б) NMDA-рецепторах глутамату – епімідин (синій), ТК-40 (жовтий), фелбамат (зелений)

В умовах хронічного епілептогенезу епімідин чинить виразний захисний ефект та перевищує препарат порівняння вальпроат натрію – латентний період появи перших судом подовжується на 5 діб (рис. 30). Одержані дані протисудомної ефективності на кіндлінговій моделі доводять як правильність прогностичних біомішеней, так і цінність епімідину як потенційного ПЕП. У хронофармакологічному дослідженні виявлено чіткий синусоїдний характер протисудомної активності епімідину з посиленням уночі та вдень за рахунок достовірного зменшення тяжкості судом та летальності.

розміщення щодо референс-ліганду, зіставлення результатів *in silico* та *in vivo* дозволили побудувати уніфікований алгоритм таргет-орієнтовного пошуку ПЕП (рис. 32). Алгоритм доповнює наявні сьогодні схеми *in vivo* пошуку нових ПЕП з поетапним використанням скринінгових моделей щодо виду епілептичного нападу та з методиками молекулярного докінгу. Це дозволяє передбачити активність на тій чи іншій моделі судомного нападу та оцінити доцільність їх проведення. Застосування алгоритму підтримує етичні норми використання піддослідних тварин, дозволяє раціоналізувати *in vivo* експеримент, а також передбачити вірогідний механізм реалізації протисудомного ефекту.

Сучасна концепція створення інноваційних ПЕП полягає не лише в пошуку сполук, які здатні усувати небезпеку судомних нападів, а ще й не порушувати поведінкові реакції, психоемоційний стан, когнітивні здібності, основні механізми пам'яті тощо. Тому поглиблені дослідження епімідину охоплювали вивчення спектра супутніх фармакологічних властивостей. Було визначено такі види активності:

- слабкі антидепресантні властивості в тесті іммобілізованого поведінкового відчаю;
- слабкі анксиолітичні властивості в тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту (достовірне зменшення кількості відвідувань темних рукавів лабіринту та вегетативного супроводу емоційних реакцій більше, ніж у 5 разів);
- потужний ноотропний ефект на моделі скополамінової амнезії (антиамнестична активність склала – 110 %, а критичної навченості досягли 62,5 % тварин);
- потужну анальгетичну активність на моделях з різним генезом – соматичного і вісцерального болю, модель теплової імерсії хвоста та оцтовокислих корчів, відповідно. Доведено невирішальну роль опіоїдергічного механізму в знеболювальній дії епімідину: налоксон нівелює анальгетичний ефект на моделі теплової імерсії хвоста, проте не впливає на цей ефект на моделі оцтовокислих корчів. Виявлено, що важливим механізмом анальгетичного ефекту епімідину є модуляція адренергічних процесів – стимуляція α_2 -адренорецепторів і блокади β -адренорецепторів;
- виявлено відсутність опіоїдергічних механізмів протисудомної дії епімідину: антиконвульсивний ефект на тлі введення налоксону не змінюється;
- визначено відсутність адиктивного потенціалу за курсового застосування епімідину;
- доведено відсутність взаємодії з нейротропною речовиною пригнічувального типу (етаноловим спиртом), тобто епімідин не посилює дію депримувальних речовин;
- не виявлено антигіпоксичних властивостей (модель нормобаричної гіпоксії).

Отже, визначено виразні протисудомні властивості епімідину та широкий спектр їх реалізації із залученням різноманітних нейромедіаторних механізмів антиконвульсивної дії. Мультитаргетність механізму є сприятливою та бажаною особливістю нового ПЕП, бо дозволяє прогнозувати клінічну ефективність за різних форм судомних нападів, а сприятливий супутній фармакологічний профіль доводить перспективність епімідину як нового АФІ з протисудомним ефектом.

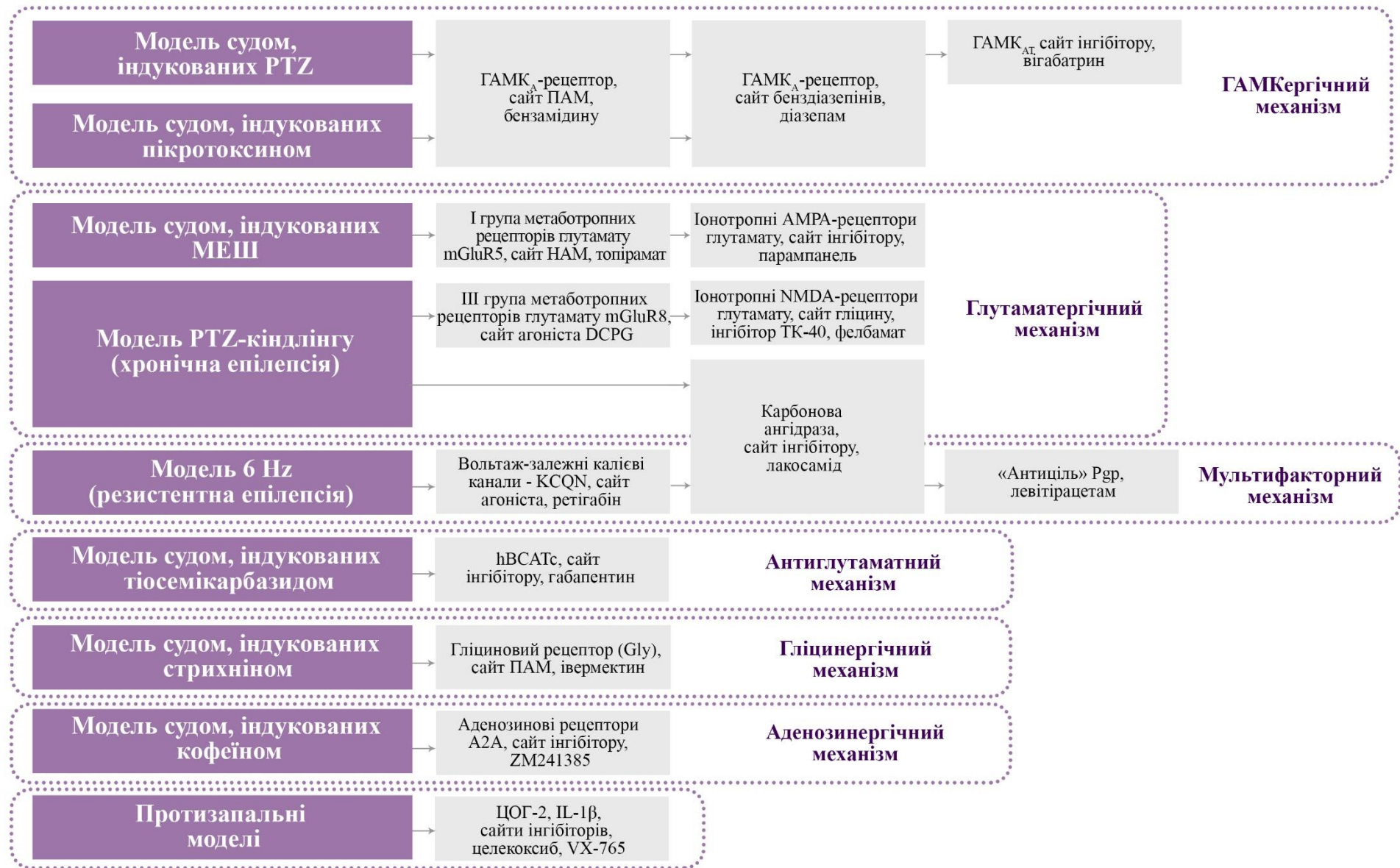
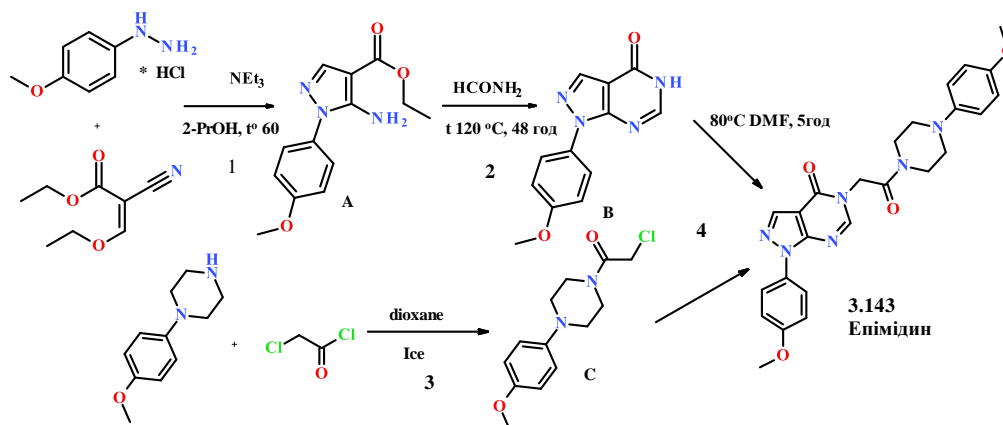


Рис. 32 Алгоритм таргет-орієнтованого пошуку сучасних ПЕП: взаємозв'язок «біомішень – референс-ліганд – конформаційне розміщення ліганда – скринінгова модель – механізм реалізації активності»

Розділ 6. Масштабування методики синтезу потенційного АФІ епімідину і розробка методик контролю якості. Доклінічні дослідження визначили перспективність епімідину як потенційного АФІ, що зумовило необхідність подальшої фармацевтичної розробки. Дослідження з модифікації та масштабування методики синтезу епімідину проводили на базі департаменту з виробництва АФІ АТ «Фармак». Лабораторна методика синтезу відбувалася відповідно до схеми 9 та складалася з чотирьох етапів.

Схема 9



Корективи було внесено з урахуванням принципів «зеленої хімії» та виробничих потужностей. Перший етап – одержання продукту А: замінено токсичний триетиламін на безпечний натрій карбонат. Час та умови проведення реакції були ідентичними. Другий етап синтезу – одержання продукту В: змінено температурний режим проведення реакції конденсації зі 120 °С до 170 °С, що дозволило скоротити час проведення реакції до 6 годин, а також замінено ізопропанол, що використовували для розведення реакційної суміші і для осадження цільового продукту, на суміш етанол/вода, що є більш економічно вигідно. Третій етап – одержання продукту С, що потребував копіткого процесу й роботи з токсичними і подразнювальними реагентами. Після оцінювання всіх факторів доцільності було прийнято рішення скоротити 3 етап синтезу, а для синтезу використовувати комерційний зразок 2-хлоро-1-[4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл]-етанону. Четвертий етап – одержання епімідину: скорочено час проведення реакції з 5 до 2 годин та знижено температурний режим з 80 до 50 °С завдяки додаванню каталітичної кількості калій йодиду; ізопропанол для розведення замінено на етанол. Для масштабованої та модифікованої методики синтезу епімідину розроблено технологічну схему виробництва.

З огляду на модифіковану під умови промислового виробництва методику синтезу виникла необхідність регламентації технології очищення субстанції, а також визначення оптимального ступеня дисперсності частинок, що може вплинути на прояв активності. Для зменшення собівартості процесу синтезу в промислових умовах як розчинник для очищення епімідину було запропоновано використання безводного етилового спирту, однак після дослідження розчинності та змочуваності субстанцій, кристалізованих з різних розчинників, а також дослідження їх на РТЗ-моделі судом, було визначено, що більш сприятливим для прояву активності розчинником для кристалізації є ізопропанол. Також в *in vivo* експерименті доведено

значну залежність ефекту від дисперсності сполуки та виявлено, що оптимальною є мікронізація кристалів до $\leq 0,1$ мкм.

Наступним етапом стала розробка методик контролю якості субстанції. Вибір параметрів стандартизації епімідину ґрунтувався винятково на вимогах ДФУ. Для досліджень було використано зразок епімідину після подвійної кристалізації, чистоту та індивідуальність якого підтверджено інструментальними методами аналізу – ^1H ЯМР-спектроскопією та хромато-мас-спектрометрією. Експериментально підтверджено можливість ідентифікації епімідину реакцією з загальноалкалоїдними реактивами. З фізичних та фізико-хімічних методів використано визначення температури плавлення, УФ та ІЧ-спектроскопія. Як виробничі сторонні домішки в субстанції рекомендовано визначати важкі метали й залізо, хлориди, а також проводити тест на залишкову кількість органічних розчинників (ДМФА, ізопропанол). Потенційними супровідними домішками визначено напівпродукти синтезу етил 5-аміно-1-(4-метоксифеніл)-1*H*-піразоло-4-карбоксилат (домішка А), 1-(4-метоксифеніл)-піразоло[3,4-*d*]піримідину-4-он (В) та 2-хлоро-1-[4-(4-метоксифеніл)-піперазин-1-іл]-етанон (С) (схема 9). Для їх визначення розроблено методику ВЕРХ. У розробці методики використано РСО епімідину. Дослідження проводили за довжини хвилі 240 нм, рухома фаза: суміш метанолу та розчину фосфатного буфера з триетиламіном, доведеним до рН 7,0 з програмою градієнтного елювання. Хроматограму для перевірки придатності хроматографічної системи наведено на рис. 33. В умовах методики визначенню домішок не заважають ані розчинник, ані рухома фаза, ані основна речовина, що свідчить про специфічність методики. На хроматограмі досліджуваного розчину визначено домішку В – 9,073 (0,64), домішку С – 10,969 (0,77) та епімідин – 14,160 (1,00), тоді як домішку А в досліджуваній субстанції не виявлено. Також на хроматограмі визначено 4 неідентифіковані домішки з такими часами утримання: домішки 1 – 7,687 (0,54), 2 – 12,555 (0,89), 3 – 15,652 (1,11), 4 – 17,267 (1,21). У досліджуваному розчині виявлено супровідні специфіковані та ідентифіковані домішки синтезу В та С в сумі 0,13% (критерій прийнятності не перевищує поріг кваліфікації – $\leq 0,15\%$), чотири неспецифіковані неідентифіковані домішки, кількісний вміст кожної з яких не перевищує 0,1%. Сума всіх супровідних домішок становить 0,33%, що відповідає вимогам ДФУ.

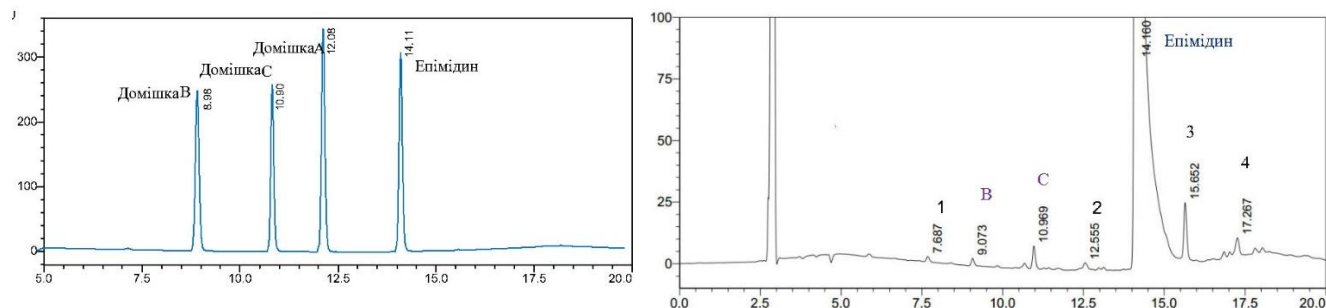


Рис. 33 Хроматограма перевірки придатності хроматографічної системи та випробовуваного розчину епімідину

Субстанцію епімідину методом ВЕРХ дослідили на стабільність в умовах прискореної деградації (стресові умови) – висока температура, кислотне та лужне розкладання, перекисне окиснення. З'ясовано, що субстанція є досить стійкою до

температурного розкладання, що дозволяє зберігання її за кімнатної температури. Для кількісного визначення субстанції розроблено метод визначення азоту в органічних сполуках після мінералізації сірчаною кислотою (ДФУ, стаття 2.5.9), для подальшої фармацевтичної розробки – метод ВЕРХ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення наукової проблеми таргет-орієнтованого пошуку ЦНС-агентів в ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону. За результатами молекулярного моделювання, синтезу та визначення протисудомної активності методами *in silico* та *in vivo* вперше обґрунтовано вибір біомішеней для молекулярного докінгу з метою прогнозування активності на скринінговій моделі визначення протисудомної активності відповідно до механізму її реалізації, а також доведено кореляцію між *in silico* та *in vivo* експериментальними даними. Виявлено потенційний інноваційний АФІ – епімідин.

1. Сформовано загальний дизайн таргет-орієнтованого пошуку потенційних ЦНС-агентів, проаналізовано наявні сьогодні біомішені ЦНС, обґрунтовано вибір головного скафолду та з урахуванням принципів фармакофорної моделі пошуку ПЕП сконструйовано віртуальну базу ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4(3*H*)-ону та піримідин-2(4)-тіону

2. Методом молекулярного докінгу до активних сайтів позитивних алостеричних модуляторів – бензамідину та діазепаму – ГАМК_A рецептора та інгібітора ГАМК-амінотрансферази – вігабатрину, здійснено ранжування за показниками афінності віртуальної бази сполук та відібрано 14 груп структур-кандидатів для синтезу й подальшого скринінгу на PTZ-моделі судом. Визначено сприятливі параметри АДМЕТ для досліджуваних лігандів.

3. Одержано 2-алкіл/арил-5,6-R¹,R²-піримідин-4(3*H*)-они та з'ясовано, що регіоселективність їх алкілування 2-хлорацетамідами залежить від замісника у 2 положенні та умов проведення реакції: 2-алкілпохідні піримідин-4(3*H*)-ону в середовищі діоксан/NaHCO₃ утворюють N-ацетамідні похідні; 2-арилпохідні в аналогічних умовах – суміш N-та O-продуктів, а в ДМФА/K₂CO₃ – індивідуальні N-ацетаміди; у разі алкілування 2-арилпохідних хлорацетатною кислотою та її естером у діоксані/NaHCO₃ утворюються тільки продукти O-алкілування. Напрямок алкілування достовірно доведено ¹H, ¹³C ЯМР та NOESY-спектроскопією, індивідуальність – LC/MS-аналізом.

4. Розроблено методики одержання та структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-R-піримідину, що дозволило отримати серії нових 4-гідразиніл-, 4-арилпіперазиніл-2-метил/арил-6-R-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та -амінопропіонову кислоти. Синтезовано похідні 2-ариламіно-, 2-ариліденгідразино- та N-ацетил/бензоїлгідразино-6-метилпіримідин-4(3*H*)-ону з використанням як вихідного інтермедіату 6-метил-2-метилтіопіримідин-4(3*H*)-ону, одержаного конденсацією етил-3-оксобутаноату з тіосечовиною з подальшим метилюванням диметилсульфатом або метилйодидом.

5. Синтезовано похідні 1-арилпіразоло[3,4-*d*]піримідин-4-они взаємодією відповідного фенілгідразину гідрохлориду та етилтоксиметиленціаноцетату з подальшою конденсацією одержаного етил 5-аміно-1-арилпіразол-4-карбоксилату з формамідом. Методами ^1H ЯМР-спектроскопії та РСА доведено, що алкілювання 2-хлорацетамідами в середовищі ДМФА/ NaHCO_3 відбувається за атомом нітрогену у 5 положенні циклу піразолопіримідинового циклу.

6. Виявлено, що за взаємодії 6-метил-2-тіоксопіримідин-4(1*H*)-ону з заміщеними фенацилбромідами в середовищі ДМФА/ K_2CO_3 як за нагрівання, так і за кімнатної температури утворюється суміш 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3*H*)-ону та 3-гідрокси-3-арил-7-метил-2,3-дигідро-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-5-ону; подальше витримування в кислоті сульфатній призводить до циклізації та утворення похідних 3-арил-7-метил-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]піримідин-5-ону. Індивідуальні S-алкіловані похідні – 2-(2-арил-2-оксоетил)тіо-6-метилпіримідин-4(3*H*)-они одержано під час проведення реакції в метанолі в присутності натрій метилату.

7. Конденсацією тіосечовини з етилціаноацетатом у середовищі етилового спирту в присутності натрій етилату одержано 6-аміно-2-тіоксопіримідин-4(3*H*)-он, а конденсацією з ацетилацетоном у присутності соляної кислоти – 4,6-диметил-2-тіопіримідин; 2-метил/арил-6-*R*-піримідин-4-тіони одержано взаємодією відповідних 4-оксопіримідинів з пентасульфідом фосфору в піридині. S-ацетамідні похідні одержано в умовах алкілювання 2-хлорацетамідами у ДМФА в присутності калій карбонату або триетиламіну.

8. За результатами системного вивчення антиконвульсантної активності 150 синтезованих похідних піримідин-4-ону та -2(4)-тіону на моделі PTZ-судом у порівнянні з фенобарбіталом та вальпроатом натрію виявлено ряд структурних особливостей кореляції «структура – протисудомна дія». Загалом похідні піримідин-2(4)-тіону проти їх оксопіримідинових аналогів продемонстрували більш високі та стабільні показники протисудомної активності на зазначеній моделі. Відібрано сім «сполук-хітів» для поглиблених досліджень.

9. Доведено співмірність результатів молекулярного докінгу в активні сайти інгібіторів метаботропних mGlu5 та іонотропних AMPA-рецепторів глутамату (перампанель) та *in vivo* експериментальних даних у тесті МЕШ-індукованих судом: проти карбамазепіну та ламотриджину три сполуки із семи досліджуваних виявили ефективність на моделі МЕШ. Для них було визначено гостру токсичність: LD_{50} сполуки **4.2** складає 258 мг/кг, **4.72** – 522 мг/кг, **3.143** – >5000мг/кг за класифікацією Hodge и Sterner III, IV та V клас токсичності відповідно.

10. Для двох сполук з меншою токсичністю досліджено дозозалежність протисудомного ефекту та вплив на локомоторну активність і психоемоційний стан: **4.72** – чинить міорелаксантну активність та порушує координацію рухів, виявляє тенденцію до седації; **3.143** – не чинить міорелаксантної дії, виявляє слабкий седативний ефект. За показниками фармакологічного профілю «сполукою-лідером» обрано **3.143** – 1-(4-метоксифеніл)-5-(2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил)-піразоло[3,4-*d*]піримідин-4-ону (Епімідин).

11. Визначено широкий спектр протисудомної дії епімідину та мультифакторний механізм його реалізації:

- потужний антагонізм з PTZ та помірний антагонізм з пікротоксином – стимулювання ГАМКергічних механізмів за рахунок інгібування ГАМК_{AT} та позитивної алостеричної модуляції бенздіазепінового сайту ГАМК_Aрецептора;
- потужний антагонізм з кофеїном – модуляція аденозінергічної ланки через конкурентне інгібування A²A рецепторів;
- потужна активність на моделі PTZ-кіндлінгу перевищує референс-препарат вальпроат натрію – через модуляцію пресинаптичних глутаматних рецепторів III групи mGlu8 та антагонізму до іонотропних NMDA-рецепторів;
- помірна активність на МЕШ-моделі судом – глутаматергічний механізм через інгібування іонотропних AMPA-рецепторів;
- слабка активність на стрихнін-індукованих судамах – слабкий гліцинергічний механізм через інгібування Gly-рецепторів.

Виявлено протизапальні властивості епімідину як важливої супутньої ланки запобігання епілептогенезу.

За результатами експериментальних даних сформовано уніфікований алгоритм раціонального пошуку ПЕП, що складається з поетапного використання докінгових досліджень та скринінгових *in vivo* моделей і ґрунтується на взаємозв'язку «біомішень – референс-ліганд – конформаційне розміщення ліганду – скринінгова модель – механізм реалізації активності».

12. Визначено сприятливий профіль супутніх властивостей епімідину: потужна ноотропна дія, слабкий седативний і анксиолітичний ефекти, відсутність депресогенної активності та потенціювання дії депримувальних речовин (етанолу), потужна анальгетична активність на моделях соматичного і вісцерального болю, відсутність адиктивного потенціалу та опіоїдергічного механізму в реалізації антиконвульсивної дії епімідину.

13. Модифіковано методику синтезу субстанції епімідину відповідно до промислових умов та принципів «зеленої хімії», розроблено технологічну схему виробництва. Вивчено вплив біофармацевтичних аспектів на прояв протисудомної активності та визначено оптимальну дисперсність епімідину – мікронізація кристалів $\leq 0,1$ мкм, а найбільш сприятливим розчинником для кристалізації є ізопропанол.

14. Розроблено методики ідентифікації субстанції епімідину хімічними та фізико-хімічними методами. Розроблено методику визначення супровідних домішок методом ВЕРХ та досліджено стабільність субстанції епімідину в стресових умовах. Виявлено стійкість до температурного розкладання, що дозволяє зберігати субстанцію епімідину за кімнатної температури. Розроблено методики кількісного визначення методом виявлення азоту в органічних сполуках та методом ВЕРХ.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Северіна Г. І., Скупа О. О., Георгіянец В. А. Синтез, фізико-хімічні властивості та прогноз фармакологічної активності нових похідних 2-ізопропіл-5,6-R-піримідин-4(3H)-ону. *Фармацевтичний журнал*. 2012. № 3. С. 54–59. (Особистий внесок – брала участь у формуванні цілей та завдань дослідження, проведенні синтетичних досліджень, аналізі результатів та формулюванні висновків).

2. Северіна Г. І., Скупа О. О., Георгіянц В. А. Синтез і прогноз біологічної активності нових N-арил-4-(2,6-R-піримідин-4-тіо)ацетамідів. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2012. Т. 10, № 1 (37). С. 41–45. (Особистий внесок – постановка проблематики статті, планування та проведення експерименту, узагальнення результатів та підготовка статті).
3. Северіна Г. І., Скупа О. О., Георгіянц В. А. Синтез і дослідження протисудомної активності 2,6-заміщених похідних 4-гідразинілпіримідину. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2012. Вип. 21, кн. 4. С. 465–469. (Особистий внесок – брала участь у плануванні та здійсненні експериментального дослідження, обробленні результатів та підготовці публікації до друку).
4. Severina A. I., Skupa O. O., Georgiyants V. A. Synthesis of 2,6-substituted 4-(n-aryl)piperazin-1-yl)pyrimidines as potential anticonvulsant. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2012. № 1-2 (14-15). С. 115–119. (Особистий внесок – брала участь у плануванні експерименту, розробленні та апробації методики синтезу, аналізі результатів та підготовці статті).
5. Северина А. И., Скупая О. О., Георгиянц В. А., Волощук Н. И. Скрининг противосудорожной активности новых производных пириимидин-4(3H)-она. *Медицина и образование в Сибири : электронный науч. журн.* 2013. № 3. URL: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/annotacy_full.php?id=1034 (дата обращения: 26.01.2021). (Особистий внесок – постановка завдань та планування експерименту, літературний пошук, оброблення результатів та підготовка статті до друку).
6. Severina A. I., Georgiyants V. A., Shtrygol S. Yu., Kavraiskyi D. P. Synthesis and alkylation of 1-4-aryl-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ones as possible anticonvulsant agents. *Der Pharma Chemica*. 2015. Vol. 7 (11). P. 43–48. (Scopus, Q4). (Особистий внесок – планування експерименту, розроблення та апробація методик синтезу, інтерпретація результатів експерименту та підготовка статті до друку).
7. Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А., Северіна Г. І. Скринінгове дослідження нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на протисудомну активність. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 3 (49). С. 16–20. (Особистий внесок – брала участь у плануванні та здійсненні експериментального дослідження, літературному пошуку, обробленні результатів та додрукарській підготовці рукопису).
8. Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А., Северіна Г. І. Експериментальне вивчення спектру протисудомної активності нових похідних піразоло[3,4-D]піримідин-4-ону. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2016. № 1 (1). С. 10–17. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2016.70528>. (Особистий внесок – брала участь у здійсненні експериментального дослідження, узагальненні результатів та підготовці публікації).
9. Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Цивунін В. В., Штриголь Д. В., Северіна Г. І., Георгіянц В. А. Перспективний антиконвульсант 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4H-піразоло[3,4-d]піридин-4-он має протизапальну та знеболювальну активність та позбавлений адиктивного потенціалу. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2016. Т. 11,

- № 3. С. 52–62. (*Особистий внесок* – планування експерименту, участь в експериментальних дослідженнях, обговоренні результатів, оформленні статті).
10. Severina A. I., Georgiyants V. A., Shtrygol S. Yu., Kavraiskyi D. P. Synthesis of N-substituted derivatives of 1-(4-methoxyphenyl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one as potential anticonvulsants. *Scripta scientifica pharmaceutica*. 2016. Vol. 3, № 2. P. 36–40. (*Особистий внесок* – планування експерименту, розроблення та реалізація методик синтезу, інтерпретація даних, підготовка статті до друку).
 11. Severina A. I., Kavraiskyi D. P., Kovalevska I. V., Shtrygol S. Yu., Ruban E. A., Georgiyants V. A. Dependence of anticonvulsant activity of 1-aryl-1, 5-dihydro-4H-pyrazole (3,4-d) pyrimidine-4-one derivatives on biopharmaceutical factors. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2017. Vol. 6, № 7. P. 1552–1559. (*Особистий внесок* – планування експерименту, участь у проведенні мікроскопічних досліджень, оброблення результатів та підготовка статті до друку).
 12. Kushniruk V. M., Severina A. I., Georgiyants V. A. Standardization of the Active Pharmaceutical Ingredients Industrial Synthesis Technology. *Acta Chim Pharm Indica*. 2017. Vol. 7 (2). P. 1–11. (*Особистий внесок* – планування експерименту, літературний пошук, конструювання алгоритму та підготовка статті до публікації).
 13. Severina H., Skupa O., Khairulin A., Voloshchuk N., Georgiyants V. Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-thioхo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one acetamides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019. Vol. 9 (02). P. 012–019. (Q2, Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, проведення експериментальних синтетичних досліджень, оброблення результатів та підготовка статті до друку).
 14. Severina H. I., Skupa O. O., Voloshchuk N. I., Suleiman M. M., Georgiyants V. A. Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-((2-oxo-2-arylethyl)thio)pyrimidin-4(3H)-one derivatives and products of their cyclization. *Pharmacia*. 2019. Vol. 66, № 3. P. 141–146.) (Q2, Web of Science, Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн експерименту, здійснення синтетичних досліджень, аналіз та інтерпретація результатів, формулювання висновків та оформлення статті).
 15. Severina H., Voloshchuk N., Saidov N., Georgiyants V. Design, synthesis, molecular docking and anticonvulsant evaluation of 6-methyl-2-arylaminopyrimidin-4(3H)-one. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020. № 2 (24). P. 9–17. (Q2, Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, проведення експериментальних докінгових та синтетичних досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка статті до друку).
 16. Severina H. I., Skupa O. O., Voloshchuk N. I., Saidov N., Bunyatyan V. A., Kovalenko S. M., Georgiyants V. A. Molecular docking, ADMET study and in vivo pharmacological research of N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[2-methyl-6-(pyridine-2-yl)-pyrimidin-4-yl]thio} acetamide as a promising anticonvulsant. *Research Results in Pharmacology*. 2020. № 6 (2). P. 27–41. (Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, проведення експериментальних докінгових та синтетичних досліджень, оброблення та інтерпретація результатів, підготовка статті до друку).
 17. Severina H., Bezruk I., Ivanauskas L., Georgiyants V. Development of hplc method for quantitative determination of Epimidin - new perspective APhI with anticonvulsive activity. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020. № 3 (25). P. 4–11. (Scopus).

(*Особистий внесок* – планування експерименту, оброблення та інтерпретація результатів, підготовка статті до друку).

18. Severina H. I., Skupa O. O., Voloshchuk N. I., Georgiyants V. A. Synthesis, docking study, and pharmacological evaluation of S-acetamide derivatives of 4,6-dimethyl-2-thiopyrimidine as anticonvulsant agents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2020. Vol. 10, № 07. P. 001–008, (Q2, Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, проведення експериментальних докінгових та синтетичних досліджень, оброблення та інтерпретація результатів, підготовка статті до друку)
19. Severina H. I., Skupa O. O., Voloshchuk N., Khairulin A. R., Georgiyants V. A. Design, synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of derivatives of 6-amino-4-hydroxy-2-thio-pyrimidine. *АСТА Pharmaceutica Scientia*. 2020. Vol 58, № 3. P. 371–393. (Q3, Scopus). (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, проведення експериментальних докінгових та синтетичних досліджень, оброблення та інтерпретація результатів, підготовка статті до друку).
20. Северіна Г. І., Скупа О. О., Георгіянц В. А., Волощук Н. І. N-(3,4-диметоксифеніл)-2-{{[2-метил-6-(піридин-2-іл)піримідин-4-іл]тіо}ацетамід, що проявляють протисудомну активність : пат. 105242 Україна. № а 201204915 ; заявл. 25.10.2013 ; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8. (*Особистий внесок* – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
21. Северіна Г. І., Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А. 5-R-1-Арил-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-они, що виявляють протисудомну активність : пат. 116226 України. № а 201506662 ; заявл. 06.07.2015 ; опубл. 26.02.2018, Бюл. № 4. (*Особистий внесок* – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
22. Северина А. И., Георгиянц В. А., Штрыголь С. Ю., Каврайский Д. П. Синтез и противосудорожная активность N-замещенных производных 1-(4-метоксифенил-1,5-дигидро-4Н- пиразоло[3,4-D]пиримидин-4-она. *Наука и инновация. Сер. естественных наук*. 2017. № 3. С. 24–26.
23. Harna N. V., Severina H. I., Skupa O. O., Georgiyants V. A. Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-thioxo-2,3 dihydropyrimidin-4(1H)-one derivatives. *ChemCYS 2018 : chemistry conference for young scientists, Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018*. Blankenberge, 2018. P. 95.
24. Северіна Г. І., Георгіянц В. А. Синтез алкілованих похідних 1-(4-бромфеніл)-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону як перспективних антиконвульсантів. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра фармац. наук, проф. О. М. Гайдукевича, м. Харків, 12-13 квіт. 2018 р. Харків : НФаУ, 2018. С. 100.
25. Северіна Г. І., Волощук Н. І., Георгіянц В. А. Визначення протисудомної активності нових похідних 6-метилтіоурацилу. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. І наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 18 жовт. 2018 р. Харків : НФаУ, 2018. С. 199.
26. Severina H. I., Protopopov M. V., Skupa O.O., Perekhoda L. O., Georgiyants V. A. Molecular docking studies of the N-(3,4-dimetoxyphenil)-2-{{[2-methyl-6-(pyridine-2-yl)-

pyrimidin-4-yl]thio}acetamide as inhibitor of gamma aminobutyric acid aminotransferase. *Science and practice 2018* : book of abstracts 9th International Pharmaceutical Conference, Dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, November 9, 2018. Kaunas, 2018. P. 81.

27. Северина А. И., Ель Кайял В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пиримидин- и хиनाзолин-4(3Н)-онов. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
28. Severina H. I., El Kayal W. M., Georgiyants V. A. The algorithm of virtual screening and prediction of the promising anticonvulsants' mechanism of action. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. II наук.-практ. Інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 41–42.
29. Severina H. I., Georgiyants V. A. Synthesis of 6-methyl-2-((2-охо-2-арилетил)тио)пиримидин-4(3Н)-онів та продуктів їхнього циклізації як можливі антиконвульсанти. *Science and practice 2019* : the 10th International pharmaceutical conference, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 110.
30. Северіна Г. І., Безрук І. В., Георгіянц В. А. Розробка методики визначення супровідних домішок у субстанції нового антиконвульсantu – епімідині. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження* : матеріали наук.-практ. дистанційної міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці Університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. С. 138–139.
31. Severina H. I., Bezruk I., Ivanauskas L., Georgiyants V. A. Development of HPLC method for quantitative determination of epimidine - new perspective APhI with anticonvulsive activity. *Проритети фармації и стоматології: от теорії к практике* : сб. матеріалов ІХ Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 118–119.
32. Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А., Северіна Г. І., Каврайський Д. П. Інноваційні перспективи використання 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-*d*]піридин-4-ону як протисудомного засобу: інформ. лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 183. Київ, 2016. 4 с.

За результатами проведених досліджень у період 2011-2016 рр. опубліковано ще 11 тез доповідей на наукових конференціях різного рівня, з бібліографічним описом яких можна ознайомитись у дисертаційній роботі.

АНОТАЦІЯ

Северіна Г. І. Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2021 р.

У роботі висвітлено теоретичне обґрунтування сучасної методології таргет-орієнтованого пошуку ЦНС-агентів у ряду похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону та її експериментальне підтвердження. Розроблено методики одержання та визначено умови для регіоселективного алкілювання похідних піримідин-4-ону, піримідин-2(4)-тіону та 1-арилпіразол[3,4-*d*]піримідин-4-ону. Розроблено методики структурної функціоналізації похідних 4-хлоро-2-метил/арил-6-*R*-піримідину та одержано серії нових 4-гідразино-, 4-арилпиперазино-2-метил/арил-6-*R*-піримідинів, а також 2-(6-метил-2-(4-трифлуорометил)-піримідин-4-іл)аміноацетатну та амінопропіонову кислоти. За результатами молекулярного моделювання, синтезу та визначення протисудомної активності методами *in silico* та *in vivo* вперше обґрунтовано вибір біомішеней для молекулярного докінгу з метою прогнозування активності на скринінговій моделі визначення протисудомної активності відповідно до механізму її реалізації та доведено кореляцію між *in silico* та *in vivo* експериментальними даними. Виявлено потенційний інноваційний АФІ – епімідин з широким спектром протисудомної активності та мультитаргетним механізмом її реалізації, а також сприятливими супутніми фармакологічними властивостями. Модифіковано методику синтезу субстанції епімідину відповідно до промислових умов та принципів «зеленої хімії», розроблено технологічну схему виробництва та методики контролю якості субстанції.

Ключові слова: піримідин, синтез, молекулярний докінг, віртуальний скринінг, біомішені, ГАМК протисудомна активність, зв'язок «структура – активність», масштабування синтезу, контроль якості, епімідин, центральна нервова система.

АННОТАЦИЯ

Северина А. И. Синтез и физико-химические характеристики ЦНС-агентов среди производных пириимидин-4-она и пириимидин-2 (4) -тиона. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков, 2021.

Работа посвящена теоретическому обоснованию современной методологии таргет-ориентированного поиска ЦНС-агентов в ряду производных пириимидин-4-она и пириимидин-2(4)-тиона и ее экспериментальному подтверждению. Разработаны методики получения и определены условия для региоселективного алкилирования производных пириимидин-4-она, пириимидин-2(4)-тиона и 1-арилпиразол[3,4-*d*]пириимидин-4-она. Разработаны методики структурной функционализации производных 4-хлор-2-метил/арил-6-*R*-пириимидина и получено серии новых 4-гидразино-, 4-арилпиперазино-2-метил/арил-6-*R*-пириимидинов, а также 2-(6-метил-2-

(4-трифлуорометил)-пиримидин-4-ил)аминоуксусную и аминопропионовую кислоты. Синтезированы производные 2-ариламино-, 2-арилиденгидразино- и N-ацетил/бензоилгидразин-6-метилпиримидин-4(3*H*)-она. По результатам молекулярного моделирования, синтеза и определения противосудорожной активности методами *in silico* и *in vivo* впервые обоснован выбор биомишеней для молекулярного докинга с целью прогнозирования активности на скрининговой модели определения противосудорожной активности в соответствии с механизмом реализации и установлена корреляция между *in silico* и *in vivo* экспериментальными данными. Выявлен потенциальный инновационный АФИ – эпимидин с широким спектром противосудорожной активности и мультитаргетным механизмом ее реализации, а также благоприятными сопутствующими фармакологическими свойствами. Модифицирована методика синтеза субстанции эпимидина в соответствии с промышленными условиями и принципами «зеленой химии», разработаны технологическая схема производства и методики контроля качества субстанции.

Ключевые слова: пиримидин, синтез, молекулярный докинг, виртуальный скрининг, биомишени, ГАМК противосудорожная активность, связь «структура – активность», масштабирование синтеза, контроль качества, эпимидин, центральная нервная система.

ANNOTATION

Severina H. I. Synthesis and physico-chemical properties of the CNS-agents among pyrimidin-4-one and pyrimidin-2(4)-thione derivatives. – Qualifying scientific work manuscript copyright.

The thesis for a doctor of pharmaceutical science degree in speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is devoted to theoretical substantiation of the modern methodology of the target-oriented search of the CNS-agents among pyrimidin-4-one and pyrimidin-2(4)-thione derivatives and its experimental confirmation. The main direction of the search for CNS-agents was antiepileptic activity, due to epilepsy is more than a neurological disease with a predisposition to spontaneous seizures, it's also a complex systemic process associated with a range of different cognitive, behavioral, psychiatric disorders and concomitant comorbidity, e. g anxiety, psychosis, headache, etc. At the initial stage of research, a general design of target-oriented search of potential CNS-agents among pyrimidin-4(3*H*)-one and pyrimidin-2(4)-thione derivatives was developed. The choice of the main research scaffold - pyrimidin-4-one was substantiated, and on the basis of the principles of the modern pharmacophore concept of constructing innovative AEDs the directions of its functioning were determined, and the structures virtual base was formed. Candidate structures were ranked according to affinity indicators for GABAergic targets: to the active site of the positive allosteric modulator and benzodiazepine site of GABA_A receptor and GABA_{AT} inhibitor vigabatrin, and 14 groups of candidate structures for synthesis were formed.

The obtaining methods were developed, and conditions for regioselective alkylation with chloroacetamides and chloro-1-(4-aryl-piperazynil)ethanones of 2-alkyl/aryl-5,6-R¹,R²-pyrimidin-4(3*H*)-ones, 6-methyl-2-thioxo-pyrimidin-4(1*H*)-one, 6-amino-2-thioxo-pyrimidin-4(3*H*)-one, 4,6-dimethyl-2-thiopyrimidin and 2-methyl/aryl-6-R-pyrimidin-4-thiones, 1-aryl-

pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one were determined. The alkylation direction, as well as the structure of the synthesized compounds, was reliably proved by ^1H , ^{13}C NMR and NOESY spectroscopy, their individuality – using LS/MS analysis, using x-ray structural analysis for 1-aryl-pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidin-4-one. Methods of structural functionalization of 4-chloro-2-methyl/aryl-6-R-pyrimidine derivatives were developed, and a series of new 4-hydrazino-, 4-arylpiperazino-2-methyl/aryl-6-R-pyrimidines, as well as 2-(6-methyl-2-(4-trifluoromethyl)-pyrimidin-4-yl)aminoacetic and aminopropionic acids, were obtained. 2-arylamino-, 2-arylidenehydrazino- and N-acetyl/benzoyl hydrazides of 6-methyl-pyrimidin-4(3*H*)-one were synthesized. According to the results of a systematic study of the anticonvulsant activity of 150 synthesized pyrimidin-4-one and -2(4)-thione derivatives on the model of PTZ-induced seizures in comparison with phenobarbital and sodium valproate, a number of structural features of correlation «structure-anticonvulsant» were found.

According to the molecular modeling, synthesis and determination of the anticonvulsant activity using both *in silico* and *in vivo* methods, biotargets choice for molecular docking was substantiated for the first time to predict activity on the screening model of anticonvulsant activity determination in accordance with its implementation mechanism. Correlation between docking results and experimental data was proved. It consists of the docking studies gradual use and *in vivo* screening models and based on the relationship «biotarget – reference ligand – screening model – mechanism for activity implementation». In result of research, a potentially innovative API – epimidine was found. The substance has a wide range of anticonvulsant activity and multi-target mechanism of its implementation, e.g: strong PTZ antagonism and moderate picrotoxin antagonism – stimulation of GABAergic mechanisms by inhibition of GABA_{AT} , as well as positive allosteric modulation of the benzodiazepine site of GABA_{A} receptor; strong caffeine antagonism – modulation of the adenosynergic link due to competitive A_2A receptors inhibition; strong activity on the PTZ-kindling model exceeds the reference drug sodium valproate – due to presynaptic glutamate receptors of group III mGlu8 modulation and antagonism to ionotropic NMDA-receptors; moderate activity on the MES-induced model of seizures – glutamatergic mechanism due to inhibition of ionotropic AMPA receptors; weak activity on strychnine-induced seizures – a weak glycinergic mechanism due to inhibition of Gly-receptors. Favorable type of concomitant pharmacological properties was determined.

The synthesis method of epimidine substance was modified in accordance with industrial conditions and «green chemistry» principles, the technological scheme of production and quality control methods of the substance were developed, accompanying impurities were determined, and stability under stress conditions by HPLC was established.

Key words: pyrimidin, synthesis, molecular docking, virtual screening, biotargets, GABA, anticonvulsant activity, «structure-activity» correlation, scale-up synthesis, quality control, epimidine, the central nervous system.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активна речовина
 БЗД – бенздіазепіни
 ВЕРХ-МС – високоефективна рідинна хроматографія
 ГАМК – γ -аміномасляна кислота
 ГАМКА – рецептор γ -аміномасляної кислоти типу А
 ДМФА – диметилформамід
 ДФУ – Державна фармакопея України
 ІЧ – інфрачервона спектроскопія
 м.ч. – мільйонна частка
 МЕШ – максимальний електрошок
 МКЯ – методи контролю якості
 ПАМ/НАМ – позитивна/негативна алостерична модуляція
 ПЕП – протиепілептичні препарати
 ЦНС – центральна нервова система
 ЯМР – ядерний магнітний резонанс
 СА II – карбонова ангідраза II
 GlyR -гліциновий рецептор
 hBCAT – людська амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом
 iGluR - іонотропні глутаматні рецептори
 IL – інтерлейкін
 Kv, KCNQ – потенціал-залежні калієві канали
 mGluR – метаботропні глутаматні рецептори
 NMDA – N-метил-D-аспартат
 Pgp – Р-глікопротеїн
 PLP – піридоксальфосфат
 PTZ – пентилентетразол
 A₂A – аденозинові рецептори
 AMPA – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
 AMPAR – рецептор α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти

Підписано до друку 18.03.2021 р. Формат 60×84/16.

Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий.

Ум. друк.арк.1,9. Наклад 100 пр. Зам. № б/н.

Надруковано ФОП Пісня О. В., м. Харків, вул. Гіршмана 16-а
 Свідоцтво про державну реєстрацію В02 № 248750 від 13.09.2007 р.