

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Ткаченко Павло Володимирович

УДК 547.772+547.779.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**Пошук біологічно активних речовин
в ряду модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолу**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

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

П. В. Ткаченко

Науковий керівник:

Журавель Ірина Олександрівна,
доктор хімічних наук, професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Ткаченко П. В. Пошук біологічно активних речовин в ряду модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дисертаційна робота присвячена розробці напрямків хімічної модифікації базової структури 4-арилсульфоніл-3(5)-амінопіразолу з метою пошуку біологічно активних сполук з протимікробною та протигрибковою дією.

Метою даної роботи є синтез біологічно активних речовин в ряду модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолів, вивчення їх будови з застосуванням сучасних фізико-хімічних методів та дослідження біологічної активності з метою пошуку ефективних фармакологічних агентів протимікробної дії.

Проведено системний аналіз відомих фармацевтичних агентів з остовом амінопіразолу, виявлено структурні фармакофорні фрагменти, що впливають на прояв антимікробних властивостей, обрано базову структуру, визначено напрямки дизайну та здійснено її хімічну модифікацію.

За реакцією арилсульфонілацетонітритів з сірковуглецем та алкілгалогенідами одержано відповідні *S,S*-ацеталі, які в ході кип'ятіння з гідрозингідратом циклізуються з утворенням 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів.

Подальшу модифікацію структури проводили шляхом алкілювання та ацилювання одержаних речовин. При цьому взаємодія з алкілгалогенідами, бензилхлоридами та *N*-арилхлорацетамідами приводить виключно до

N^1 -заміщених 5-амінопіразолів. Методом двомірної ЯМР-спектроскопії (NOESY) підтверджено напрям перебігу реакції алкілювання.

З метою подальшої рандомізації базової структури здійснено ацилювання N^1 -заміщених 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів. Як результат взаємодії цих сполук з хлорангідридами кислот із реакційного середовища виділено продукти моноацилювання за аміногрупою 5-амінопіразолу з виходами 44-79%. Заміна ацилюючого агента на ангідриди кислот, приводить виключно до продуктів діацилювання.

Використання в реакції з арилсульфонілацетонітрилами арилізотіоціанатів в присутності метилйодиду дозволило перейти до 3-ариламінопохідних 4-арилсульфоніл-5-амінопіразолів, алкілювання яких N -арилхло-роацетамідами також відбувається селективно за положенням N^1 5-амінопіразолу.

Таким чином, розроблено способи синтезу ряду нових полізаміщених піразолів: 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів та 3-(N -алкіл/ариламіно)піразолів, досліджено реакції їх алкілювання та ацилювання.

Враховуючи здатність амінопіразолів до гетероциклізацій досліджено взаємодію 4-арилсульфоніл-5-амінопіразолів з α -галогенкетонами (хлороацетоном, фенацилбромідами, α -хлороциклогексаном), і одержано ряд 2,6,7-тризаміщених 1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразолів. Запропоновано схеми синтезу полізаміщених піразоло[1,5-*a*]піримідинів і піразоло[1,5-*a*]піримідин-7-онів за реакцією заміщених 5-амінопіразолів з α,β -дикарбонільними реагентами (ацетилацетоном, естерами ацетооцтової кислоти, 3-ацетилтетрагідрофуран-2-оном).

Розроблений пакет препаративних методик дозволив здійснити дизайн фокусованої бібліотеки лінійних та конденсованих похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкілтіо/ариламінопіразолів з метою пошуку речовин з протимікробною та протигрибковою дією. Ключова ідея проекту – поєднання в одній структурі низки фрагментів, які є фармакофорними угрупованнями з

прогнозованою активністю, зокрема ядра 5-амінопіразолу, ацетамідного угруповання, сульфо-, тіо- та амінозаміщених радикалів. Запропонована схема хімічних перетворень є ефективною, зручною, багатовекторною і дозволяє отримувати цільові продукти з високими виходами та досить широким набором замісників.

В рамках виконання дисертаційної роботи синтезовано близько 100 нових сполук, не описаних в літературі, структура та індивідуальність яких підтверджена методами ^1H , ^{13}C ЯМР-, хромато-мас-спектрометрії, елементного аналізу.

Визначено фармакологічний профіль нових синтезованих речовин із залученням методів віртуального скринінгу, сплановано та здійснено біологічні дослідження на наявність у них протимікробних та проти-грибкових властивостей.

На базі лабораторії протимікробних засобів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечнікова НАМН України» проведено вивчення протимікробної та фунгіцидної дії синтезованих сполук. Загалом протестовано 46 сполук. Дослідження проводили у два етапи. На першому здійснено мікробіологічний скринінг за стандартним набором тест-культур референтних штамів грамполозитивних, грамнегативних бактерій та грибів роду *Candida* (6 штамів). На другому етапі досліджено протимікробну активність 9 найбільш активних речовин по відношенню до розширеного спектру музейних та клінічних референтних тест-штамів (37 штамів). Окремо вивчалась можливість формування *in vitro* стійкості штамів мікроорганізмів і грибів роду *Candida* до синтезованих сполук.

Вивчення залежності «структура – активність» дозволило виділити певні фрагменти, що максимально впливають на прояв протимікробної дії, та запропонувати оптимальні шляхи цілеспрямованої модифікації базової структури.

Представлені результати в подальшому можуть бути використані в

лабораторіях, що займаються активним пошуком біологічно активних молекул, як для розширення хімічного простору модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолу, так і для цільового синтезу сполук даного класу з метою розробки нових протимікробних та протигрибкових агентів. За результатами фармакологічного скринінгу обрано сполуки-хіти для подальших випробувань.

Результати молекулярних докінгових розрахунків свідчать про високий афінітет практично всіх синтезованих речовин до активного сайту дигідроптероатсинтази ДГПС, про їх здатність конкурентно інгібувати сайт та завдавати антимікробну дію.

В якості найбільш перспективного для подальшого доклінічного вивчення запропоновано 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіо-піразол, для якого розроблено методики контролю якості.

Ключові слова: 5-амінопіразол, синтез, 1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразол, піразоло[1,5-*a*]піримідин, протимікробна активність, протигрибкова активність, молекулярний докінг, фармакологічний скринінг.

ANNOTATION

Tkachenko P. V. Search of biologically active substances among modified derivatives of 3(5)-aminopyrazoles. – A manuscript.

The thesis for the Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree, speciality 15.00.02 – Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation work is devoted to the development of directions of chemical modification of the basic structure of 4-arylsulfonyl-3(5)-aminopyrazole to search for biologically active compounds with antimicrobial and antifungal action.

The aim of this work is the synthesis of biologically active substances in a number of modified derivatives of 3(5)-aminopyrazoles, the study of their structure

using modern physicochemical methods and the study of biological activity to find effective pharmacological agents with antimicrobial action.

A systematic analysis of known pharmaceutical agents with aminopyrazole cycle was performed, structural pharmacophore fragments influencing the manifestation of antimicrobial properties were identified, the basic structure was selected, design directions were determined and its chemical modification was performed.

The reaction of arylsulfonylacetonitriles with carbon disulfide and alkyl halides gives the corresponding *S,S*-acetals, which cyclicize with hydrazine hydrate to form 4-arylsulfonyl-5-amino-3-alkylthiopyrazoles.

Further modification of the structure was performed by alkylation and acylation of the obtained substances. The interaction with alkyl halides, benzyl chlorides and *N*-arylchloroacetamides leads exclusively to *N'*-substituted 5-aminopyrazoles. The direction of the alkylation reaction was confirmed by NMR spectrometry (NOESY).

In order to further randomize the basic structure, acylation of *N'*-substituted 4-arylsulfonyl-5-amino-3-methylthiopyrazoles was performed. As a result of the interaction of these compounds with acid chlorides, monoacylation products of the amino group of 5-aminopyrazole with yields of 44-79% were isolated from the reaction medium. Replacement of the acylating agent with acid anhydrides leads exclusively to diacylation products.

The use of arylisothiocyanates in the reaction with arylsulfonylacetonitriles in the presence of methyl iodide made it possible to switch to 3-arylamino derivatives of 4-arylsulfonyl-5-aminopyrazoles, the alkylation of which by *N*-arylchloroacetamides also takes place selectively at the position of *N'* of 5-aminopyrazole.

Thus, methods for the synthesis of a number of new polysubstituted pyrazoles have been developed: 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-methylthio-

pyrazoles and -3-(*N*-alkyl/arylamino) pyrazoles, and their alkylation and acylation reactions have been studied.

Given the ability of aminopyrazoles to heterocyclizations, the interaction of 4-arylsulfonyl-5-aminopyrazoles with α -haloketones (chloroacetone, phenacyl bromides, α -chlorocyclohexanone) was studied, and a number of 2,6,7-trisubstituted 1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazoles were obtained. Schemes for the synthesis of polysubstituted pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ones by the reaction of substituted 5-aminopyrazoles with α,β -dicarbonyl reagents (acetylacetone, acetoacetic acid esters, 3-acetyltetrahydrofuran-2-one) are proposed.

Using a package of preparative techniques, a focused library of linear and fused derivatives of 5-amino-4-alkyl/arylsulfonyl-3-alkylthio/arylamino pyrazoles was designed to search for substances with antimicrobial and antifungal action. The key idea of the project is to combine in one structure a number of fragments that are pharmacophore groups with predicted activity, in particular 5-aminopyrazole cycle, acetamide group, sulfo-, thio- and amino-substituted radicals. The proposed scheme of chemical transformations is efficient, convenient, multi-vector and allows to obtain target products with high yields and a fairly wide range of substituents.

About 100 new compounds were synthesized, the structure and individuality of which were confirmed by ¹H, ¹³C NMR, chromatography-mass spectrometry, and elemental analysis methods.

The pharmacological profile of new synthesized substances with the involvement of virtual screening methods is determined, biological researches for their antimicrobial and antifungal properties are planned and carried out.

On the basis of the laboratory of antimicrobial agents of Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine studied the antimicrobial and fungicidal action of synthesized compounds. A total of 46 compounds were tested. The study was conducted in two stages. In

the first, microbiological screening was performed according to a standard set of test cultures of reference strains of gram-positive, gram-negative bacteria and fungi *Candida* (6 strains). In the second stage, the antimicrobial activity of 9 most active substances in relation to the expanded range of museum and clinical reference test strains (37 strains) was studied. The possibility of forming in vitro resistance of strains of microorganisms and fungi *Candida* to the synthesized compounds was studied separately.

The study of the «structure-activity» dependence allowed us to identify certain fragments that have the greatest impact on the manifestation of antimicrobial action, and to suggest optimal ways of purposeful modification of the basic structure.

The presented results can be further used in laboratories engaged in the active search for biologically active molecules, both to expand the chemical space of modified derivatives of 3(5)-aminopyrazole, and for targeted synthesis of compounds of this class to develop new antimicrobial and antifungal agents. According to the results of pharmacological screening, hit-compounds were selected for further testing.

The results of molecular docking calculations indicate a high affinity of almost all synthesized substances to the active site of dihydropteroasynthase of DHPS, their ability to competitively inhibit the site and exert antimicrobial action.

5-Amino-4-(4'-chlorophenyl)sulfonyl-3-ethylthiopyrazole has been proposed as the most promising for further preclinical studies, for which quality control methods have been developed.

Key words: 5-aminopyrazole, synthesis, 1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazole, pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, antimicrobial activity, antifungal activity, molecular docking, pharmacological screening.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати роботи:

1. Ткаченко П. В., Ткаченко Е. В., Журавель И. А., Казмирчук В. В., Дербисбекова У. Б. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонил-производных 5-аминопиразолов. *Вестник КазНМУ*. 2017. № 2. С. 317–321. *Здобувачем здійснено синтез цільових сполук, узагальнено результати мікробіологічних досліджень, підготовлено статтю до друку.*
2. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkyl-thiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action. *Вісник фармації*. 2017. № 2. С. 25–30. *Здобувачем самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, проведено систематизацію результатів.*
3. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O., Kazmirchuk V. V. The synthesis and the antimicrobial activity of N^1 -substituted 5-amino-4-arylsulfonyl-3-*N*-phenylamanopyrazoles. *Вісник фармації*. 2017. № 3. С. 3–9. *Здобувачем здійснено синтез цільових сполук, опрацьовано дані результатів мікробіологічного скринінгу, підготовлено статтю до друку.*
4. Ткаченко П. В., Колесник С. В., Журавель И. А., Завада О. А., Дербисбекова У. Б. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола. *Фармация Казахстана*. 2017. № 8. С. 13–16. *Здобувачем самостійно проведено розробку методики, проведено валідаційні процедури.*
5. Tkachenko P., Tkachenko O., Netosova K., Borisov O., Zhuravel I. Products of interaction of substituted 5-aminopyrazoles with α -haloketones as potential pharmaceutical agents. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 5 (9). P. 25–28. *Здобувач здійснив синтез сполук, взяв участь в інтерпретації спектральних даних, підготував статті до друку.*

6. Ткаченко П. В., Ткаченко О. В., Журавель І. О., Казмірчук В. В. 4-(4'-Хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразол, який проявляє протигрибкову активність. *Патент на корисну модель UA 124716*, МПК А61К 31/505, С07D 239/69; Заявл. и 2017 09272 від 21.09.2017; Опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8. 4 с. *Здобувач здійснив патентний пошук за напрямом, виконав синтетичну частину роботи та підготував матеріал для подачі в Укрпатент.*

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Tkachenko P. V., Zhuravel I. O., Borisov O. V., Tkachenko O. V. One-pot synthesis of 3-alkylthio- and 3-aminosubstituted 5-amino-4-*R*-sulfonyl-1*H*-pyrazoles. *Topical issues of new drugs development: International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student: Book of Abstracts*, April 23 2015. Kharkiv, 2015. P. 49.
8. Ткаченко П. В., Ткаченко Е. В., Журавель И. А. Синтез и биологическая активность 1-*R*-бензил-3-фенилтиено[3,2-*d*]пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дионов. *Наука и медицина: Современный взгляд молодежи: III Междунар. науч.-практич. конф. студентов и молодых ученых, посв. 25-летию независимости Республики Казахстан: мат-лы конф., 21–22 апреля 2016 г.* Алматы, 2016. С. 207–208.
9. Ткаченко П. В., Завада О. О., Журавель І. О. Розробка специфікації на субстанцію 4-(4-хлорфеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології: VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю: зб. наук. праць, випуск 3, 13 жовтня 2017 р.* Харків, 2017. С. 295–298.
10. Tkachenko P.V., Netosova K.Yu., Zhuravel I.O. Interaction of substituted 5-aminopyrazoles with β -dicarbonil compounds. *Topical issues of new drugs development: XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student: Book of Abstracts*, April 18-20, 2018. Kharkiv, 2018. Kharkiv: NUPh. P. 27.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	13
ВСТУП	14
РОЗДІЛ 1 БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА СИНТЕЗ СПОЛУК, ЩО МІСТЯТЬ ФРАГМЕНТ 3(5)-АМІНОПІРАЗОЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	21
1.1 Способи синтезу заміщених 5-амінопіразолів лінійної будови	21
1.2 Лікарські препарати з фрагментом піразолу	31
1.3 Біологічно активні синтетичні речовини з фрагментом піразолу	32
РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМУ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	41
2.1 Синтез об'єктів дослідження та встановлення їх будови	42
2.2 Віртуальний скринінг біологічної активності похідних 5-аміно-4- алкіл/арилсульфонілпіразолів	44
2.3 Мікробіологічні методи дослідження	45
2.4 Статистичні методи	48
РОЗДІЛ 3 4-АЛКІЛ/АРИЛСУЛЬФОНІЛ-5-АМІНО-3-АЛКІЛТІО- ПІРАЗОЛИ ТА 4-АЛКІЛ/АРИЛСУЛЬФОНІЛ-5-АМІНО-3- АРИЛАМІНОПІРАЗОЛИ	51
3.1 Синтез 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів, продуктів їх алкілування та ацилювання	51
3.2 Синтез 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкіламінопіразолів та продуктів їх алкілування	57
3.3 Дизайн комбінаторної бібліотеки полізаміщених піразолів на основі базової структури 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу	58
3.4 Встановлення профілю біологічної активності синтезованих сполук (PASS-прогнозування)	63
3.5 Таргет-орієнтований віртуальний скринінг (молекулярний докінг)	64
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3	69

РОЗДІЛ 4 РЕАКЦІЇ ГЕТЕРОЦИКЛІЗАЦІЇ ЗА УЧАСТЮ 3(5)-АМІНО-ПІРАЗОЛІВ	71
4.1 Взаємодія 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразолів із α -галогенокетонами	71
4.2 Взаємодія 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-заміщених піразолів із α,β -дикарбонільними сполуками	74
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4	77
РОЗДІЛ 5 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ МОДИФІКОВАНИХ ПОХІДНИХ 3(5)-АМІНОПІРАЗОЛУ	78
5.1 Вплив синтезованих похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-піразолу на тест-культури патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів	80
5.2 Вивчення спектру протимікробної активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу	91
5.3 Вивчення спектру протигрибкової активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу	95
5.4 Вплив похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу на формування резистентності у грам позитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду <i>Candida</i>	97
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5	103
РОЗДІЛ 6 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	105
ВИСНОВКИ	128
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	130

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТСС	американська колекція типових культур
ВЕРХ	високоєфективна рідинна хроматографія
ДМФА	диметилформамід
ІЧ	інфрачервоний
МБстК	мінімальна бактеріостатична концентрація
МБцК	мінімальна бактерицидна концентрація
МС	мас спектрометрія
МФстК	мінімальна фунгістатична концентрація
МФцК	мінімальна фунгіцидна концентрація
м.ч.	мільйонна частка
ТГФ	тетрагідрофуран
ТШХ	тонкошарова хроматографія
ЯМР	ядерний магнітний резонанс
Alk	алкільний радикал
Ar	арильний радикал
MW	мікрохвильове опромінення
PDB	Protein Data Bank
br.s	уширений синглет
d	дублетний сигнал
s	синглетний сигнал
t	триpletний сигнал

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Серед мільйонного різномаїття органічних структур лише декілька тисяч хемотипів застосовуються в медичній практиці як лікарські субстанції. Попри бурхливий розвиток комп'ютерних технологій селекції і прогнозування властивостей віртуальних сполук та безсумнівні технологічні переваги комбінаторної хімії поява принципово нової молекули, а тим більш впровадження її в медичну практику з кожним роком стає все більш ресурсоємною задачею. Створення ідеальних ліків взагалі залишається нездійсненою мрією. Тим не менш, системна і кропітка робота з перебору усіх можливих структур та дослідження їх впливу на живий організм в межах університетських лабораторій все ще залишаються ключовими етапами розробки потенційних фармацевтичних агентів.

Особливої актуальності проблема вибору базової структури набуває за необхідності розробки протимікробних засобів, оскільки терапія цими препаратами досить часто обмежується чи навіть унеможлиблюється розвитком резистентності мікроорганізмів, а за останні 15 років не відкрито жодного нового класу антибіотиків.

Похідні амінопіразолів з об'ємними замісниками досить часто привертають увагу науковців з медичної хімії, оскільки такі молекули мають значний потенціал для забезпечення ефективною ліганд-рецепторної взаємодії і можуть бути базовими структурами для розробки лікарських субстанцій. З 1884 року і по нині в медичній практиці препаратами першої лінії знеболення залишаються похідні піразолону-5. На сьогодні відомі протипухлинні засоби, зокрема Кризотиніб, Бінуклеїн та Баросептиб, які є антагоністами рецепторів факторів росту та ауророкінази. Препарати Силденафіл та Целекоксиб є селективними інгібіторами ЦГМФ та ЦОГ-2. Ряд фармацевтичних агентів, що містять фрагмент аміно-заміщеного піразолу, мають виражену

нейролептичну, снодійну та анксиолітичну дію, деякі з них в доклінічних випробуваннях довели ефективність в лікуванні хвороби Альцгеймера. Тим не менш, робота по вивченню нових сполук та нових видів біологічних та фармацевтичних ефектів зазначеного класу сполук продовжується. На увагу заслуговують дослідження з пошуку інгібіторів моноамінооксидази (*E. Palaska*, 2008), інгібіторів протеїнкінази BRAF (*J. Liu*, 2012), препаратів для лікування метастатичної меланоми (*A. Gorden*, 2013). В останній час активізувалась робота з пошуку противірусних агентів серед малих молекул з остовом 5-амінопіразолу (*G. Yang*, 2021) та зростає увага до протигрибкових властивостей таких сполук (*M. F. El Shehry*, 2018).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано згідно плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Хімічний синтез і аналіз біологічно активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (№ державної реєстрації 0103U000475), «Органічний синтез та аналіз БАР, розробка лікарських засобів на основі синтетичних та напівсинтетичних субстанцій» (№ державної реєстрації 0114U000943), та «Молекулярний дизайн і цілеспрямований синтез нових біологічно активних органічних речовин та їх фокусованих комбінаторних бібліотек» (№ державної реєстрації 0114U000944).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є синтез біологічно активних речовин в ряду модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолів, вивчення їх будови з застосуванням сучасних фізико-хімічних методів та дослідження біологічної активності з метою пошуку ефективних фармакологічних агентів протимікробної дії.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені такі задачі:

- провести аналіз літературних джерел та оцінити хімічний та фармакологічний потенціал сполук, які містять фрагмент піразолу;
- розробити методики та здійснити синтез полізаміщених піразолів,

зокрема 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів та 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-(*N*-алкіл/ариламіно)піразолів, дослідити реакції їх алкілювання та ацилювання;

- здійснити реакції гетероциклізації 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів та 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-(*N*-ариламіно)піразолів з α -галогенкетонами та β -дикарбонільними реагентами;
- оцінити перспективність пошуку біологічно активних речовин серед синтезованих сполук методами комп'ютерного прогнозування та фармакологічного скринінгу біологічної активності;
- розробити підходи до побудови комбінаторних бібліотек на основі базової структури 3(5)-амінопіразолу, здійснити синтез однієї з них;
- визначити найбільш активні сполуки для подальших фармакологічних випробувань;
- для речовини, рекомендованої для поглиблених досліджень, розробити проект методик контролю якості.

Об'єкт дослідження – синтез та дослідження властивостей модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолів з потенційною антимікробною активністю.

Предмет дослідження – способи одержання; хімічні, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів, 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-(*N*-ариламіно)піразолів, 2-метил/арил-6-метилтіо-7-арилсульфоніл-1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразолів, 2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідинів, 2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідин-7(4*H*)-онів; визначення профілю біологічної активності; фармакологічний скринінг; стандартизація найбільш активної субстанції.

Методи дослідження – методи органічного синтезу, фізичні та фізико-хімічні методи аналізу органічних сполук (^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопія, гомо-і гетероядерні кореляційні методики (NOESY, COSY, HMBC), хромато-мас-спектрометрія, елементний аналіз, ІЧ-, УФ-спектроскопія, ТШХ, ВЕРХ),

методи комп'ютерного прогнозування біологічної активності (PASS-прогнозування, докінгові дослідження), мікробіологічний скринінг, аналіз та узагальнення одержаних результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено узагальнення даних щодо цілеспрямованої модифікації базового фрагмента 3(5)-амінопіразолу та розроблено підходи до побудови комбінаторних бібліотек лінійних та конденсованих похідних на їх основі з метою отримання речовин з протимікробною та протигрибковою активністю.

Розроблено способи синтезу ряду нових полізаміщених піразолів, зокрема 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів та -3-(*N*-алкіл/ариламіно)піразолів, досліджено реакції їх алкілування та ацилювання.

Досліджено хімічну поведінку 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів та 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-(*N*-ариламіно)піразолів в реакціях з α -галогенкетонами та α,β -дикарбонільними реагентами. Доведено, що взаємодія з галогенкетонами приводить до утворення похідних імідазо[1,2-*b*]-піразолу; взаємодія з α,β -дикарбонільними сполуками – до похідних піразоло[1,5-*a*]піримідину чи піразоло[1,5-*a*]піримідин-7(4*H*)-ону.

Визначено фармакологічний профіль нових синтезованих речовин із залученням методів віртуального скринінгу, сплановано та здійснено біологічні дослідження на наявність у них протимікробних та протигрибкових властивостей. Вперше визначено спектр і рівень протимікробної активності синтезованих речовин по відношенню до музейних та клінічних штамів мікроорганізмів – збудників інфекційних та гнійно-запальних захворювань та досліджено можливість формування *in vitro* стійкості грибів роду *Candida* до синтезованих сполук.

Встановлені закономірності зв'язку «хімічна будова – антибактеріальна активність» в ряду полізаміщених похідних піразолу, що були протестовані на наявність антибактеріальної активності. За результатами скринінгу обрано сполуки-хіти для подальших фармакологічних випробувань.

В рамках виконання дисертаційної роботи синтезовано близько 100 нових сполук, не описаних в літературі, структура та індивідуальність яких підтверджена методами ^1H , ^{13}C ЯМР-, хромато-мас-спектрометрії, елементного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів підтверджена патентом України на корисну модель.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено синтетичні підходи до одержання систематичних рядів похідних 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-заміщених піразолів, що дозволяє суттєво розширити можливості цілеспрямованого пошуку біологічно активних речовин серед зазначеного ряду сполук. Розроблено препаративні методики синтезу 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів, 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-(*N*-алкіл/ариламіно)піразолів, 2-метил/арил-6-метилтіо-7-арилсульфоніл-1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразолів, 2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідинів, 2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідин-7(4*H*)-онів.

Вивчення протимікробної активності одержаних речовин довело високий потенціал зазначених похідних для розробки протимікробних та протигрибкових агентів, а результати оцінки можливості формування стійкості грибів роду *Candida* до цих сполук підтвердили перспективність даного науково-практичного напрямку. Встановлені елементи залежності «структура–активність» дозволили визначити основні шляхи цілеспрямованої модифікації молекули з метою покращення протимікробних властивостей, і можуть бути корисним підґрунтям при розробці субстанцій антибактеріальної та фунгіцидної дії.

За результатами біологічних випробувань для подальшої розробки в якості субстанції протигрибкової дії запропоновано 4-(4'-хлорофеніл)-сульфоніл-3-етилтіо-5-амінопіразол, для якого розроблено проект МКЯ.

Результати досліджень впроваджено у науково-дослідну та навчальну роботу кафедри фармацевтичної і токсикологічної хімії Таджицького

державного медичного університету ім. Абуалі ібні Сіно, кафедри фармації Таджицького національного університету, кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри технології органічних речовин та фармацевтичних препаратів ДВНЗ УДХТУ, кафедри фізколоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає у систематизації літературних даних, а саме проведенні пошуку та аналізу літературних джерел щодо методів синтезу, властивостей та активності досліджуваних сполук. Здобувачем проведені експериментальні дослідження, обробка отриманих результатів, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи. Постановку завдань та обговорення результатів досліджень виконано разом з науковим керівником д. х. н., проф. Журавель І. О.

Співавторами наукових публікацій є науковий керівник та науковці, які брали участь у вивченні фізико-хімічних та біологічних властивостей описаних у роботі речовин. Експерименти з ЯМР, хромато-мас і мас-спектрометричні дослідження проведені на базі Enamin Ltd (к. хім. н. Борисов О. В.), вивчення протимікробної активності проводились на базі ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова НАМН» (к. мед. наук Казмірчук В. В.), МКЯ розроблено на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ (консультативна підтримка к.фарм.н. Завада О.О.).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на XXI International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 2015), III Междунар. науч.-практич. конф. студентов и молодых ученых, посв. 25-летию независимости Республики Казахстан (Алматы, 2016), VI наук.-практ.

конф. з міжнар. Участю (Харків, 2017), XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей (3 з них у фахових виданнях, 2 – у закордонних), тези 4 доповідей на наукових конференціях різного рівня, отримано 1 патент України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків та списку використаних джерел. Обсяг основного тексту дисертації становить 114 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 18 таблицями, 57 рисунками та 9 схемами. Список використаних джерел містить 185 найменувань.

РОЗДІЛ 1

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА СИНТЕЗ СПОЛУК, ЩО МІСТЯТЬ ФРАГМЕНТ 3(5)-АМІНОПІРАЗОЛУ (Огляд літератури)

Нітрогеновмісні гетероциклічні сполуки та їх похідні становлять левову частку відомих терапевтичних засобів. Модифікація зазначеного циклу різноманітними замісниками або його залучення до складних гетероциклічних систем може бути шляхом до нових лікарських засобів. Даний літературний огляд висвітлює різні аспекти синтезу та біологічної дії лінійних похідних на основі 3(5)-амінопіразолу. Наведена інформація щодо лікарських препаратів, молекули яких містять цикл піразолу, та біологічно активних субстанцій, які на даний час знаходяться на різних стадіях вивчення та впровадження в медичну практику.

Значну увагу до синтезу та біологічних випробувань похідних 5-амінопіразолів підтверджує опублікування декількох оглядових статей, зокрема [1-4]. Синтетична доступність та широкий спектр біологічної активності сполук даного ряду мотивують дослідників на отримання чисельних бібліотек нових структур.

1.1 Способи синтезу заміщених 5-амінопіразолів лінійної будови

Фрагмент піразолу досить часто стає частиною базової структури біологічно активних сполук. Це стосується як модифікованих природних речовин, так і синтетичних продуктів.

Існує декілька синтетичних шляхів формування циклу піразолу, усі вони добре відомі і описані в класичних підручниках та монографіях з органічного синтезу. Традиційні підходи до синтезу заміщених піразолів зазвичай полягають в конструюванні двох C—N зв'язків за рахунок конденсації 1,3-дикарбонільних сполук або їх 1,3-діелектрофільних еквівалентів з похідними

гідразину (Рис. 1.1, шлях *a*). Іншим підходом можна вважати одночасне або послідовне генерування С—N і С—С зв'язків в реакції міжмолекулярного [3+2]-циклопрієднання 1,3-диполів до диполярофілів (Рис. 1.1, шлях *b*).

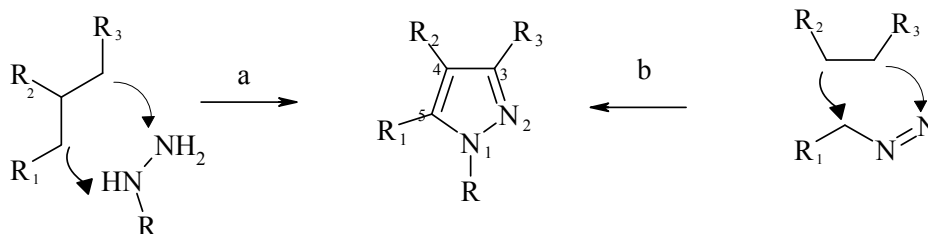


Рис. 1.1 Шляхи формування циклу піразолу.

З точки зору медичної хімії найбільшу цінність становлять синтетичні протоколи, які забезпечують максимальну варіабельність замісників в гетероциклі, є селективними, зручними і продуктивними.

Так, досить поширеним способом синтезу 5-амінопіразолів **1.2** з алкільними та арильними замісниками є взаємодія дикетоамідів **1.1** з алкіл/арилгідразинами в присутності Lawesson's reagent в суміші сухих розчинників: ТГФ – піридин 95:5 [5, 6] (Рис. 1.2).

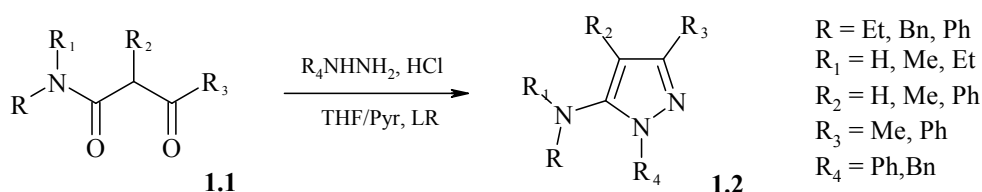


Рис. 1.2 Синтез заміщених 5-амінопіразолів.

5-*N*-Циклогексиламінопіразол **1.4** було отримано в реакції фенілгідразону **1.3** з діетиламіном та формальдегідом з наступною взаємодією проміжного аддукту Манніха з циклогексилізоціанідом [7] (Рис. 1.3):

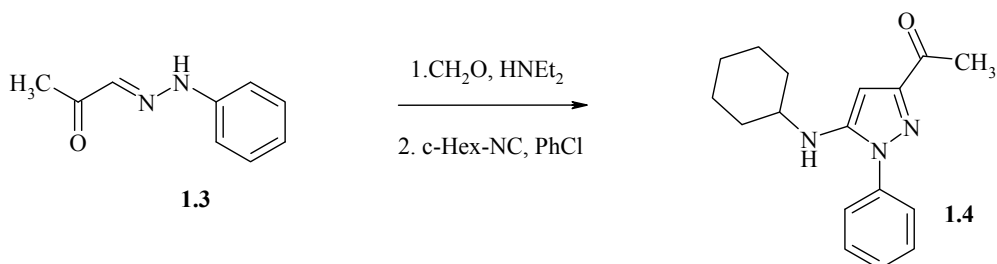


Рис. 1.3 Синтез 5-*N*-циклогексиламінопіразолу.

Ціаноацетогідразид з арилсульфонілхлоридами утворює сульфогідрази **1.5**, які у лужному середовищі циклізуються на піразолон-3-они **1.6**. За реакцією ацилювання були отримані *O*-ацилпохідні 5-амінопіразолів **1.7** (Рис. 1.4) [8].

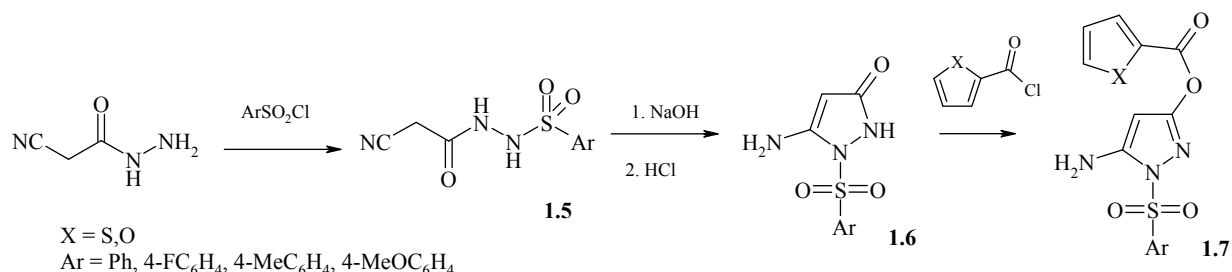


Рис. 1.4 Синтез 1,3-дизаміщених 5-амінопіразолів.

Аналогічна циклізація описана і для заміщених 1-(ціанофеніл)ацетил(тіо)семікарбазидів **1.8** (Рис. 1.5) [9-11].

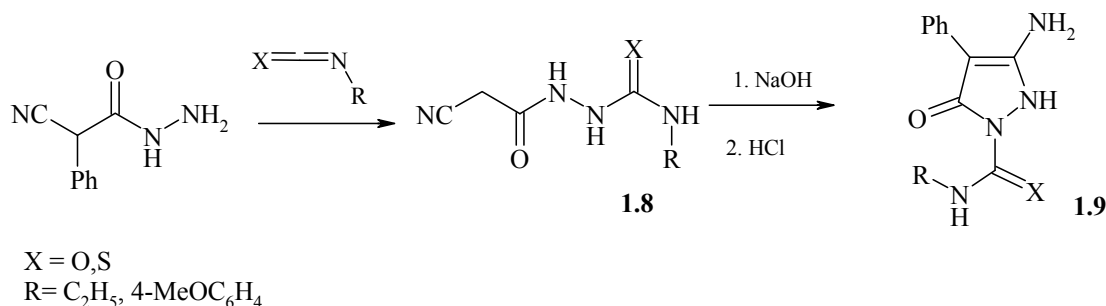


Рис. 1.5 Синтез 3-аміно-5-оксо-4-феніл-2,5-дигідро-1*H*-піразол-1-карбон(тіо)амідів.

Амінопіразоли **1.12** з об'ємними замісниками в положеннях 3,4 одержані як продукт конденсації тіосемікарбазидів **1.10** з α -бромкетонам **1.11** у кислому середовищі (Рис. 1.6) [12, 13].

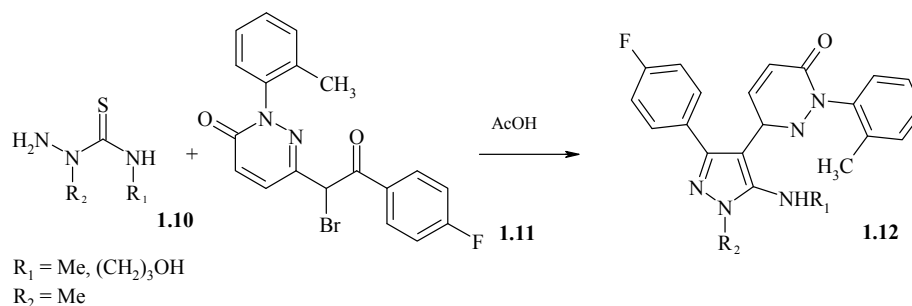


Рис. 1.6 Синтез 1,3,4-тризаміщених 5-метиламінопіразолів.

5-Амінопіразоли з активними функціональними угрупуваннями одержують шляхом конденсації етоксидетиліденпохідних малононітрілу **1.13**, ціанооцтового естеру, аміду ціанооцтової кислоти з різноманітними монозаміщеними гідразинами у середовищі спирту (Рис. 1.7) [14-17]. Дана схема часто використовується у твердофазному синтезі [18].

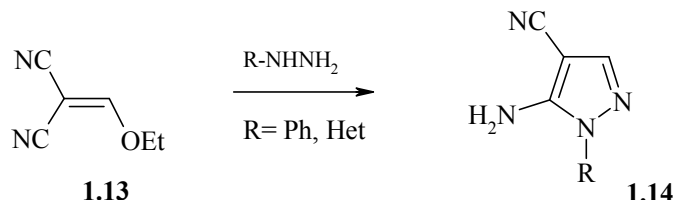


Рис. 1.7 Синтез 5-аміно-4-ціанопіразолів.

Як результат конденсації 3-метоксиакрилонітрілу **1.15** і монозаміщеного гідразину у кислому середовищі в умовах мікрохвильового випромінювання одержано 5-амінозаміщений регіоізомер **1.16** з хорошим виходом (75-90%), у той час як у присутності натрій етилату в етанолі виділено 3-амінозаміщені ізомери **1.17** з виходами 85-89% (Рис. 1.8) [19-21].

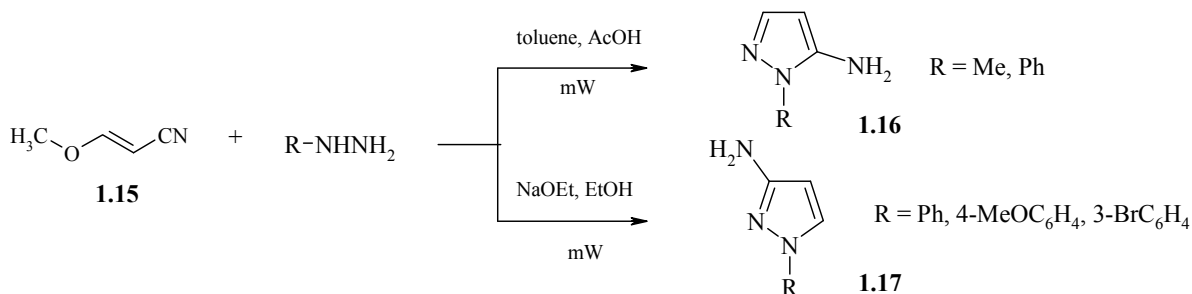


Рис. 1.8 Синтез регіоізомерних амінопіразолів.

Значну кількість робіт присвячено синтезу регіоізомерних 3-амінопіразолів та 5-амінопіразолів. Заміщені β-кетонітрили **1.18** в реакції з гідразин-гідратом утворюють 3-амінопіразоли **1.19** [22-27].

Проведення реакції під дією MW діелектричного нагріву у випадку монозаміщених гідразинів супроводжується повним контролем регіоселективності (Рис. 1.9) [19].

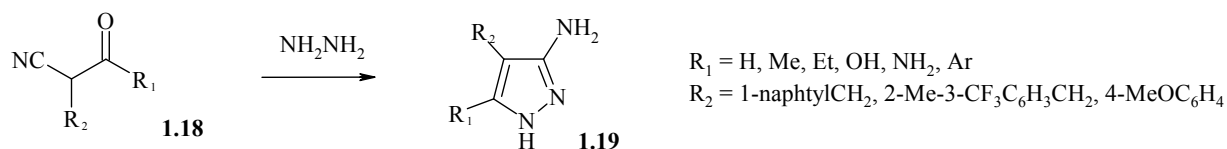


Рис. 1.9 Синтез 3-амінопіразолів.

Для синтезу ізомерних 5-амінопіразолів **1.20** зазвичай в реакцію з β -кетонітрилами **1.18** вводять монозаміщені гідрозини (Рис. 1.10) [11, 28-33].

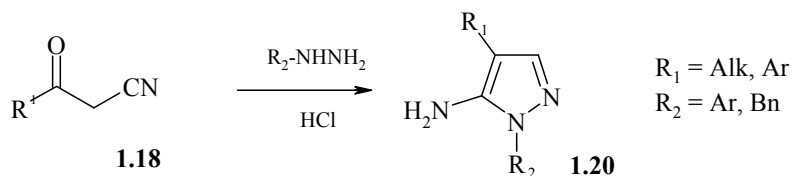
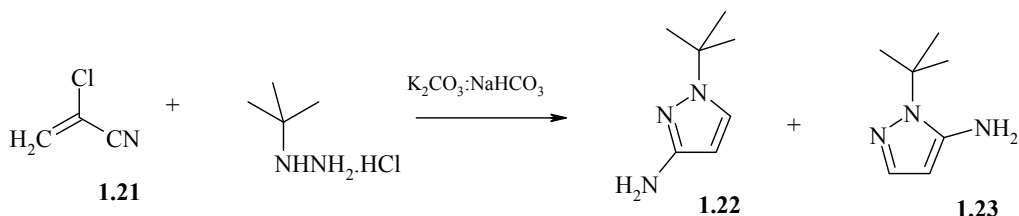


Рис. 1.10 Синтез 5-амінопіразолів.

Гідрохлорид *трет*-бутилгідрозину – комерційно доступний реагент, і його взаємодія з 2-хлороакрилонітрилом **1.21** у водному середовищі є простим способом синтезу 3-аміно-1-*трет*-бутилпіразолу **1.22**. Цікаво, що регіоселективність процесу циклізації залежить від складу каталізатору. Оптимальним для отримання 3-аміноізомера виявилось використання каталізатора $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ у співвідношенні 1: 2 (Рис. 1.11) [34].

Рис. 1.11 Синтез 3-аміно-1-*трет*-бутилпіразолу.

Беглі та співавтори повідомляють про регіоселективний синтез 1-метил-3-амінопіразолу **1.24** з 2-хлороакрилонітрилу **1.21** та метилгідрозину в умовах мікрохвильового випромінювання (Рис. 1.12) [19].

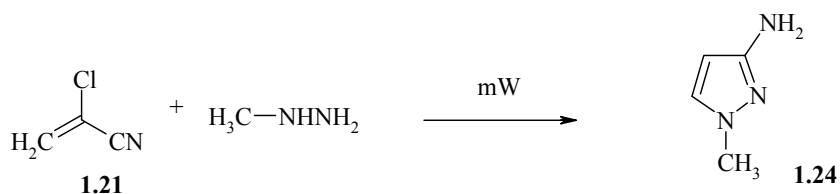


Рис. 1.12 Синтез 3-аміно-1-метилпіразолу.

β -Кетонітрил **1.25** – продукт реакції лактону з ацетонітрилом в лужних умовах, також взаємодіє з гідразином з утворенням 3-амінопіразолу **1.26**, який далі при обробці тіонілхлоридом в ТГФ при кімнатній температурі утворює біциклічну систему піроло[1,2-*b*]піразолу **1.27** (Рис. 1.13) [34].

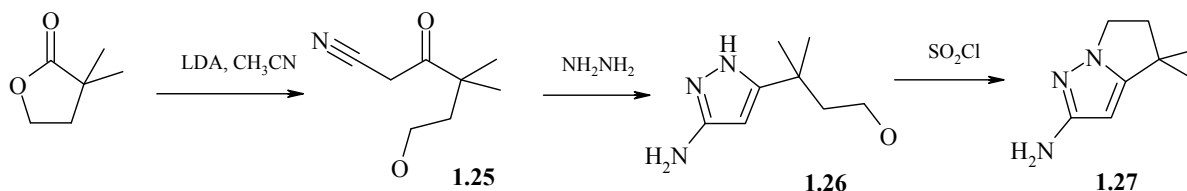


Рис. 1.13 Синтез 2-аміно-4,4-диметил-5,6-дигідро-4*H*-піроло[1,2-*b*]-піразолу.

В реакції 3,3-*bis*(метилтіо)-2-ціаноакрилонітрилу **1.28** з аніліном виділено 2-ціаноакрилонітрил **1.29**, який з бензилгідразином утворює тризаміщений 5-амінопіразол **1.30** (Рис. 1.14) [17, 35, 36].

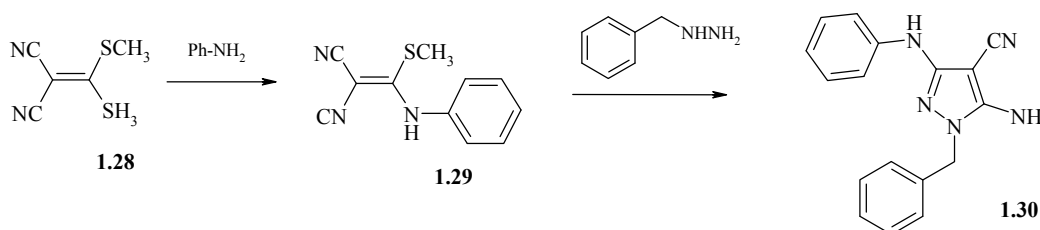


Рис. 1.14 Синтез N^1 -бензил-3-феніламіно-5-аміно-4-ціанопіразолу.

Схема синтезу двоядерних систем запропонована авторами публікації [37]. 5-Ціанометил-3-арил-[1,2,4]оксадіазоли **1.31** через на першій стадії утворюють *S,S*- **1.32** або *S,N*-ацеталі **1.33**, які далі при взаємодії з гідразин-гідратом циклізуються на кінцеві продукти: 3-метилтіо-5-аміно-4-([1,2,4]-оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразоли **1.33** та 4-([1,2,4] оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразол-діаміни **1.35**. (Рис. 1.15). Авторами повідомляється, що перетворення **1.32** \rightarrow **1.33** супроводжується утворенням побічного продукту заміщення S-CH₃-групи на гідразинну функцію – відповідного 3-гідразинопіразолу.

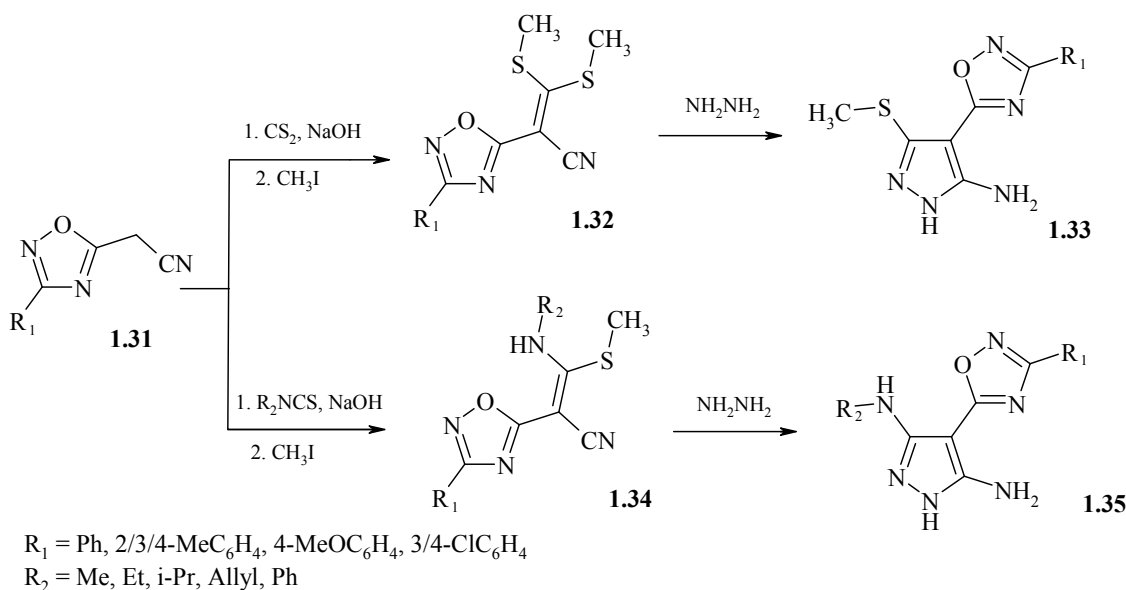


Рис. 1.15 Синтез 3-метилтіо-5-аміно-4-([1,2,4]оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразолів та 4-([1,2,4] оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразолдіамінів.

Схожу схему перетворень використано і в синтезі 3-феніламінопіразолу **1.38** (Рис. 1.16) [38-40].

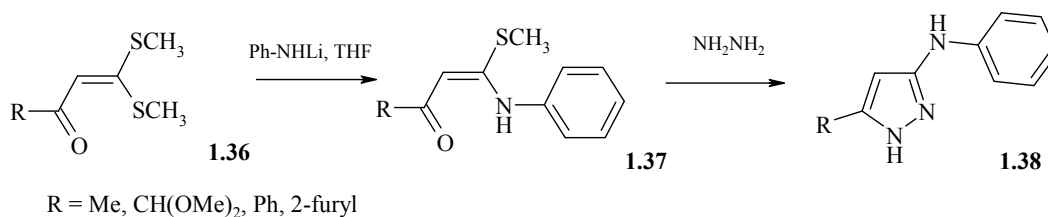


Рис. 1.16 Синтез 5-заміщених 3-феніламінопіразолів.

Ізомерні 5-ариламіно-1*H*-піразоли **1.40** було синтезовано шляхом циклоконденсації гідразину з відповідним *N,S*-ацеталькетенами **1.39** в присутності ацетатної кислоти (Рис. 1.17) [41].

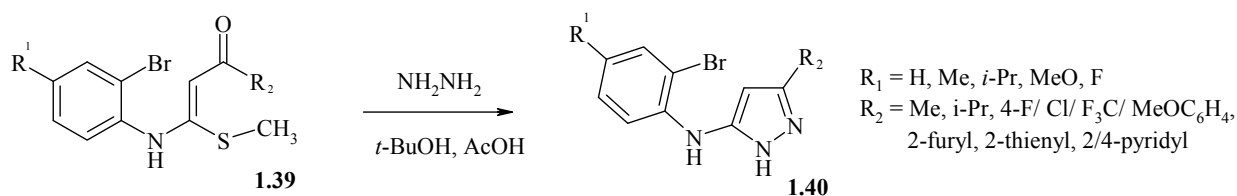
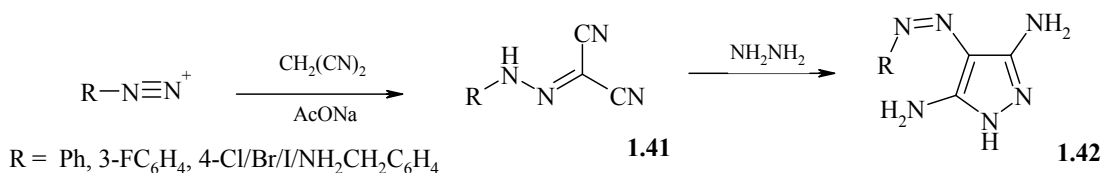


Рис. 1.17 Синтез 3-заміщених 5-ариламінопіразолів.

3,5-Діамінопіразоли **1.42** були синтезовані в реакції диціаногідразонів **1.41** з гідразином (Рис. 1.18) [42].

Рис. 1.18 Синтез 4-арилазо-3,5-діаміно-1*H*-піразолів.

В реакції 1,3-циклопрієднання гідразоніл бромідів **1.43** і етилціаноацетату або ціаноацетаміду через стадію проміжного імінотаутомеру **1.44** утворюються похідні 5-амінопіразолів **1.45** (Рис. 1.19) [43, 44].

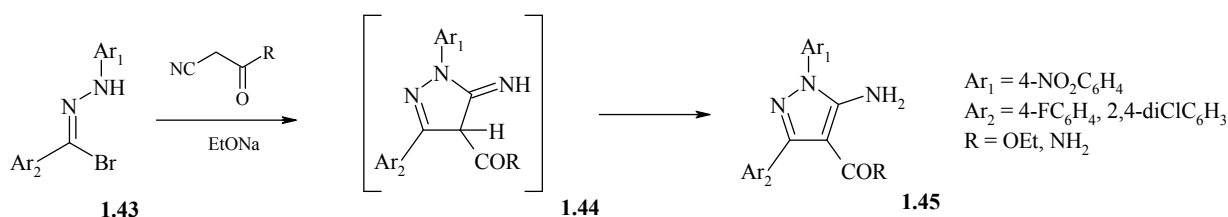


Рис. 1.19 Синтез 1,3-діарил-4-ацил-5-амінопіразолів.

5-(2-Бромофеніл)-*N*-феніл-1*H*-піразол-3-амін **1.47** був легко отриманий за реакцією 3-(2-бромофеніл)-3-оксо-*N*-фенілпропантіоаміду **1.46** з гідразин-гідратом в етанолі (Рис. 1.20) [45].

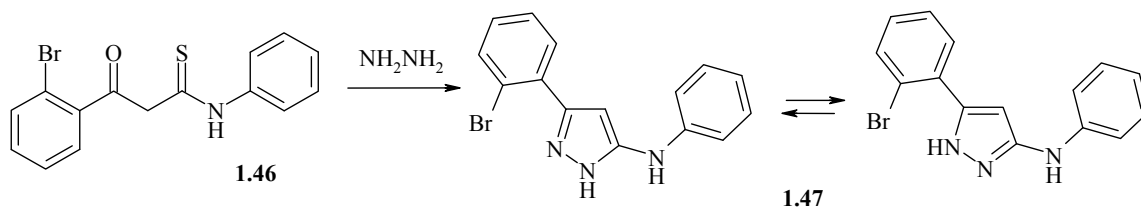


Рис. 1.20 Синтез 3-феніламіно-5-(2-бромофеніл)піразолу.

Розроблено декілька протоколів трикомпонентних реакцій, придатних для синтезу 3-амінопіразолів.

Так взаємодія бутадієну **1.48**, сульфонілазиду **1.49** через утворення проміжного β -алкініл-*N*-сульфонілкетейміну, який діє як ефективний 1,3-діелектрофільний реагент, в конденсації з фенілгідразидом гідрaziном приводить до кінцевих продуктів **1.50** (Рис. 1.21) [46].

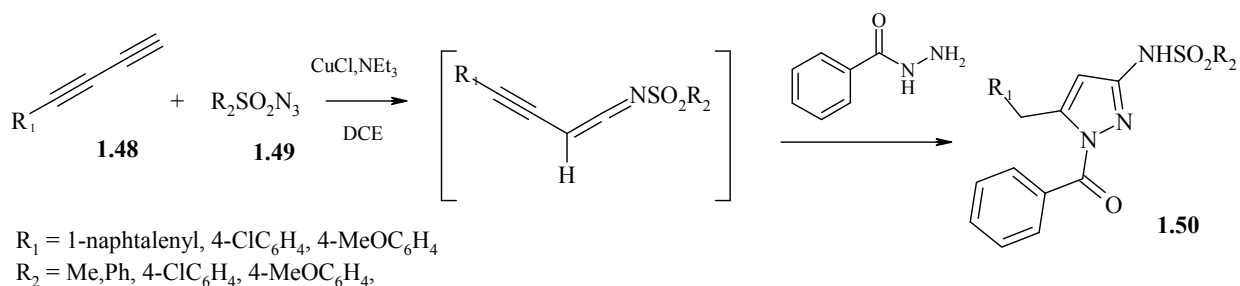


Рис. 1.21 Синтез 5-бензил-1-фенацил-3-сульфоніламінопіразолів.

Як результат трикомпонентної взаємодії диметилового естеру ацетилендикарбонової кислоти **1.51**, фурил-2-карбогідразиду **1.52** та циклогексилізоціаніду **1.53** отримано естер піразол-3,4-дикарбонової кислоти **1.54** (Рис. 1.22) [47].

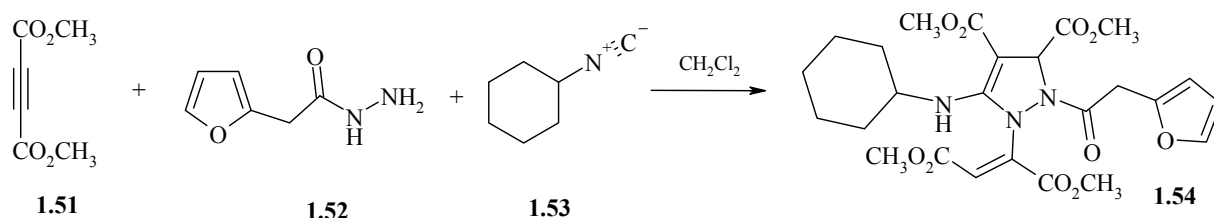


Рис. 1.22 Синтез диметилового естеру 1-[1,2-біс(метоксикарбоніл)-вініл]-5-циклогексиламіно-2-(фуран-2-іл)-2,3-дигідро-1H-піразол-3,4-дикарбонової кислоти.

Подібну взаємодію за участю діестеру ацетилендикарбонової кислоти **1.51**, гідрозин-карбоксаміду **1.55** та низки ізоціанідів було проведено при кімнатній температурі у ацетоні (Рис. 1.23) [7, 48].

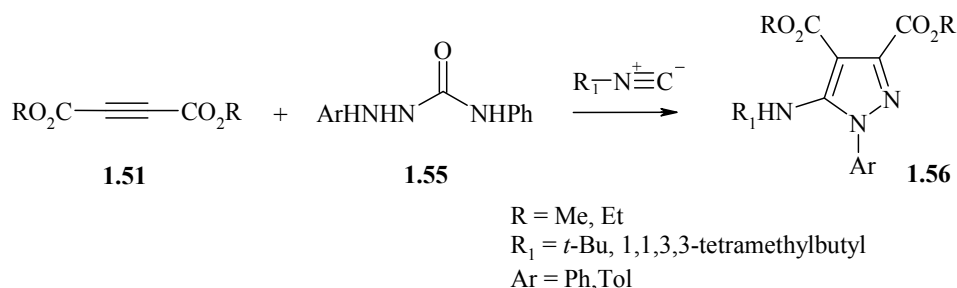


Рис. 1.23 Синтез діестерів 1-арил-2-аміно-піразол-3,4-дикарбонової кислоти.

Су та співавтори повідомляють про реакцію амінування з використанням 3- та 4-бром-1H-піразолів **1.57** як електрофілів для синтезу 3(4)-

амінопіразолів **1.58**. Реакція відбувається з використанням біарилфосфін-паладієвого каталізатора (Рис. 1.24) [49]. Як амінна компоненти виступали аліфатичні та ароматичні аміни з різними електронними та стеричними властивостями. Авторами відмічено, що реакція з амінофенолами проходила з дуже низькими виходами.

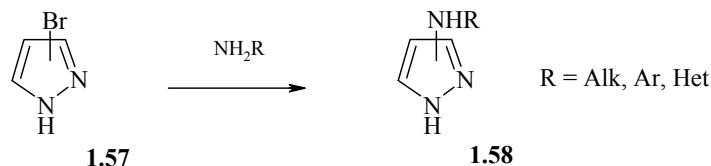


Рис. 1.24 Синтез 3(4)-амінопіразолів.

Описана двостадійна схема синтезу трициклічної структури **1.61**, яка включає каталітичне олефінування гідрозону терефталевого альдегіду **1.59** з утворенням динітрилу **1.60**, який далі вступає у циклізацію з гідразин-гідратом (Рис. 1.25) [50].

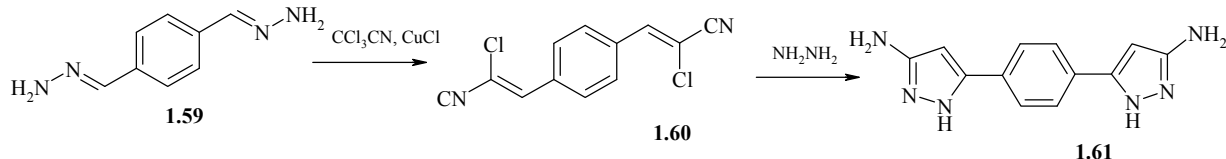


Рис. 1.25 Синтез 5,5'-(1,4-фенілен)-біс-(1H-піразол-3-аміну).

Метил диметилдитіокарбамат **1.62** в реакції з ацетонітрилом за присутності *n*-BuLi утворює 3-(диметиламіно)-3-(метилтіо)акрилонітрил **1.63**, який з гідразин-гідратом циклізується на 1H-піразол-3,5-діамін **1.64** (Рис. 1.26) [51].

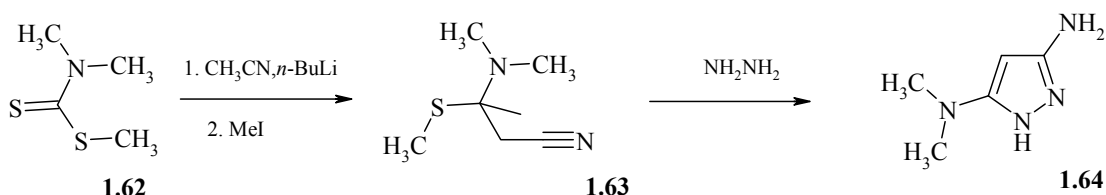


Рис. 1.26 Синтез N^5, N^5 -диметил-1H-піразол-3,5-діаміну.

Амінопіразоли також можна отримати відновленням нітрогрупи в піразольному кільці [52-57]. Як приклад можна навести схему синтезу 3-

бром-1*H*-піразол-5-аміну **1.68** виходячи з 3,4,5-трибromo-1*H*-піразолу **1.65** (Рис. 1.27) [26].

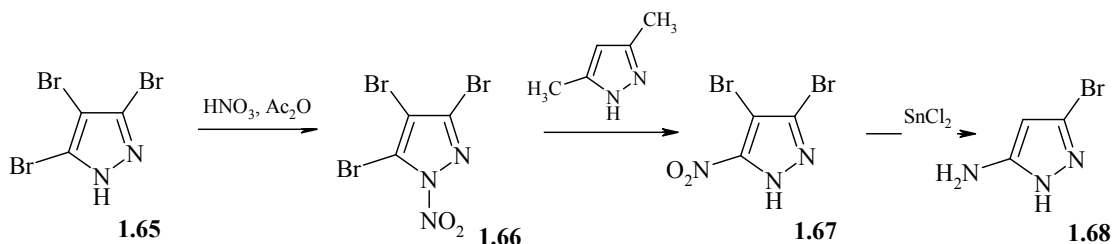


Рис. 1.27 Синтез 3-бromo-1*H*-піразол-5-аміну.

Описано реакцію «вивільнення» аміногрупи: при обробці піролопіразолу **1.69** сумішню ацетату купруму (II), біпіридину, циклопропілфтороборату та карбонату натрію було одержано 1-циклопропіл-3-амінопіразол **1.70**, який в реакції з гідроксиламіном утворює 3-амінопіразол **1.71** (Рис. 1.28) [34].

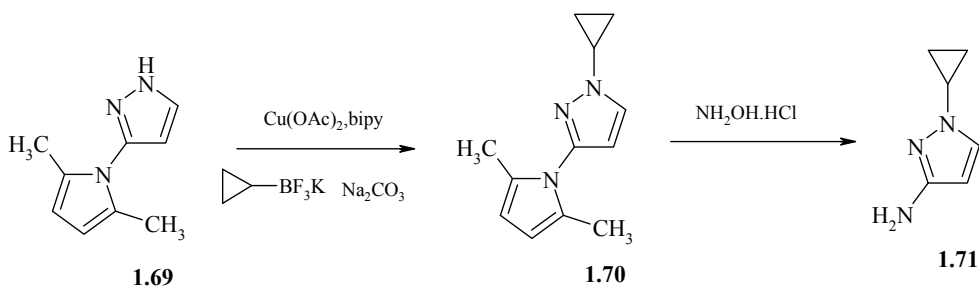


Рис. 1.28 Синтез 3-аміно-1-циклопропілпіразолу.

Слід відмітити, що існує також безліч циклізацій, кінцевими продуктами яких є конденсовані системи з ядром піразолу. Однак, вони не є предметом розгляду і обговорення у даному огляді.

1.2 Лікарські препарати з фрагментом піразолу

Фрагмент піразолу досить часто входить до структури синтетичних фармацевтичних субстанцій, які є основою багатьох лікарських засобів різнонаправленої дії. З 1884 року і по нині в медичній практиці препаратами першої лінії знеболення залишаються похідні піразолону-5. Однак, цими властивостями фармакологічний потенціал полізаміщених піразолів не обмежується. На сьогодні відомо декілька десятків препаратів, що в хімічному

плані відносяться до моноядерних піразоловмісних систем. Наприклад, *целекоксиб* має протизапальну дію та інгібує ЦОГ-2; *римонабант* взаємодіє з каннабіноїдними рецепторами і використовується в лікуванні ожиріння; *фомепізол* пригнічує алкогольдегідрогеназу; а *силденафіл* – фосфодіестеразу. Більш широка інформація щодо лікарських препаратів з фрагментом піразолу в структурі представлена в таблиці 1.1.

1.3 Біологічно активні синтетичні речовини з фрагментом піразолу

Похідні піразолу становлять безсумнівний інтерес для фахівців галузі розробки нових фармацевтичних агентів. На даний час значна кількість таких сполук знаходиться на стадії доклінічних та клінічних досліджень. Слід відмітити різноплановість таких досліджень. Їх напрямки значно перевищують набір активностей, притаманний препаратам, які вже використовуються в медичній практиці.

Вплив на центральну нервову систему. Найбільш розповсюдженим можна вважати тестування похідних піразола на їх здатність чинити вплив на ЦНС. Основним механізмом забезпечення зазначеного виду активності є дезактивування моноаміноксидази (MAO) – фермента, що каталізує дезамінування норадреналіну і серотоніну (MAO-A), та 2-фенілетиламін та бензиламін (MAO-B) і є цільовою мішенню для антидепресантів. Також MAO забезпечує біотрансформацію 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (MPTP) на 1-метил-4-фенілпіридиній – нейротоксин, що продукує паркінсонізм.

Прикладом похідних піразолу, що здатні інгібувати MAO є низка N^1 -тіокарбамоїлпохідних 4,5-дигідропіразолів **1.72** (Рис. 1.29) [77].

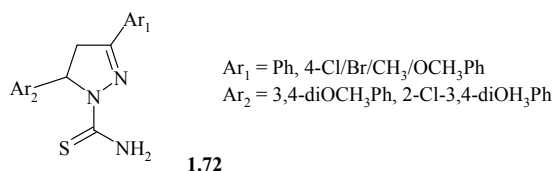


Рис. 1.29 N^1 -тіокарбамоїл-3,5-діарил-4,5-дигідро-(1H)-піразоли.

Таблиця 1.1

Лікарські препарати – похідні піразолу, що використовуються в медичній практиці чи знаходяться на стадії клінічних випробувань

Фармакологічна група чи фармакологічний ефект	Приклади препаратів
Нестероїдні проти-запальні лікарські засоби	Анальгін, Амідопірін, Антипірін, Фенілбутазон, Целекоксиб [58-61], Фампрофазон, Рамефеназон [62], Мавакоксиб [58], Трибузон [10, 61].
Препарати для лікування онкологічних захворювань	Бінуклеїн 2 (метанимідамін) [63], Целекоксиб [64-66], SC-560 [58], Крізотініб (Халкорі) [67], Барасертіб (AZD-1152) [68], Тозасертіб (МК-0457) [69, 70], Пазопаніб (Вотріент) [70], Аксінтіб (AG013736, Інліта), Руксолітініб (INC424, INCB18424, Якафі) [71].
Препарати проти ожиріння	Рімонабант (SR141716; Акомплія) має ефект зниження апетиту [59, 65, 72, 73].
Препарат для лікування ВІЛ	PNU 32945, інгібітор зворотної транскриптази (RTIs), [74].
Інсектицид	Фіпроніл [66].
Противірусний препарат	AS-136A, препарат для лікування вірусу кору [58, 75].
Антикоагулянт	Разаксабан [58, 78, 79].
Інгібітор алкоголь-дегідрогенази	Фомепізол – використовується в антидотній терапії при отруєнні метанолом або етиленгліколем [80].
Синтетичний барвник (харчова добавка)	Тартразин жовтий (E102) [10].

Окремими науковими групами вивчається можливість застосування окремих похідних піразолу для лікування хвороби Паркінсона [81, 82], хвороби Альцгеймера [83-86], тривожних станів та епілепсії [87, 88].

Протипухлинну активність. Більш широко сполуки даного ряду тестуються як протипухлинні агенти. При цьому розглядаються різні механізми дії і досліджується вплив синтезованих сполук на різноманітні ферментні системи. Кіназний шлях відіграє ключову роль у трансдукції мітогенних сигналів від клітинної мембрани до ядра, ти самим регулює клітинний ріст, спроможність ракових клітин до виживання, диференціації та проліферації у відповідь на зовнішні подразники [89]. Кожна з кіназ регулює різні мутації, і фармакологічна корекція кіназного шляху через інгібування окремих ферментів є основним трендом розробки протипухлинних засобів. Найбільш поширеними є пошук серед структур з ядром піразолу інгібіторів EGF-R тирозинкінази [90], CDK2-циклін E комплексу [42, 88, 91-93], BRAFV600E кінази [94, 95], теломерази [96], Fms тирозинкінази (FLT) [97], Auroga A/B кінази [49, 63, 88, 98]. Запропоновано дизайн ряду інгібіторів Auroga A кінази загальної формули **1.73** [99] та **1.74** [100] (Рис. 1.30).

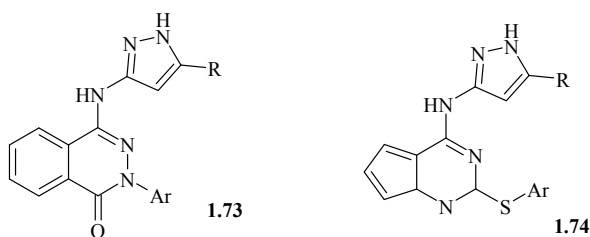


Рис. 1.30 Загальна структура інгібіторів Auroga-A кінази.

Продуктивними є дослідження щодо інгібування Janus 2 (JAK2) тирозин кінази [101] – за результатами обрано сполуку-лідер **1.75** (Рис 1.31).

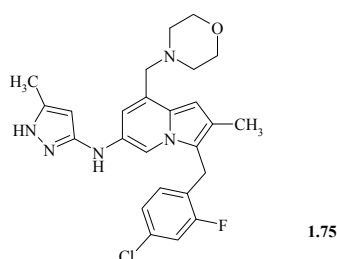


Рис. 1.31 Інгібітор тирозинкінази LY2784544.

Проведено серію експериментів зі встановлення інгібуючої дії 1,3,5-триарилпіразолів щодо L p38 α MAP кінази [102, 103]. За повідомленням [104] 1,3,5-триарилпіразоли **1.76** та 4,5-піразоліни на їх основі показали високу антипроліферативну активність на лініях клітин раку людини SK-OV-3, HT-29, HeLa, BRAFV600E, WM266.5 (клітинна лінія меланоми людини) та MCF-7 (клітинна лінія раку молочної залози людини) (Рис. 1.32).

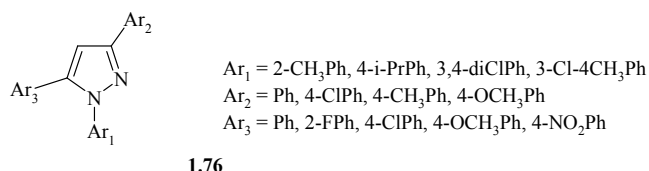


Рис. 1.32 1,3,5-триарилпіразоли.

Активним інгібитором с-MET протеїнкінази стала сполука **1.77** (Рис. 1.33) [105].

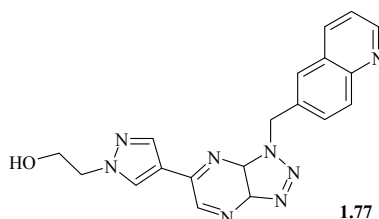


Рис. 1.33 Інгібітор протеїнкінази PF-04217903.

Повідомляється про розробку, синтез та біологічну оцінку серії 4-амінопіразоліліпіримідинів, які містять як замісник цикл піразолу як потужних інгібіторів Trk-кінази. Високопродуктивний скринінг виявив перспективні хемотипи. Подальша оптимізація з використанням двох стратегій призвела до значного поліпшення фармакологічних та фармакокінетичних властивостей і призвела до одержання потужного, перорально біодоступного інгібітора Trk A/B-кінази **1.78** (рис. 1.34) [106].

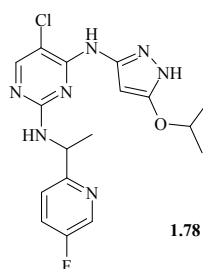


Рис. 1.34 Інгібітор Trk A/B-кінази AZ-23.

Авторами [106-108] одержано незворотні інгібітори c-Src кінази широкого типу **1.79** та продемонстровано покращену ефективність та селективність порівняно з їх зворотніми аналогами. В роботі показано корисність незворотніх інгібіторів у вивченні конформації важливої петлі в кіназах, яка може контролювати селективність інгібітора та спричиняти стійкість до лікарських засобів (Рис. 1.35).

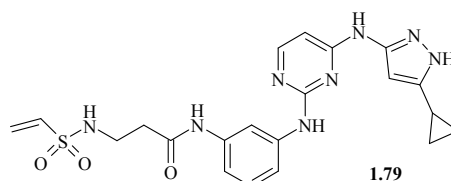


Рис. 1.35 Незворотній інгібітор c-Src кінази.

Описано дизайн, синтез, механізм зв'язування та дано біологічну оцінку нових діазидних зондів на основі піразолу **1.80**, які проявили антипроліферативну та нейропротекторну активність при мікромольних концентраціях шляхом інгібування ядерної Histone деацетилази (HDACs) (Рис. 1.36) [109].

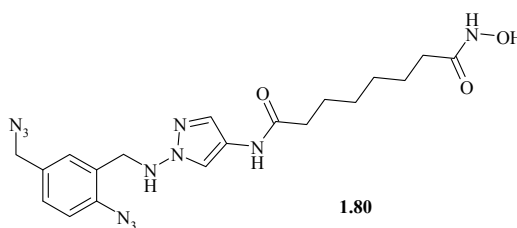


Рис. 1.36 Інгібітор HDAC8.

Окремі роботи присвячені пошуку АТФ-конкурентних інгібіторів МРМ [110] та потенційних антагоністів σ_1 рецепторів (σ_1R) (Рис. 1.37) [111].

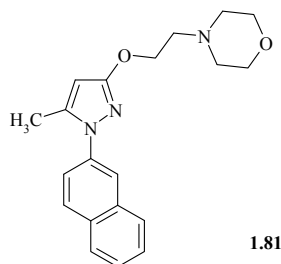


Рис. 1.37 Інгібітор σ_1 -рецепторів людини.

Похідні піразолу показали значну антипроліферативну активність в

терапії карциноми та лейкемії [88, 94, 111-113]. Зокрема, сполука **1.82** показала значну антипроліферативну активність на клітинах аденокарциноми яєчників A2780 людини, на клітинах карциноми легенів людини A549 та клітинах лейкозу мишей P388 [114] (Рис. 1.38).

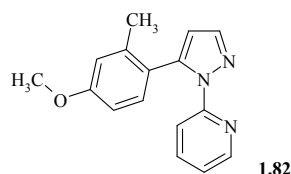


Рис. 1.38 1-(Піридиніл-2)-5-(2'-метил-4'-метоксифеніл)піразол.

Протимікробна та протигрибкова активність. Дослідження щодо визначення впливу похідних піразолу на мікробну клітину не можна вважати досить поширеними, однак вони дещо активізувалися в останні 7–10 років. Зокрема ряд робіт присвячено вивченню активності окремих рядів похідних по відношенню до *Escherichia coli* [65, 88, 115-117], *Bacillus cereus* [88], *Bacillus subtilis* [118], *Aspergillus niger* [88, 118], *Aspergillus Flavus* [88], *Candida albicans* [88, 115], *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* [80], *Stachybotrys atra* [88], *Staphylococcus aureus* [115, 116, 119], *Staphylococcus species* [9], *Micrococcus luteus* [9], *Pyricularia oryzae* [116], *Rhizoctnia solani* [116], *Mycobacterium tuberculosis* [120].

Протимікробну активність синтетичних речовин пов'язують з інгібуванням декількох ферментів, зокрема сульфонаміди мають здатність до зв'язування та інгібування специфічного для метаболізму фолієвої кислоти ензиму дигідрофтоатсинтази (ДГПС) [121], який пов'язаний з біосинтезом дигідрофтоату, ключового інтермедіату в біосинтезі дигідрофолату [122].

Деякі автори вважають, що ключовим фактором антимікробної дії є вплив на ДНК-гіразу, яка належить до класу топоізомераз, і регулює процес реплікації, транскрипції та рекомбінації ДНК мікробної клітини [123].

Гomez та співавт. провели синтез серії нових похідних піразолу, серед яких сполука **1.83** була описана як найбільш активна і така, що має потужну

антибактеріальну дію на низку грампозитивних та грамнегативних штамів бактерій [124, 125] (Рис. 1.39).

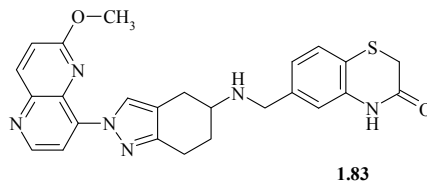


Рис. 1.39 1-(Піридиніл-2)-5-(2'-метил-4'-метоксифеніл)піразол.

Як видно із наведеного аналізу, системного вивчення протимікробних властивостей синтетичних похідних з ядром піразолу не проводилось. Скринінг зазвичай проводили на 7–10 стандартних штамів мікроорганізмів за різними методиками (посів в лунки, метод дисків, метод серійних розведень), тому проводити кореляцію отриманих результатів досить складно.

Противірусна активність. Не зважаючи на значний рівень «лікоподібності» лінійних молекул з фрагментом піразолу, дослідження щодо їх противірусних властивостей також поодинокі [88]. У більшості випадків – це конденсовані структури, як наприклад, бібліотека сполук загальної формули **1.84** (Рис. 1.40) [126].

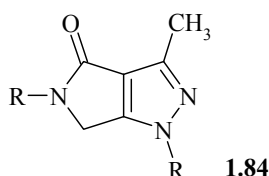


Рис. 1.40 Базова структура бібліотеки речовин противірусної дії.

Гепатопротекторна активність. На увагу заслуговує наявність у низки похідних піразолу гепатопротекторних властивостей. Так група похідних піразолу – структурних аналогів силімарину показала в експерименті значний рівень протекторної дії при токсичному ураженні печінки хімічної природи [127].

Противірусна активність по відношенню до *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* показали полізаміщені піразоли з вільною амінною

та амідною групами **1.85** [128] (Рис 1.41).

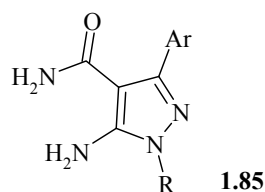


Рис. 1.41 Базова структура бібліотеки речовин антигельмінтної дії.

Наведені приклади наявності у сполук ряду піразолу токсичної дії по відношенню до *Trypanosoma brucei* [113] та *Trypanosoma cruzi* [116, 129].

Автори повідомляють щодо фунгіцидної активності серії похідних піразолу **1.86**, що містять цикл 1,2,3,4-тетрагідрохіноліну, відносно *G. graminis var. tritici* співмірної з комерційним фунгіцидом піраклостробіном [130] (Рис. 1.42)

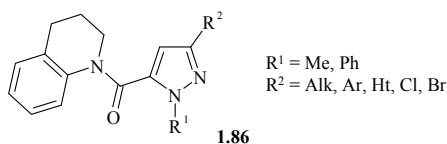


Рис. 1.42 Агрохімічні фунгіциди – похідні піразолу.

Та все ж основним видом активності, за яким найчастіше відбувається тестування нових синтезованих похідних залишаються **протиzapальна та знеболювальна дія**. Її напряду пов'язують із здатністю молекул зазначеного класу ефективно взаємодіяти з низкою ферментів запалення і таким чином впливати на різні фактори запального процесу. Для піразолів притаманна здатність інгібувати циклооксигеназу (ЦОГ), яка є ключовим ферментом в біосинтезі простаноїдів, тромбоксанів та простациклінів, тим самим активно впливає на процес запалення [60, 62, 131]. Приклад ефективного інгібітора ЦОГ-2 за результатами – сполука **1.87** [132] (Рис. 1.43).

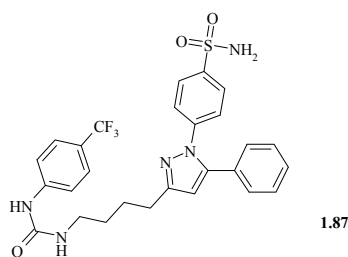


Рис. 1.43 Інгібітор ЦОГ-2.

Як інгібітори інтерлейкін 2 індукованої кінази Т-клітин досліджено групу речовин загальної формули **1.88** [133] (Рис. 44)

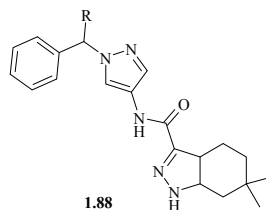


Рис. 1.44 Інгібітори інтерлейкін 2 індукованої кінази.

Механізм протизапальної дії похідних піразолу може бути пов'язаний з інгібуванням p38 MAP кінази [12, 31] або з антагоністичною дією на A_{2B} аденозінорецептори [134] чи рецептори брадикідину B₁, як у випадку сполуки **1.89** [135] (Рис. 1.45).

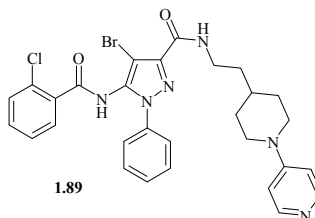


Рис. 1.45 Інгібітор брадикінінових рецепторів B₁.

Таким чином, як хімічний, так і фармакологічний потенціал малих молекул з основою піразолу далеко не вичерпаний. Сучасні хімічні та біологічні скринінгові технології надають великі можливості покрокового варіювання замісниками, що, в свою чергу, має привести до «ідеальної молекули з ідеальними властивостями».

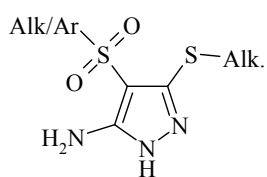
РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМКУ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

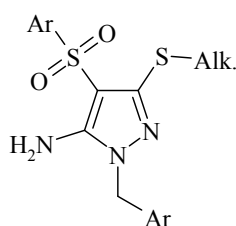
Дизайн дослідження полягає у виборі основного скафолду для конструювання нових молекул, встановленні основних напрямів функціоналізації базової структури, конструюванні бібліотеки перспективних біологічно активних речовин, проведенні *in silico* скринінга з метою відбору сполук для біологічного тестування, здійсненні синтеза, доведенні структури одержаних сполук, проведенні серії мікробіологічних випробувань, встановленні «сполуки-лідера», розробці МКЯ на активну субстанцію.

Ключова ідея проекту – поєднання в одній структурі низки фрагментів, які є фармакофорними угрупованнями з протимікробною та протигрибковою активністю. Виходячи з даних літератури, похідним піразолу притаманні дані види активності, однак дослідження з цього напрямку не мають системного характеру. Інформація щодо похідних 4-арилсульфонілпіразолів, що поєднують фрагмент піразолу та потужну фармакофорну групу – сульфоарильний радикал, як сприятливого скафолду для розробки нових біологічно активних речовин практично відсутня. Тому питання розробки методів синтеза таких сполук та дослідження їх властивостей в хімічному та біологічному експерименті є актуальним, логічним і має практичний сенс. Окремим завданням стало посилення протимікробної дії шляхом введення додаткових замісників в піразольний цикл, зокрема тіоалкільного та амінофенільного радикалів в положення 3 гетероциклу.

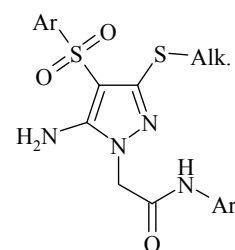
Окремим синтетичним завданням стало проведення реакцій алкілювання заміщених піразолів, оскільки покрокова заміна радикалів в бензильних та ацетамідних фрагментах має впливати на силу прояву ефекту. Плануючи експеримент з ацилювання за аміногрупою, ми розраховували на зміну розчинності, ліофільності та токсичності кінцевих продуктів. Об'єктами досліджень стали функціоналізовані заміщені амінопіразолу (Рис. 2.1).



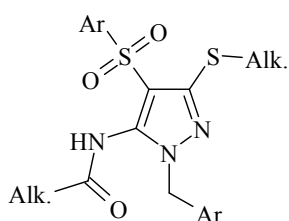
4-алкіл/арилсульфоніл-
5-аміно-3-
алкілтіопіразоли



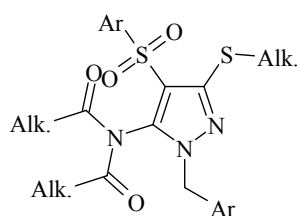
*N*¹-бензил-4-
арилсульфоніл-5-
аміно-3-алкіл-
тіопіразоли



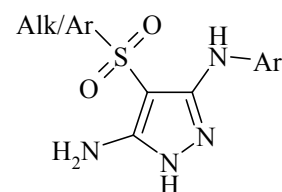
*N*¹-(*N*-
арил)ацетамідо-4-
арилсульфоніл-5-
аміно-3-
алкілтіопіразоли



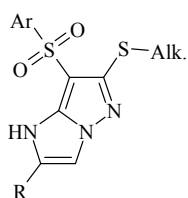
*N*¹-бензил-4-арилсуль-
фоніл-5-(*N*-ациламіно)-
3-алкілтіопіразоли



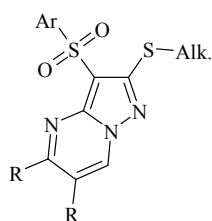
*N*¹-бензил-4-арилсуль-
фоніл-5-(*N,N*-
діациламіно)-3-
алкілтіопіразоли



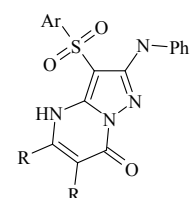
4-
алкіл/арилсульфоніл-
5-аміно-3-ариламіно-
піразоли



2-метил/арил-6-метил-
тіо-7-арилсульфоніл-
1*H*-імідазо[1,2-*b*]-
піразоли



5(2-метилтіо)-3-
арилсуль-
фонілпіразоло[1,5-
а]піримідини



2-феніламіно-3-(4-
метилфеніл)сульфо-
нілпіразоло[1,5-*a*]-
піримідин-7(4*H*)-они

Рис. 2.1 Об'єкти досліджень

2.1 Синтез об'єктів дослідження та встановлення їх будови

Синтез нових похідних на основі базової структури 3(5)-амінопіразолу, які є об'єктами дослідження, здійснювали з використанням методів органічного синтезу. Структуру кінцевих продуктів встановлювали за допомогою пакету сучасних фізико-хімічних методів (елементний аналіз, ЯМР-спектроскопія, масспектрометрія, високоефективна хроматографія).

Розчинники та реагенти отримували із доступних комерційних джерел та використовували без додаткового очищення.

Температуру плавлення (°C) вимірювали на приладі Кофлера.

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) здійснювали на алюмінієвих пластинках Silufol UV254 5 cm × 15 cm (Kavalier, Czech Republic) та на пластинках Merck, Kiesgel 60 F-254 із шаром силікагелю 250 мкм.

Елементний аналіз виконували на приладі EuroVector EA-3000.

¹H ЯМР-спектри записували на спектрометрах Varian Mercury-200, Varian Mercury-400, Bruker 170 Avance 500 та Bruker Avance DRX 500 при 200, 400, 500 та 500 МГц відповідно; спектри ¹³C ЯМР – на спектрометрах Varian Gemini-400 та Bruker Avance DRX 500 при 100 та 125 МГц відповідно, в розчинах ДМСО-*d*₆, CDCl₃, внутрішній стандарт – ТМС, хімічний зсув розраховували в м.ч.

Склад реакційної суміші визначали методом ВЕРХ на Shimadzu 10-AV (колонка Luna-C18, Phenomenex, 25 см x 4.6 мм, UV детектування при 215 і 254 нм) та РХ-МС на Applied Biosystems (Shimadzu 10-AV LC, Gilson-215, мас-спектрометр API 150EX, детектор UV (215 і 254 нм) та ELS, колонка Luna-C18, Phenomenex, 5 см x 2 мм). За даними LC/MS синтезовані речовини мають чистоту >90%.

LC/MS-спектри записували на приладі Agilent 1100 HPLC з діодною матрицею та мас-детектором (Agilent LC-MSD SL), колонка Zorbax SB-C18 (4,6 мм × 15 мм) з хімічною іонізацією при атмосферному тиску (APCI) та Applied Biosystems (Shimadzu 10-AV LC, Gilson-215 автоматична подача

зразка, мас-спектрометр API 150EX, детектори UV (215 и 254 нм) и ELS, колонка Luna-C18, Phenomenex, 5 см × 2 мм, іонізація електророзпилювачем).

2.2 Віртуальний скринінг біологічної активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолів

Визначення профілю біологічної активності синтезованих сполук проводили за допомогою сучасної версії комп'ютерної платформи прогнозу спектра біологічної активності PASS C&T (Prediction Activity Spectra for Substances: Complex & Training) [136]. Веб-інструмент PASS має можливість прогнозувати близько 4 тис фармакологічних ефектів (основних та побічних), механізмів дії, токсичних ефектів молекули (мутагенність, канцерогенність, тератогенність та ембріотоксичність). Середня точність прогнозу становить 85%. Результати прогнозу включають імовірність наявності (P_a) та імовірність відсутності (P_i) для кожного виду активності за шкалою від 0 до 1. Розрахунки проводяться незалежно за окремими вибірками активних та неактивних сполук.

Молекулярний докінг проводили методом швидкої стиковки за допомогою програмного забезпечення SCIGRESS (ліцензія 742F6852C191).

Кристалічні структури ферменту ДГПС з нативними лігандами одержані з Protein Data bank [137] (PDB codes 1AJ0, 3TYE). Для підготовки ферментів проводили додавання атомів водню, пошук альтернативних водневих зв'язків, видалення молекул води, лігандів та інших гетерокомпонентів. Активний сайт визначався як оточення нативного ліганду – сульфаніламід (1AJ0) або сульфатіазолу (3TYE).

Формули синтезованих речовин та лігандів завантажували до проекту програми SCIGRESS у вигляді .mol-файлів. 3D-Оптимізацію структур здійснювали методом молекулярної механіки MM3 (стандартний пакет у SCIGRESS).

Скорингові функції розраховано методом FastDock для підготовлених структур ферментів, лігандів та синтезованих речовин (жорсткий ліганд-гнучкий активний сайт).

Моделювання взаємодії *N*-(2'-флюоро-4'-бромофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетаміду з дигідрооптероатсинтазою (ДГПС) проводили за допомогою програм: ISISDraw 2.3, Discovery studio Visualizer4.0, Python molecule viewer та Autodock Vina.

Моделювання проводили для гнучкої моделі ліганду та жорсткої моделі білка. Кристалографічні дані для білка дигідрооптероатсинтази (ДГПС) були одержані з ресурсу Protein Data Bank [138].

Дані розрахунків верифікували шляхом співставлення із кристалографічними даними положення молекули-порівняння в активному сайті ферменту з просторовим розташуванням досліджуваної молекули завдяки взаємодії з однаковим набором амінокислотних залишків білка.

2.3 Мікробіологічні методи досліджень

Дизайн біологічних досліджень включав мікробіологічні (протимікробні та протигрибкові) випробування. Вибір моделей та методів дослідження обумовлено поставленими завданнями, відповідністю до сучасних критеріїв, інформативністю, собівартістю, дотриманістю принципів етики та збереженням навколишнього середовища.

Визначення протимікробної та протигрибкової активності (первинний скринінг)

Дослідження протимікробної активності синтезованих сполук проводили на базі лабораторії протимікробних засобів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова НАМНУ» під керівництвом к. мед. наук, ст. н. с. Казмірчука В.В.

Протимікробну і протигрибкову активність синтезованих сполук вивчали *in vitro* за методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищах [139]. Речовини розчиняли у ДМФА, для

культивування мікроорганізмів використовували бульон Хоттінгера (рН 7,2–7,4). Мікробне навантаження до музейних штамів становило 10^6 мікробних одиниць на 1 мл середовища. Для культивування грибів роду *Candida* використовували середовище Сабуро з мікробним навантаженням 10^5 мікробних одиниць.

Як мікробіологічну модель для первинного мікробіологічного скринінгу використовували набір клінічних і референс-штамів мікроорганізмів, які за морфофункціональними властивостями належать до груп збудників інфекційних та гнійно-запальних захворювань та рекомендовані Державною Фармакопесю України [140] для визначення протимікробних препаратів (табл. 2.1). Визначення протимікробної активності синтезованих речовин проводили у відповідності до вимог Наказу МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. щодо «Порядку проведення до клінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів до клінічного вивчення лікарських засобів».

Таблиця 2.1

Мікроорганізми, які були використані при дослідженні протимікробної активності синтезованих сполук (первинний скринінг)

№ п/п	Найменування мікроорганізму	Місце знаходження штаму
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ»
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ»
3	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ»
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ»
5	<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312	Кафедра імунології та мікробіології ХМАПО
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ»

В якості поживних середовищ використовували м'ясо-пептонний агар, м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний бульйон Хоттінгера (135 мг%

амінного азоту, рН 7,2-7,4), глюкозо-пептонний бульйон. Вибір середовища здійснювали згідно методичних рекомендацій та з урахуванням властивостей культивування окремих мікроорганізмів. Для культивування грибів роду *Candida* використовували середовище Сабуро.

В експерименті оцінювали бактеріостатичні та бактерицидні концентрації для кожної речовини. Мінімальну бактеріостатичну концентрацію (МБ_{ст}К) визначали як відсутність видимого росту мікроорганізмів в рідкому поживному середовищі (прозорість середовища в пробірках). Мінімальну бактерицидну концентрацію (МБ_цК) фіксували за відсутності помітного росту мікроорганізмів при висіві із пробірок на тверде поживне середовище. Мікроскопічні дослідження проводили під мікроскопом “Біолан” при збільшенні x 100, x 200, x 400. Всі досліди супроводжували відповідними контролюми (контроль середовища, розчинника, культури мікроорганізмів) і повторювали тричі.

Як препарати порівняння було обрано *Палін* – сучасний протимікробний засіб класу флюорохінолонів, *Невіграмон* – похідне налідиксової кислоти та *Флуконазол* – протигрибковий засіб.

Мінімальні бактеріостатичні концентрації препаратів порівняння наведені в таблиці (табл. 2.2):

Таблиця 2.2

Мінімальні бактеріостатичні концентрації препаратів порівняння

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Palinum	6.25	25.00	12.50	12.50	12.50	12.50
Nevigramon	50.00	6.25	50.0		6.25	
Fluconazolium						50.00

Методика визначення протимікробної та протигрибкової активності синтезованих сполук. Досліджувані речовини аналізували у

вигляді розчинів в ДМФА, вихідна концентрація 1 мг/мл. Окремо готували поживне середовище та розливали його в 10 стерильних пробірок по 2 мл. В першу із пробірок кожного ряду за стерильних умов вносили по 2 мл розчину досліджуємої речовини, перемішували страхуванням. Далі 2 мл суміші переносили в наступну пробірку. Процедуру повторювали з повним рядом пробірок. Із останньої пробірки 2 мл рідини видаляли. В кожному ряду одну пробірку з 2 мл поживного середовища залишали як контроль середовища. Таким чином було підготовлені послідовні розведення кожної з речовин в рідкому середовищі в концентрації від 400 до 0.02 мкг/мл. Далі до пробірок вносили тест-культури в кількості 10^6 клітин в 1 мл, та залишали їх на інкубацію на 24 год при температурі 37°C.

Визначення протимікробної та протигрибкової активності (поглиблене вивчення)

Для поглибленого вивчення протимікробної активності синтезованих речовин було використано 37 музейних та клінічних референтних тест-штамів мікроорганізмів. Було обрано грампозитивні і грамнегативні бактерії, різні за таксономічними характеристиками (табл. 2.3). Всі штами мікроорганізмів виявляли типові морфологічні, тинкторіальні та культуральні властивості.

Визначення формування резистентності мікроорганізмів

Формування резистентності мікроорганізмів до досліджуваних сполук вивчали методом пасажування мікроорганізмів на м'ясо-пептонний бульйон з наростаючими концентраціями речовин за методикою *Szybalski W.* Тест-культури (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 та *C. albicans* ATCC 885-623) вирощували у відповідних поживних середовищах

2.4. Статистичні методи

Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм Statistica 6.0 та Excel.

Таблиця 2.3

Мікроорганізми, які були використані при дослідженні протимікробної активності синтезованих сполук (поглиблене вивчення)

№ п/п	Найменування мікроорганізму	Місце знаходження штаму
1	2	3
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
3	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
6	<i>Bacillus anthracoides</i> 1312	Кафедра імунології та мікробіології ХМАПО
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
8	<i>Shigella flexneri</i> ГІСК 170	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
9	<i>Shigella sonnei</i> ГІСК 5772	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
10	<i>Proteus vulgaris</i> X 19 4137 “Н”	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
11	<i>Enterobacter aerogenes</i> 418	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
12	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
13	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
14	<i>Salmonella enteritidis</i> , гр. P, Y/ ratin № 27	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> K-7 NCTC 9127	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
16	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16580	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
17	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16581	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»

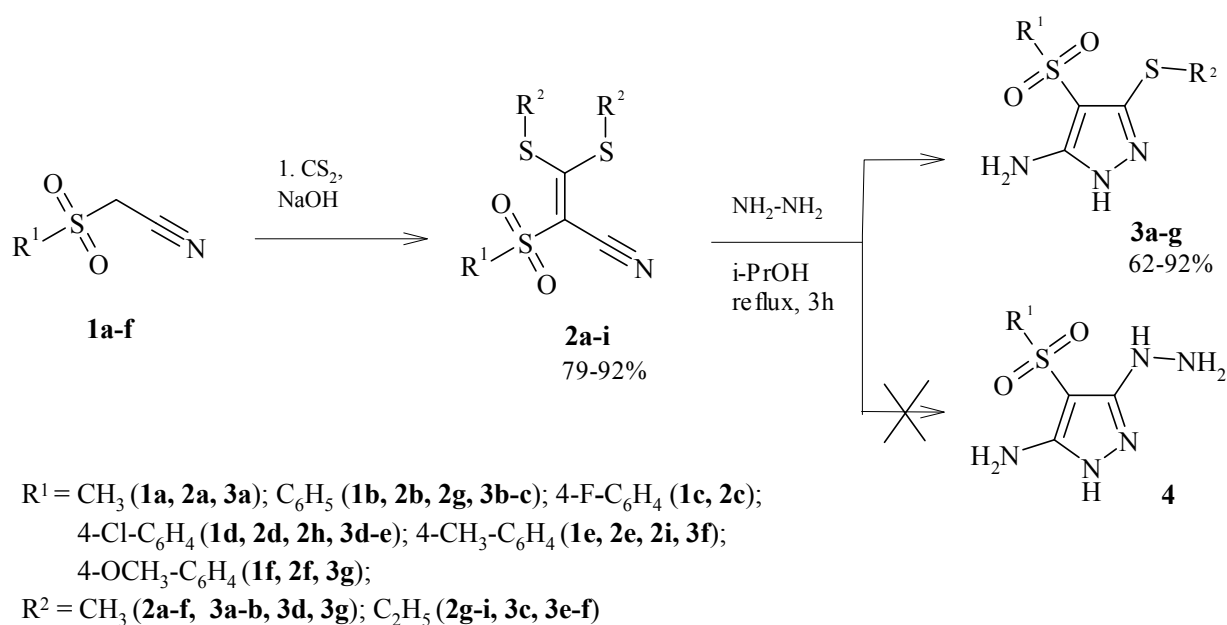
18	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16583	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
19	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16586	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
20	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16588	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
21	<i>Staphylococcus epidermidis</i> № 16589	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
22	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16590	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
23	<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> № 16591	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
24	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16592	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
25	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> № 16593	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
26	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16594	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
27	<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> № 16595	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
28	<i>Staphylococcus aureus</i> № 16561	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
29	<i>Candida pseudotropicalis</i> ВКПГ у 601/33	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
30	<i>Candida parapsilosis</i> ВКПГ у 488/10	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
31	<i>Candida kefyr</i> 85/2	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
32	<i>Candida famata</i> 40 б/з	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
33	<i>Candida famata</i> 18/2	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
34	<i>Candida catenulata</i> (Скляр-27)	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
35	<i>Candida albicans</i> (Скляр-31)	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
36	<i>Candida albicans</i> (Скляр-20)	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»
37	<i>Candida rugosa</i> (Скляр-2/1)	Філія музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ»

РОЗДІЛ 3

4-АЛКІЛ/АРИЛСУЛЬФОНІЛ-5-АМІНО-3-АЛКІЛТІОПІРАЗОЛИ ТА
4-АЛКІЛ/АРИЛСУЛЬФОНІЛ-5-АМІНО-3-АРИЛАМІНОПІРАЗОЛИ3.1 Синтез 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів,
продуктів їх алкілювання та ацилювання

Метиленактивні нітрили – перспективні синтони для побудови комбінаторних бібліотек сполук, зокрема таких, що містять ядро піразолу. Для втілення одного з можливих напрямків гетероциклізацій нами запропоновано низку синтетичних процедур на основі алкіл/арилсульфонілацетонітрилів **1a-f**. Їх синтез здійснювали за реакцією відповідних алкіл/арилсульфохлоридів з хлорацетонітрилом. Алкіл/арилсульфоніл-[2,2-*bis*-(метилтіо)вініл]ацетоннітрили **2a-i** отримували за реакцією ацетонітрилів **1** з сірковуглецем та метилйодидом (схема 3.1). Використання етилхлориду дало змогу отримати *S,S*-діетильні аналоги **2g-i**. Дитіоацетали є зручними інтермедіатами в синтезі багатьох гетероциклічних систем, зокрема в реакціях з нуклеофільними агентами з наступною циклізацією.

Схема 3.1



S,S-Ацетали **2** при кип'ятінні з гідразин-гідратом в пропанолі-2 утворюють 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразоли **3a-g**. Формування циклічної системи піразолу підтверджено даними ^1H ЯМР-спектрів, а саме наявністю синглетного сигналу протону NH-групи піразольного циклу при δ 11.22...12.00 м.ч. та сигналів аміногрупи в межах δ 5.80...6.21 м.ч. Всі інші сигнали протонів спостерігаються в звичайних для них резонансних межах (рис. 3.1, розділ 6).

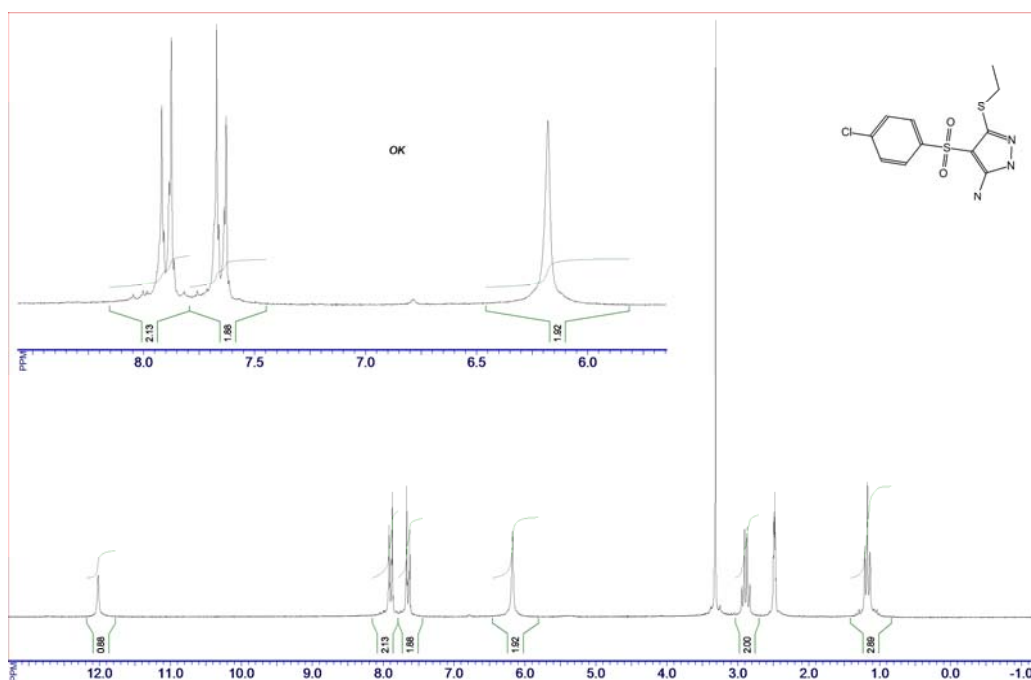


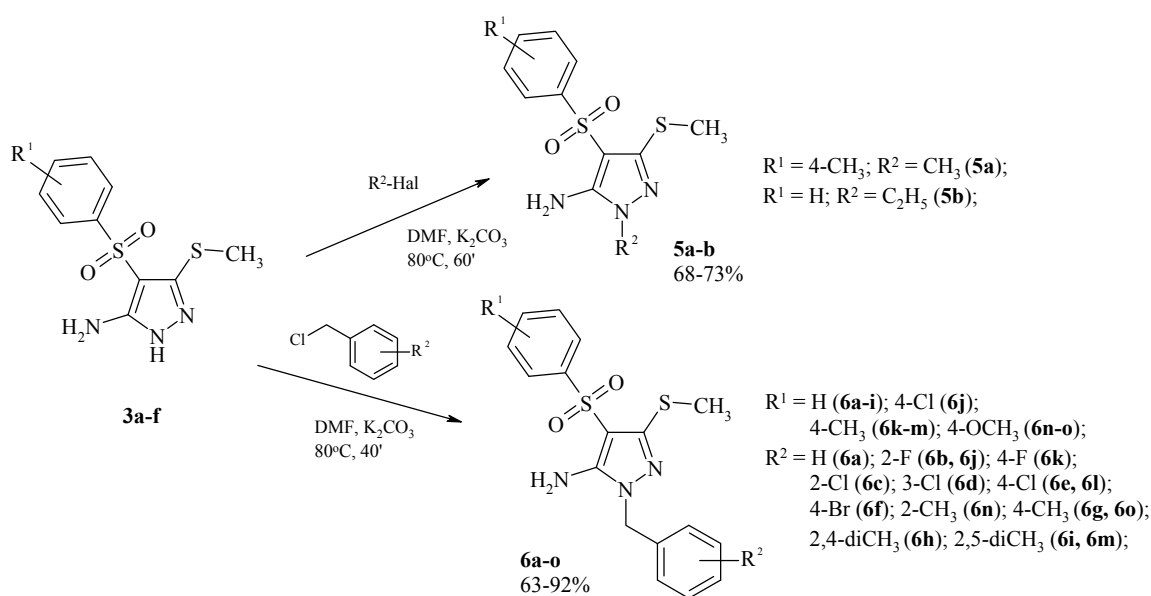
Рис. 3.1 ^1H ЯМР-спектр 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразолу **3e**.

Слід зазначити, що в ході реакції не відбувається утворення домішок відповідних 5-аміно-3-гідразінопіразолів **4**, на відміну від аналогічної взаємодії 3-*RI*-5-[1-ціано-2,2-*bis*-(метилентіо)вініл][1,2,4]оксадіазолів з гідразин-гідратом, де зареєстровано утворення 3-гідразіно-4-(3-*RI*-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразол-5-амінів [37]. Також не відбувається заміщення тіометильної групи на амінну функцію при спробі провести взаємодію сполук **3** з амінами. Ймовірно, в складі піразолу метилтіогрупа повністю втратила властивості

S-ацеталю. Саме тому для одержання 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкіл-амінопіразолів нами використано інший підхід (розділ 3.2).

Наступним етапом перетворень стало селективне алкілювання 5-аміно-3-метилтіопіразолів **3**. В якості алкілюючих агентів обрано фармакологічно привабливі алкілгалогеніди, бензилхлориди та хлорацетаміди з арильними фрагментами, що не містять токсикогенних чи обтяжуючих замісників (схема 3.2). Такий прийом дозволяє швидко одержувати значні масиви однотипових сполук з широким набором замісників в окремих фрагментах молекул.

Схема 3.2

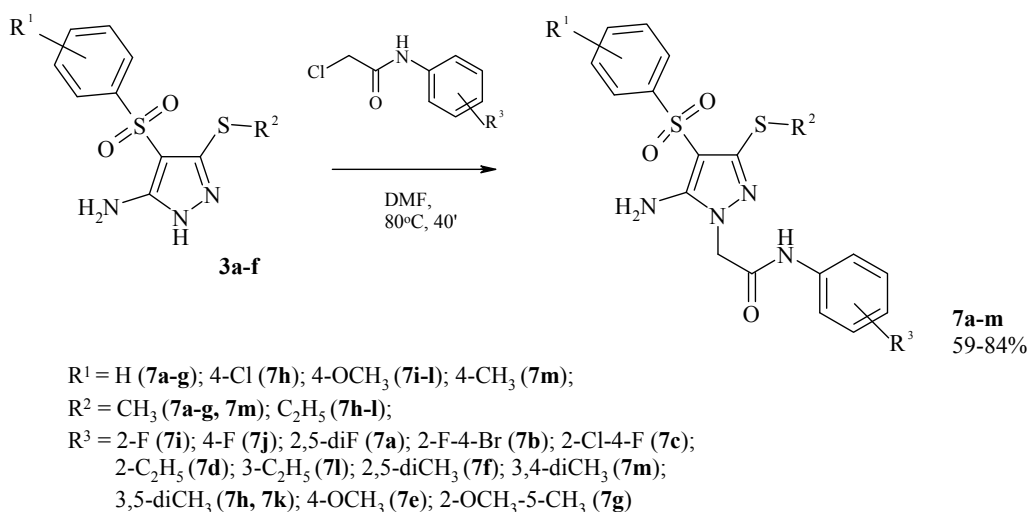


Слід зазначити, що наявність в молекулі декількох нуклеофільних центрів передбачає можливість перебігу реакції за декількома напрямками. І, якщо алкілювання аміногрупи за даних умов малоімовірно, то утворення позиційних ізомерів *N*¹- та *N*²-алкілювання 5-амінопіразолу цілком очікувано. Реакцію проводили в ДМФА в присутності K₂CO₃. В результаті нами одержано виключно продукти *N*¹-заміщення (схема 3.2). В спектрах ¹H-ЯМР *N*¹-алкіл-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів **5a-b** характерними є синглетні сигнали протонів аміногрупи в межах δ 6.26...6.32 м.ч. та сигнали алкільних замісників в положенні 1 піразолу відповідної мультиплетності.

Утворення N^1 -бензил-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів **6a-o** підтверджується наявністю в спектрах ^1H -ЯМР синглетних сигналів метиленової групи в області δ 5.04...5.18 м.ч., синглетних сигналів протонів NH_2 -групи (δ 6.37...6.52 м.ч., сигналу протонів метилтіогрупи (δ 2.24...2.36 м.ч.) та сигналів ароматичних протонів у відповідних межах.

Досить поширеним синтетичним протоколом є алкілювання нітрогено- або сульфурвмісних сполук з використанням N -ариламідів хлороцтової кислоти. Кінцеві продукти при розведенні реакційної маси розчином спирту утворюють забарвлений осад від жовтуватого до помаранчевого кольору. Виходи цільових продуктів сягають 63-92% в залежності від природи реагентів (схема 3.3).

Схема 3.3



Клас N -арил-(5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамідів **7a-m** досить чітко ідентифікується за наявністю в спектрах ^1H -ЯМР синглетних сигналів NH -протонів (δ 9.23...10.35 м.ч.) і протонів метиленової групи (δ 4.67...4.85 м.ч.) в складі ацетамідного фрагмента, синглетних сигналів протонів аміногрупи (δ 6.23...6.87 м.ч.), сигналів відповідної мультиплетності алкільного замісника в тіогрупі та сигналів ароматичних протонів у відповідних межах.

Утворення продуктів N^1 -заміщення також підтверджується наявністю взаємодії між протонами CH_2 фрагмента ацетаміду (біля 4.80 м.ч.) та аміногрупи (близько 6.50 м.ч.) у спектрах NOESY (на прикладі сполуки **7e**, рис. 3.2). При цьому взаємодія між CH_2 -протонами ацетамідного фрагмента і протонами замісників в третьому положенні гетероциклу відсутня.

В ході реакції нами не спостерігалось утворення домішок продуктів N^2 -чи NH_2 -алкілування. Про це свідчать як результати ТШХ (пластинки Silufol, система розчинників гексан – ацетон 9:1), так і дані ^1H -ЯМР-спектроскопії (відсутність подвійного набору сигналів). Також не встановлено подальшого перебігу реакції циклізації з утворенням системи піразоло[1,5-*a*]піримідину, про що свідчить наявність в спектрах ^1H ЯМР сигналів вільної аміногрупи та успішний перебіг реакції її подальшого ацилювання.

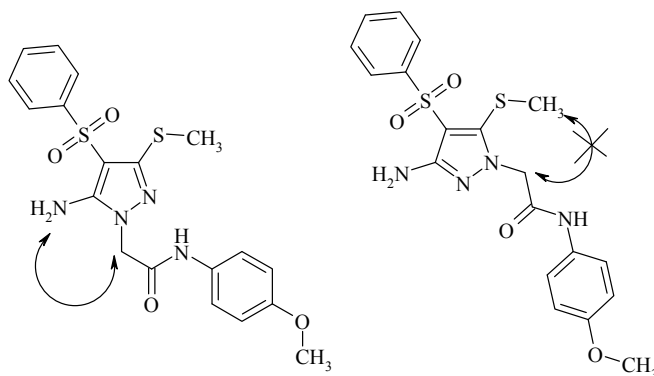
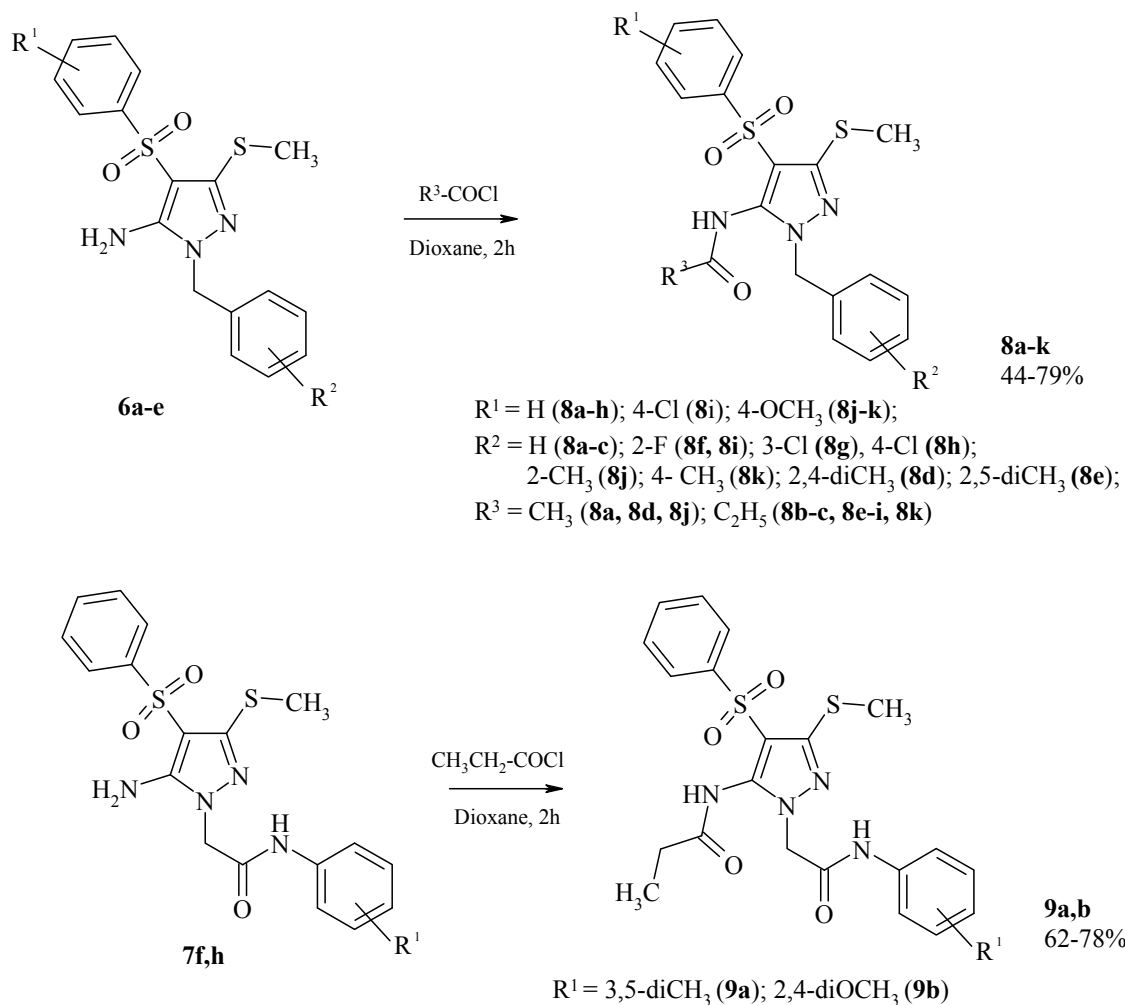


Рис. 3.2 Взаємодія протонів за даними NOESY-експеримента для 5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразолу **7e**.

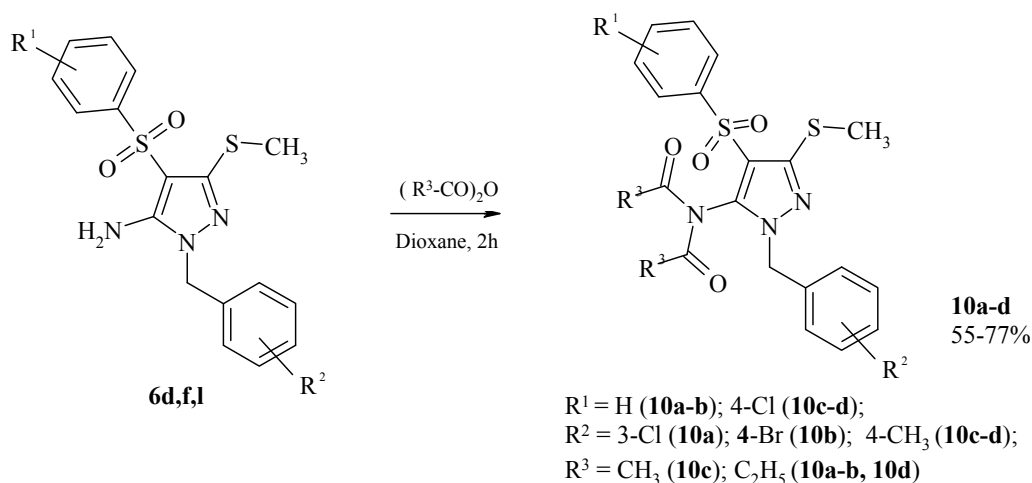
Для проведення реакції ацилювання було використано низку хлорангідридів карбонових кислот, а саме ацетилхлорид, пропіонілхлорид та хлорангідрид хлороцтової кислоти (схема 3.4). Реакцію здійснювали шляхом короткочасного кип'ятіння реагентів в середовищі діоксану. Зникнення сигналу протонів аміногрупи і поява додаткового сигналу NH -протонів в області 10.20...10.30 м.ч. ^1H -ЯМР-спектрів свідчать про успішний перебіг реакції і утворення моноациламінопохідних **8a-k**, **9a-b**. Підтвердженням перебігу моноацилювання також є дані маспектрометрії.

Схема 3.4



При використанні в даній реакції надлишку ангидридів карбонових кислот (оцтової, пропіонової) виділено *N,N*-діациламінопохідні **10a-d** (схема 3.5). При цьому в спектрах продуктів спостерігається сигнал *NH*-протонів ариламідного фрагмента та сигнали протонів ацильних фрагментів при 0.80...0.85 м.ч. та 2.35...2.55 м.ч. з подвійною інтегральною інтенсивністю. Дані мас спектрометричного дослідження підтвердили факт перебігу реакції діацилювання.

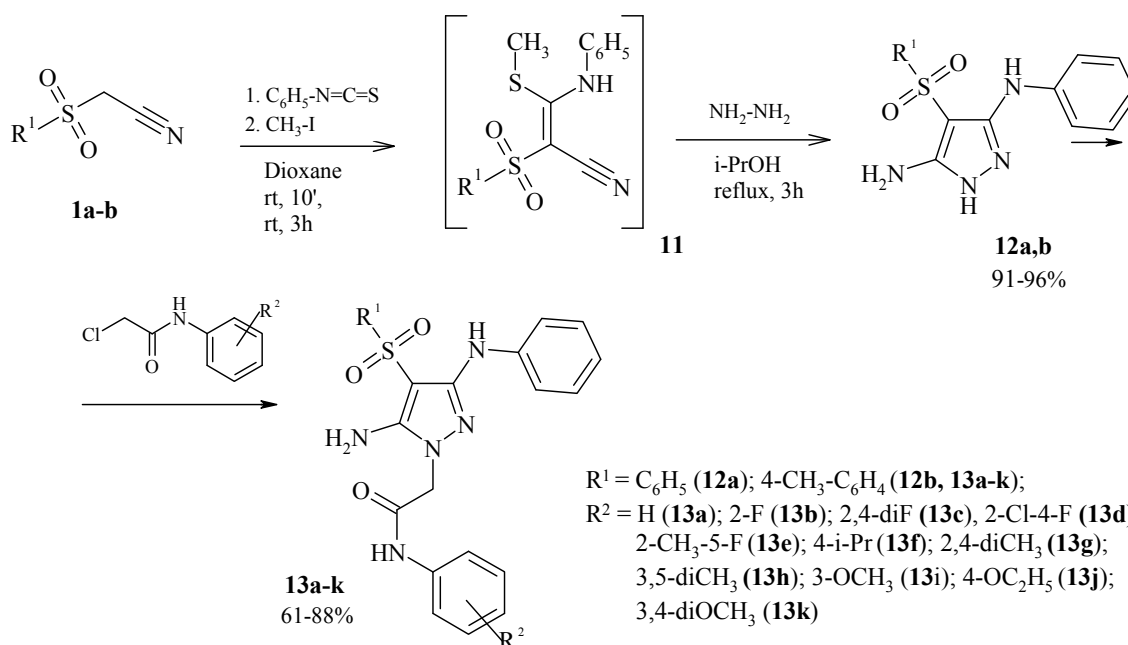
Схема 3.5



3.2 Синтез 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкіламінопіразолів та продуктів їх алкілування

Проведення реакції циклізації алкіл/арилсульфонілацетонітрилів **1a-f** з арилізотіоціанатами в присутності метилйодиду дозволяє перейти до біоізостерних аналогів вищеописаних сполук, а саме до 3-алкіламінопохідних 5-амінопіразолів (схема 3.6).

Схема 3.6



N,S-ацеталі **11** при кип'ятінні з гідразин-гідратом в пропанолі-2 утворюють 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразоли **12**, що підтверджено даними ^1H ЯМР-спектрів, а саме наявністю синглетного сигналу протону NH-групи піразольного циклу при δ 11.95...12.15 м.ч., сигналів аміногрупи в межах δ 6.50...6.55 м.ч. та синглетного сигналу NH-протону ариламінотрупи.

Алкілювання 5-аміно-3-ариламінопіразолів **12** 2-хлороацетамідами при нагріванні у диметилформаміді за присутності K_2CO_3 також відбувається селективно за положенням N^1 5-амінопіразолів.

Дані елементного та спектрального аналізу отриманих сполук узгоджуються із запропонованими молекулярними структурами. Так, відсутність в ^1H ЯМР-спектрах цільових продуктів сигналів NH-протонів вказує на перебіг реакції N^1 -алкілювання. Цей напрямок також підтверджено результатами NOESY-експеримента, де зафіксовано кросс-супряження між протонами CH_2 фрагмента ацетаміду (близько 4.80 м.ч.) та протонами аміногрупи (близько 6.50 м.ч.). Взаємодія між CH_2 -протонами ацетамідного фрагмента і замісників в третьому положенні гетероциклу відсутня.

Характеристичними для зазначеного класу сполук в ^1H -ЯМР-спектрах можна вважати сигнали протонів NH_2 при δ 6.40...6.47 м.ч., сигнал NH-протону ариламідного фрагмента (δ 9.43...10.42 м.ч.), синглетний сигнал групи CH_2 в області δ 4.60...4.78 м.ч. Сигнал протону NH ариламінотрупи перебивається сигналами ароматичних протонів і спостерігається поблизу δ 7.5 м.ч.

3.3 Дизайн комбінаторної бібліотеки полізаміщених піразолів на основі базової структури 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу

Враховуючи можливий фармакологічний потенціал різноманітних похідних 5-амінопіразолів нами здійснено дизайн бібліотеки 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-заміщених піразолів з метою пошуку речовин з проти-

мікробною та протигрибковою дією. Ключова ідея проекту – поєднання в одній структурі низки фрагментів, які є фармакофорними угрупованнями з прогнозуємою активністю, зокрема ядра 5-амінопіразолу, сульфоарильного та тіоалкільного радикалів. Основні напрями хімічної модифікації базової структури 5-амінопіразолу наведені на рис 3.3.

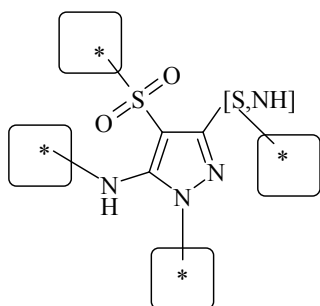


Рис. 3.3 Напрямки модифікації базової структури 5-амінопіразолу для побудови комбінаторної бібліотеки

Розроблені синтетичні протоколи (розділ 3.1, 3.2) досить легко масштабуються на високопродуктивний формат і дозволяють швидко згенерувати і синтезувати фокусовану комбінаторну бібліотеку.

Вихідні *building-blocks* – 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкілтіопіразоли та 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкіл/ариламінопіразоли **2{1-12}** одержували циклізацією *S,S*- чи *S,N*-ацеталей на основі алкіл/арилсульфонілацетонітрилів **1{1-8}** з гідразин-гідратом, таким чином синтетичне завдання введення сульфоарильного фрагмента до структури гетероцикла вирішувалося на першій стадії реакції. З метою збільшення різноманітності аміної компоненти в структурі 3-алкіл/ариламінопіразолів **2{13-25}** (розділ 3.2), зокрема за рахунок вторинних амінів, та враховуючи високу токсичність ізотіоціанатів нами апробована методика одержання *S,N*-ацеталей за двостадійною схемою, а саме взаємодією *S,S*-ацеталей з амінами в киплячому ізопропанолі.

Систематичні ряди *N*¹-алкіл-5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкілтіопіразолів та *N*¹-алкіл-5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкіл/ариламінопіразолів **5{1-47}** синтезували реакцією вихідних 5-амінопіразолів з алкілюючими агентами **3{1-18}** і **4{1-8}** в ДМФА за присутності K₂CO₃. Цей синте-

тичний прийом дозволив одержати низку структурно подібних молекул з пошаговою заміною замісників, що є принципово важливим для проведення скринінгових досліджень і оцінки залежності «структура – активність». Крім того, для нас важливо було синтезувати молекули, які містять декілька конформаційно рухливих циклів (фенільні радикали, поєднані з циклом піразолу через гетероатом або через карбоновий ланцюжок), що значно підвищує ймовірність набуття молекулою «лікоподібних» властивостей (рис. 3.4).

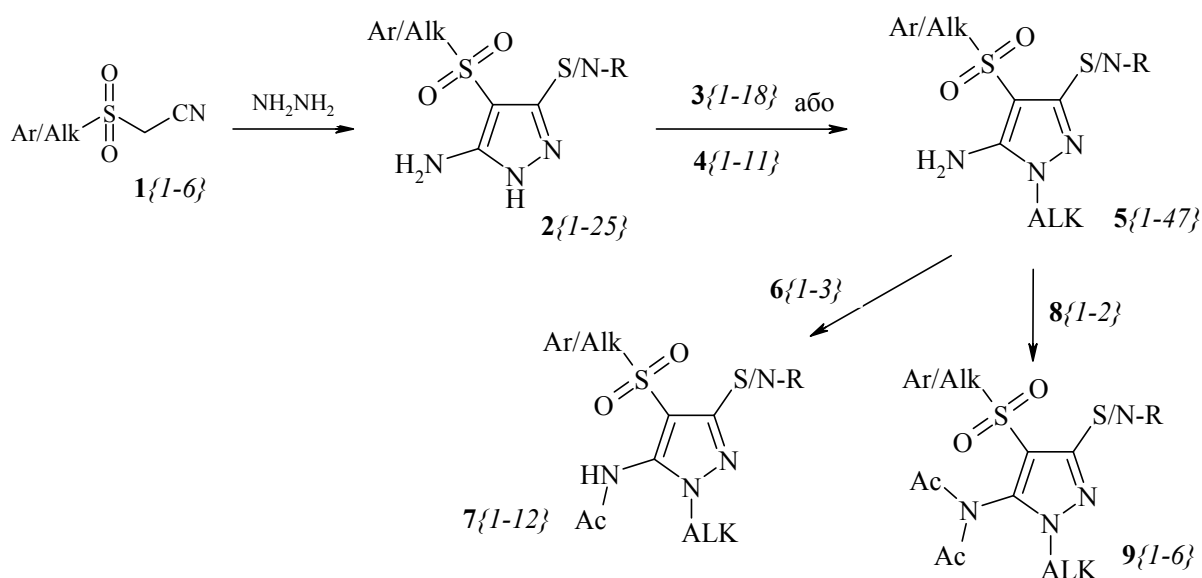


Рис. 3.4 Синтетична схема фокусованої бібліотеки похідних 3,4-дизаміщених 5-амінопіразолів.

Ацилювання аміногрупи дозволяє впливати на ліпофільність молекули – за реакцією з хлорангідрідами **6**{1-3} та ангідридами кислот **8**{1-2} одержували ряди *N*-моноациламіно- **7**{1-12} та *N,N*-діациламінозаміщених 5-амінопіразолів **9**{1-6}. Запропонована стратегія дозволила створити багатовимірну матрицю сполук з пошаговою зміною фрагментів молекули. Зручні протоколи з використанням декількох синтетичних процедур забезпечують можливість одержання понад 900 сполук з максимально доступними та доцільними замісниками (важливо враховувати синтетичні, фармакологічні, токсикологічні, технологічні та фінансові обмеження).

Представлена бібліотека полізаміщених піразолів на основі базової структури 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу може бути використана в різноманітних скринінгових процедурах як віртуальних, так і в реальних тестуваннях на культурах клітин, на ферментах чи біологічних об'єктах [141].

Основні реагенти, які були використані нами для побудови комбінаторної бібліотеки похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфопіразолів наведені в таблиці 3.1.

Для ілюстрації на рис. 3.5 показані декілька довільних сполук, синтезованих у відповідності до розробленої синтетичної схеми.

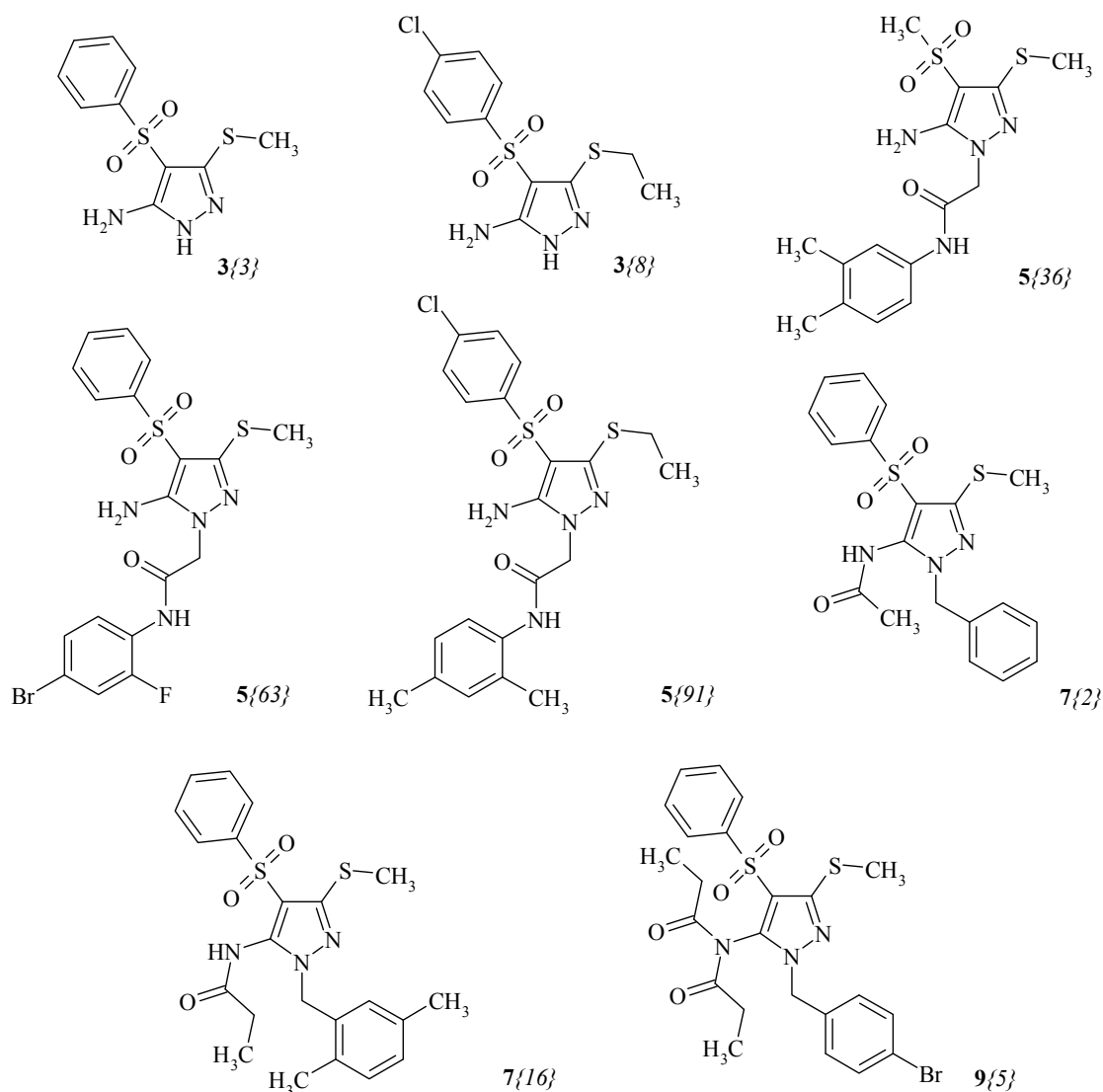


Рис. 3.5 Приклади синтезованих заміщених 5-аміно-3-алкілтіопіразолів.

Таблиця 3.1

**Реагенти, використані для побудови комбінаторної бібліотеки
похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфопіразолів**

Реагенти	Код	Замісники	Код	Замісники
Алкілсульфоацетонітрили 1{1-2}	1{1}	methyl	1{2}	Ethyl
Арилсульфоацетонітрили 1{3-6}	1{3}	phenyl	1{4}	4-fluorophenyl
	1{5}	4-chlorophenyl	1{6}	4-bromophenyl
	1{7}	4-methylphenyl	1{8}	4-methoxyphenyl
Алкілгалогеніди 3{1-18}	3{1}	methyl	3{2}	Ethyl
	3{3}	<i>n</i> -propyl	3{4}	<i>i</i> -propyl
	3{5}	benzyl	3{6}	2-methylbenzyl
	3{7}	3-methylbenzyl	3{8}	4-methylbenzyl
	3{9}	2,4-dimethylbenzyl	3{10}	2,5-dimethylbenzyl
	3{11}	3-methoxybenzyl	3{12}	2-fluorobenzyl
	3{13}	4-fluorobenzyl	3{14}	2-chlorobenzyl
	3{15}	3-chlorobenzyl	3{16}	4-chlorobenzyl
	3{17}	4-bromobenzyl	3{18}	4-ethenylbenzyl
Хлорацетаміди 4{1-11}	4{1}	phenyl	4{2}	2-ethylphenyl
	4{3}	2,5-dimethylphenyl	4{4}	3,4-dimethylphenyl
	4{5}	3,5-dimethylphenyl	4{6}	4-methoxyphenyl
	4{7}	2,4-dimethoxy-phenyl	4{8}	4-chlorophenyl
	4{9}	4-methoxyphenyl	4{10}	2,4-difluorophenyl
	4{11}	2-fluoro-4-bromophenyl		
Хлорангідриди кислот 6{1-3}	6{1}	methyl	6{2}	Ethyl
Ангідриди кислот 7{1-2}	6{3}	propyl		
	7{1-2}	Methyl	7{1-2}	Ethyl

3.4 Встановлення профілю біологічної активності синтезованих сполук (PASS-прогнозування)

Комп'ютерна система прогнозування спектру біологічної активності PASS C&T (Prediction Activity Spectra for Substances: Complex & Training) [136, 142-145] широко використовується в сучасних технологіях розробки фармацевтичних субстанцій. Застосування даної технології дозволяє за структурною формулою органічної речовини в чисельному виразі оцінити вірогідність прояву (Pa) або відсутності (Pi) близько трьох тисяч видів біологічної активності та механізмів дії, а також можливих токсикологічних і побічних ефектів. Даний підхід було використано для з'ясування доцільності пошуку речовин протимікробної та протигрибкової дії в ряду полізаміщених похідних 5-амінопіразолу. Результати розрахунків (на віртуальній базі з 918 структур) засвідчили наявність високого потенціалу протимікробної активності, а також значну ймовірність впливу на центральну нервову систему людини (можливість прояву антипсихотичної, антидепресантної, антипаркінсонічної дії) (Рис. 3.6).

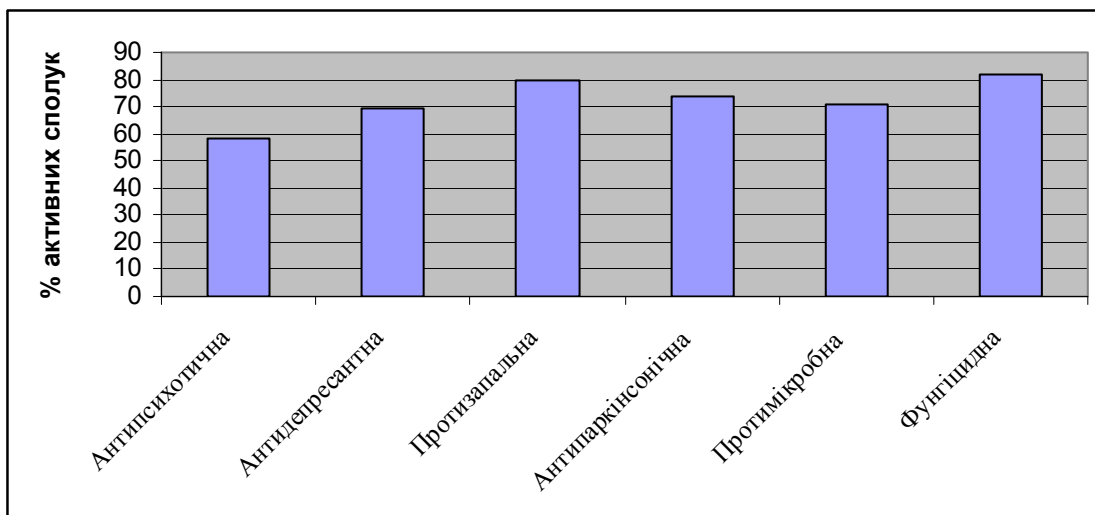


Рис. 3.6 Діаграма прогнозування біологічної активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфопіразолів (за результатами PASS-прогнозу).

На підставі результатів комп'ютерного прогнозування біологічної активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфопіразолів відібрано ряд

сполук для проведення експериментального вивчення їх впливу на мікробну клітину та на гриби роду *Candida*.

3.5 Таргет-орієнтований віртуальний скринінг (молекулярний докінг)

За результатами попереднього прогнозу фармакологічної активності синтезовані речовини мають значний потенціал для прояву антимікробної активності. Оскільки пакет PASS є лише первинним фільтром, для більш об'єктивної оцінки фармакологічного потенціалу нових молекул доцільно провести тривимірні *in silico* дослідження з моделювання їх взаємодії з біологічними мішенями (молекулярний докінг).

Для вибору протеїну-мішені для докінгових досліджень було проведено моніторинг даних літератури та наявної бази ферментів Protein Data Bank (PDB) [137]. PDB містить біля 500 кристалічних структур протеїнів у вільному вигляді або у комплексі з антибактеріальними лігандами. Для об'єктивності докінгових досліджень розглядалися лише протеїни, що містили ліганди, що спрощує аналіз даних і забезпечує можливість більш коректного порівняння афінітету.

Основним молекулярним механізмом антибактеріальної дії найближчих структурних аналогів синтезованих нами сполук – сульфонамідів, вражається зв'язування та інгібування специфічного для метаболізму фолієвої кислоти ензиму дигідроптероатсинтази (ДГПС) [121]. Саме цей фермент каталізує синтез дигідроптероату – ключового інтермедіату в біосинтезі дигідрофолату. У літературі наведено дані щодо високої кореляції результатів докінгових досліджень з одержаними *in vitro* [146] в ряду протимікробних агентів саме на цій біологічній мішені. Оскільки база даних містить кристалографічні моделі ДГПС з різними лігандами, для розрахунків нами обрано троїчний комплекс ДГПС мікроорганізму *E.coli*, який містить як нативний ліганд сульфаніламід (PDB code 1AJ0, Рис. 3.7а). Як видно з рис.

3.7б до взаємодії ліганд-рецептор задіяні амінокислотні залишки Ser219, Arg220 та Arg63 (водородні зв'язки), а також Pro64, Phe190, Phe157 та Pro232 (гідрофобна взаємодія).

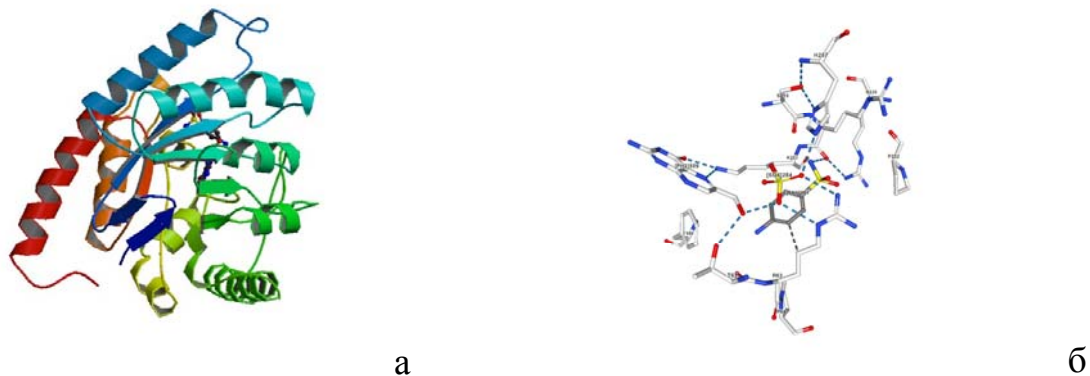


Рис. 3.7 Кристалічна структура трійного комплекс ДГПС мікроорганізму *E.coli* 1AJ0 (а); сульфаніламід в активному сайті фермента (б).

Нами проведено докінгові розрахунки щодо афінитету синтезованих речовин до активного сайту трійного комплексу ДГПС. Згідно одержаним результатам (табл. 3.2), енергія зв'язування для *N*^l-бензил-4-арилсульфоніл-5-(*N,N*-діаціламіно)-3-метилтіопіразолів **10a-d**, а також *N*-(3,4-диметоксифеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетаміду **13k** має позитивні значення, що свідчить про відсутність афінитету. Всі решта речовин продемонстрували високий афінитет до активного сайту ферменту, що в переважній більшості випадків перевищувало такий для сульфаніламід (-61,678 ккал/моль). Найменшу енергію зв'язування з активним сайтом, а відповідно і найбільший афінитет, показали речовини **3e**, **5b**, **6e**, **6i**, **7b**, **7f**, **8b**, **8g**, **8h**, **8h**. При цьому *N*-(2'-флюоро-4'-бромфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7b** за розрахунками має найменше значення енергії зв'язування з активним сайтом ферменту 1AJ0 (-102,790 ккал/моль).

Таблиця 3.2

Скорингова функція (афінитет) зв'язування досліджуваних та нативних лігандів з активними сайтами ферментів 1AJ0 та 3TUE (ккал/моль)

Код сполуки	Фермент	
	1AJ0	3TUE
1	2	3
3a	-65.423	-63.879
3b	-74.342	-66.017
3c	-61.560	-70.647
3d	-73.436	-75.397
3e	-90.743	-77.398
3f	-61.780	-77.789
3g	-77.598	-81.279
5a	-66.248	-76.739
5b	-93.690	-75.438
6a	-83.932	-71.375
6b	-88.769	-68.607
6c	-85.969	-68.451
6d	-89.645	-78.661
6e	-91.435	-69.876
6f	-84.800	-73.471
6g	-69.142	-70.014
6h	-74.350	-79.426
6i	-90.222	-69.071
6j	-60.634	-70.685
6k	-87.519	-71.676
6l	-79.449	-72.112
6m	-72.818	-66.740
6n	-77.637	-86.649
6o	-	-79.965
7a	-55.180	-79.802
7b	-102.790	-69.914
7c	-86.030	-69.021
7d	-71.321	-55.000
7e	-57.250	-63.618
7f	-97.189	-88.906
7g	-74.450	-79.980
7h	-57.389	-92.328
7i	-	-92.712
7j	-81.356	-79.486
7k	-84.925	-77.511
7l	-68.552	-77.962
7m	-69.016	-79.637
8a	-85.330	-77.173
8b	-91.654	-87.715
8c	-87.400	-67.114

<i>Продовження табл.3.2</i>		
1	2	3
8d	-73.423	-62.436
8e	-97.313	-73.582
8f	-90.634	-73.221
8g	-97.208	-72.645
8h	-92.872	-72.525
8i	-93.884	-72.044
8j	-82.763	-85.198
8k	-62.062	-71.030
9a	-3.615	-0.907
9b	-77.411	-58.637
10a	146.762	158.196
10b	25.921	34.698
10c	555.244	540.909
10d	213.925	202.223
12a	-74.644	-85.721
12b	-77.526	-85.709
13a	-93.750	-80.814
13b	-87.582	-77.376
13c	-72.915	-80.978
13d	-81.481	-78.893
13e	-68.885	-58.906
13f	-42.150	-31.042
13g	-75.373	-69.950
13h	-84.181	-79.016
13i	-65.511	-54.437
13j	-71.043	-83.439
13k	94.485	72.468
сульфатіазол		-95.938
сульфаніламід	-61.678	

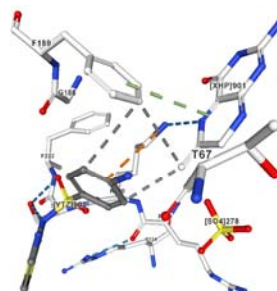
Беручи до уваги загальновідомий факт, що механізм дії сульфаниламідів реалізується за рахунок подібності структури цих речовин до *n*-амінобензойної кислоти, а синтезовані речовини містять у своїй будові крім ароматичного кільця піразольний фрагмент, ми обрали для досліджень ще один ензим ДГПС (pdb code 3TUE, Рис. 3.8а) [147], нативним лігандом у якому є сульфатіазол, який містить 5-членний гетероцикл, пов'язаний через сульфоновий лінкер з ароматичним *n*-заміщеним кільцем і є стерично подібним до синтезованих речовин. Взаємодія сульфатіазолу з активним сайтом ферменту реалізується здебільшого за рахунок зв'язування атомів

кисню сульфогрупи з гідроксильною та аміно-групами серину SER 221B (Рис. 3.8б).

За результатами докінгових досліджень жодна з синтезованих речовин не перевищувала афінитет сульфатіазолу до активного сайту. На цій моделі також спостерігались позитивні скорингові функції для сполук ряду N^l -бензил-4-арилсульфоніл-5-(N,N -діаціламіно)-3-метилтіопіразолів **10a-d**, та речовини **13k**. Найбільшу афінність, що наближалась до сульфатіазолу, продемонстрували сполуки **7h**, **7i**. Таким чином, можна зробити попередній висновок, що саме наявність заміщеного сульфоарильного фрагмента в цільовій молекулі може відігравати ключову роль у взаємодії з активним сайтом рецептору.



а



б

Рис. 3.8 Кристалічна структура комплексу ДГПС мікроорганізму *E.coli* 1AJ0 з сульфатіазолом та дигідроптеридином (а); сульфатіазол в активному сайті фермента (б) [137].

Одержані результати свідчать про високий афінитет практично всіх синтезованих речовин до активного сайту ДГПС, їх здатність конкурентно інгібувати його та завдавати антимікробну дію. Тому дослідження антибактеріальних властивостей синтезованих речовин є цілком виправданими.

Висновки до розділу 3

1. За реакцією гетероциклізації арилсульфонілацетонітрилів з гідразин-гідратом синтезовано 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразоли. Доведено утворення продуктів N^1 -заміщення в реакції їх алкілування та моно- та діацильних похідних – в реакціях з хлорангідрідами та ангідридами кислот відповідно.
2. Взаємодією арилсульфонілацетонітрилів з арилізотіоціанатами та з подальшою гетероциклізацією з гідразин-гідратом одержано 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-ариламінопіразоли. Як результат реакції алкілування утворюються виключно N^1 -заміщені 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-арил-амінопіразоли.
3. Здійснено дизайн комбінаторної бібліотеки похідних 5-аміно-4-алкіл-/арилсульфоніл-3-алкілтіопіразолів та 3-алкіл/ариламінопіразолів та синтезовано ряд сполук для проведення скринінгових досліджень на прояв протимікробної та протигрибкової активності.
4. PASS-прогнозування та таргет-орієнтований віртуальний скринінг (молекулярний докінг) підтвердили доцільність пошуку нових протимікробних засобів в ряду похідних 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-алкілтіо-/ариламінопіразолів до дозволили обрати сполуки для проведення скринінгових мікробіологічних досліджень.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Ткаченко П. В., Ткаченко Е. В., Журавель И. А., Казмирчук В. В., Дербисбекова У. Б.. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонил-производных 5-аминопиразолов. *Вестник КазНМУ*. 2017. № 2. С. 317–321.

2. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-

alkylthiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action / *Вісник фармації*. 2017. № 2. С. 25–30.

3. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O., Kazmirchuk V. V.. The synthesis and the antimicrobial activity of N^1 -substituted 5-amino-4-arylsulfonyl-3-*N*-phenylamino-pyrazoles. *Вісник фармації*. 2017. № 3. С. 3–9.

4. Ткаченко П. В., Ткаченко О. В., Журавель І. О., Казмірчук В. В. 4-(4'-Хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразол, який проявляє протигрибкову активність. *Патент на корисну модель UA 124716*, МПК А61К 31/505, С07D 239/69; Заявл. и 2017 09272 від 21.09.2017; Опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8. 4 с.

5. Ткаченко П. В., Колесник С. В., Журавель І. А., Завада О. А., Дербисбекова У. Б. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопирозола. *Фармація Казахстана*. 2017. № 8. С. 13–16.

РОЗДІЛ 4

РЕАКЦІЇ ГЕТЕРОЦИКЛІЗАЦІЇ ЗА УЧАСТЮ 3(5)-АМІНОПІРАЗОЛІВ

4.1 Взаємодія 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразолів із α -галогенокетонами

Заміщені піразоли є одним з найважливіших класів гетероциклічних сполук, які широко застосовуються в біологічній, медичній та технічній галузях. Структурний фрагмент піразолу як моноцикл, так і в складі поліядерних систем, є частиною багатьох важливих сполук природного або синтетичного походження [149-153]. Зокрема, у фармацевтичній практиці велика група лікарських препаратів із різноспрямованою дією, з хімічної точки зору, відноситься саме до похідних піразолу. Важливою є здатність функціонально заміщених піразолів вступати в різноманітні реакції гетероциклізації, включаючи утворення двоядерних сполук, які представляють перспективний пласт речовин для біологічного скринінгу.

Зважаючи на різноманітність видів активності, що відомі для похідних 5-амінопіразолів, ми звернули увагу на можливість здійснення взаємодії 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразолів з α -галогенокетонами з утворенням полізаміщених імідазо[1,2-*b*]піразолів як нових потенційних біологічно активних речовин. Слід зазначити, що повідомлення щодо цього класу сполук є досить малочисельними. Тим не менш, існують декілька синтетичних процедур формування циклічної системи імідазо[1,2-*b*]піразолу, більшість з яких є багатостадійними та трудомісткими.

У попередніх дослідженнях нами проаналізовано взаємодію 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-алкілтіопіразолів з *N*-арилхлорацетамідами, що призводило виключно до продуктів *N*¹-алкілування (розділ 3.1). При цьому в ході реакції ми не спостерігали утворення домішок позиційно ізомерних продуктів або

продуктів NH₂-алкілювання. Про це свідчать результати ТШХ, ВЕРХ/МС та даних ¹H ЯМР-спектроскопії (відсутність подвійного набору сигналів, наявність сигналів вільної аміногрупи, а також успішний перебіг подальшої реакції NH₂-ацилювання). У даному розділі роботи ми дослідили взаємодію 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилпіразолів з хлороацетоном, фенацилбромідами та α-хлороциклогексаноном.

Нами розроблено та апробовано дві процедури синтезу.

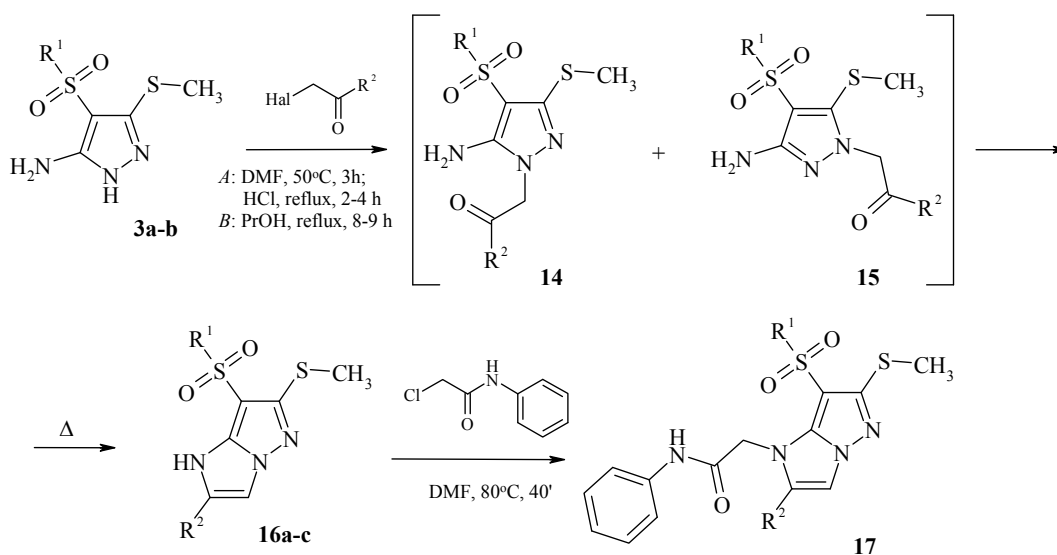
Перша полягає в проведенні попереднього алкілювання ендциклічного атома нітрогену вихідних 5-амінопіразолів **3a,b** у ДМФА у присутності калій карбонату з утворенням, за даними ТШХ (елюент: хлороформ – метанол – ацетонітрил 30 : 3 : 1) та ¹H-ЯМР-спектроскопії, суміші ізомерних продуктів алкілювання **14** і **15**. Співвідношення ізомерів, в залежності від природи алкілюючого агента, становить близько 60 : 40% (з аналізу ¹H-ЯМР-спектрів). Далі за процедурою сирий продукт (масляний залишок) переносили в спиртовий розчин, додавали концентровану хлористоводневу кислоту та нагрівали. При цьому відбувається циклізація ізомеру **14** з утворенням імідазо[1,2-*b*]піразолу, а інший позиційний ізомер **15** залишається в маточному розчині (схема 4.1).

В роботі [154] наведено синтез ряду 2-арил-6-(ариламіно)-1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразол-7-карбонітрилів за реакцією 5-аміно-3-ариламіно-1*H*-піразол-4-карбонітрилів з α-бromoацетофенонами в присутності K₂CO₃ в середовищі ацетону з подальшою циклоконденсацією в етанолі в присутності HCl. При цьому автори не обговорюють можливість утворення позиційного ізомера.

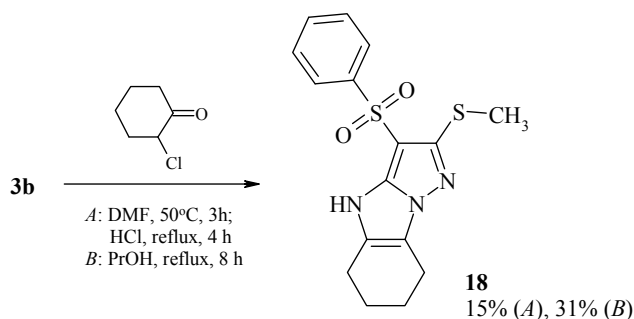
Використання другого способу – кип'ятіння вихідних реагентів в пропанолі-1 дозволило дещо збільшити вихід кінцевого продукту і виключити етап роботи з маслянистим продуктом, хоча іноді реакція не досягла кінця і було важко позбутися домішок нециклізованого продукту.

В спектрах ^1H -ЯМР продуктів циклізації **16a-c** характеристичними є синглетні сигнали СН-протонів циклу імідазолу в межах δ 8.19...8.32 м.ч. та сигнал NH-протону імідазолу (при δ 12.61...12.75 м.ч.).

Схема 4.1



$\text{R}^1 = \text{C}_6\text{H}_5$ (**16a-b**); 4- OCH_3 - C_6H_4 (**16c**, **17**);
 $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ (**16a**); 4- Cl - C_6H_4 (**16b**); 2- CH_3 - C_6H_4 (**16c**, **17**)



Пірольний атом нітрогену поліциклічної системи імідазо[1,2-*b*]піразолу піддається алкілуванню. Зокрема, використовуючи стандартну процедуру, в реакції **16c** з *N*-фенілхлорацетамідом було виділено сполуку **17c**. Успішний перебіг реакції алкілування однозначно підтверджує відсутність сигналу NH-протону імідазолу та поява характеристичного набору сигналів ацетамідного угруповання: сигнал амідного NH-протону (δ 10.30 м.ч.), синглетний сигнал групи CH_2 в області δ 5.08 м.ч. та сигнали ароматичних протонів фенільного радикала.

Також нами досліджено взаємодію 5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метил-

тіопіразолу **3b** α -хлороциклогексаноном (синтез здійснювали за обома методиками). Проведення циклізації за *методом В* дозволило вдвічі збільшити вихід кінцевого продукту – 1-фенілсульфоніл-2-метилтіо-4,6,7,8-тетрагідро-5H-3,3a,8-триазациклопента[а]індену **18**.

Чистота отриманих сполук доведена хроматографічно, структура підтверджена даними ЯМР-спектроскопії. В ^1H -ЯМР-спектрі кінцевого продукту наявні сигнали СН-протонів 1,2-дизаміщеної циклогексенової системи в межах δ 1.73...2.56 м.ч., що підтверджує утворення трициклічної структури.

4.2 Взаємодія 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-заміщених піразолів із α,β -дикарбонільними сполуками

Використання в зазначеному перетворенні α,β -дикарбонільних сполук дозволило перейти до полізаміщених азолазинових систем.

Подібні біциклічні системи з вузловим атомом Нітрогену входять до складу таких комерційних фармацевтичних агентів як *Zaleplon*, *Indiplon*, *Lorediplon*, *Ocinaplon*, *Pyrazophos*. [155]. Завдяки широкому практичному застосуванню похідних піразоло[1,5-*a*]піримідинів все більшу увагу привертають нові методи їх синтезу, які б дозволили уникнути негативних факторів, зокрема жорстких умов реакції, довготривалості, низьких виходів, регіоселективності, комерційної непривабливості реагентів, на що вказують більшість авторів [156-158].

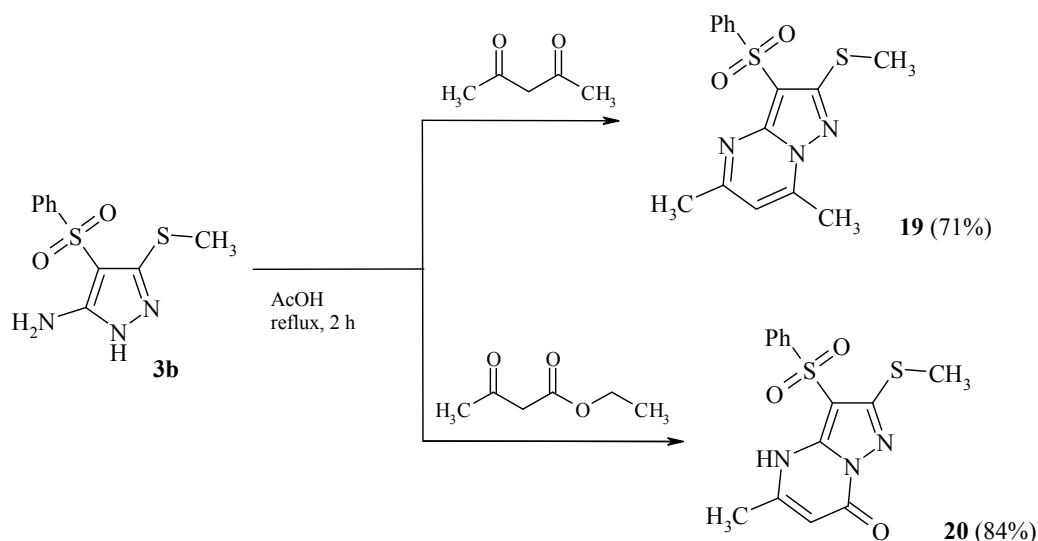
Зазвичай в якості прекурсорів синтезу заміщених піразоло[1,5-*a*]піримідинів та їх гідрованих форм використовують халкони (в реакції з 3-амінопіразолами) [159-162].

В роботі [163] наведено взаємодію 5-аміно-4-фенілсульфонілпіразолів з ацетилацетоном. Реакцію проводили в оцтовій кислоті (кип'ятіння протягом 3 годин), далі розчинник відганяли під вакуумом, суміш переносили в

ізопропіловий спирт і витримували в ультразвуковій бані при 0° С протягом 30 хвилин. Виходи продуктів становили 65-93%.

Нами розроблено процедуру, яка дозволяє провести циклоконденсацію 5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразолу **3b** з ацетилацетоном та етиловим естером ацетооцтової кислоти (схема 4.2) без застосування ультразвукової активації. В результаті виділено 5,7-диметил-2-(метилтіо)-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідин **19** і 5-метил-2-(метилтіо)-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-*a*]піримідин-7(4*H*)-он **20**.

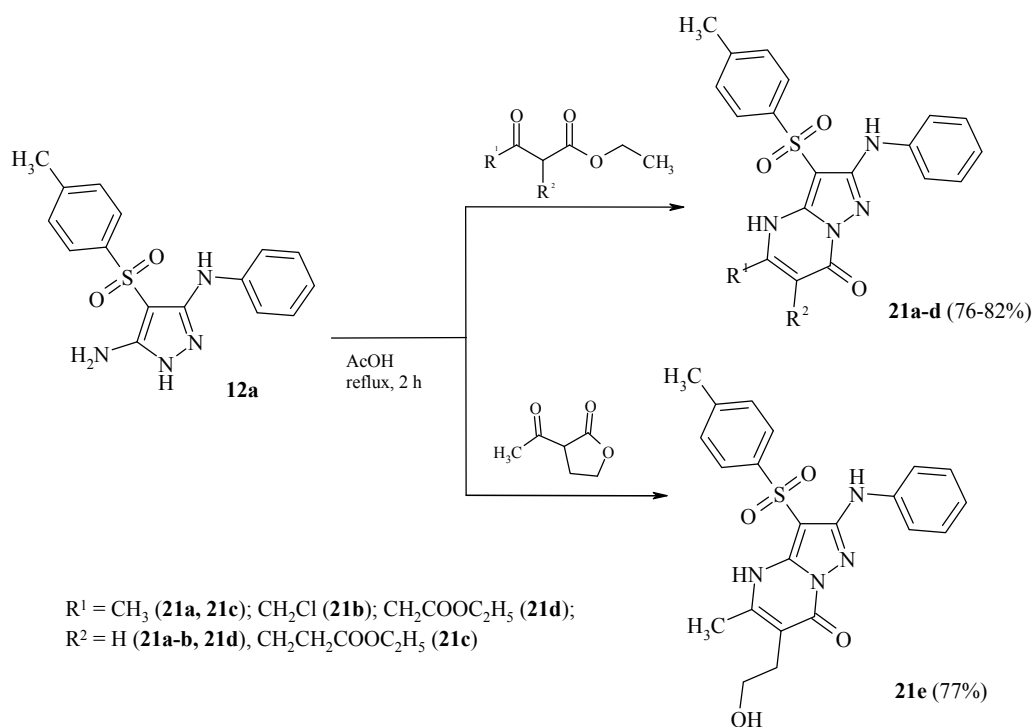
Схема 4.2



За розробленою методикою на прикладі 5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-феніламінопіразолу **12a** досліджено реакцію гетероциклізації з низкою естерів ацетооцтових кислот (схема 4.3). Реакція відбувається з добрими виходами в короткий час (близько двох годин).

Взаємодія з 3-ацетилтетрагідрофуран-2-оном супроводжується розкриттям тетрагідрофуранового циклу і утворенням 5-метил-3-(4'-метилфеніл)сульфоніл-6-оксиетил-2-феніламінопіразоло[1,5-*a*]піримідин-7(4*H*)-ону **21e**, на відміну від подібної реакції за участю 5-аміно-3-амінозаміщених-4-(3-*RI*-[1,2,4]оксадіазол-5-іл)-1*H*-піразолів [164], де авторами зареєстровано утворення *O*-ацетильної похідної.

Схема 4.3



Структура **21e** підтверджується наявністю в ^1H -ЯМР спектрі двох синглетних сигналів CH_3 -груп (при δ 1.83 і δ 2.35 м.ч.) та уширеного синглетного сигналу протона NH при δ 12.00 м.ч.

Висновки до розділу 4

1. Розроблено синтетичні протоколи гетероциклізації 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів з α -галогенкетонами. Вперше встановлено утворення позиційних ізомерів в реакції 4-арилсульфоніл-5-амінопіразолів з хлорацетоном, фенацилбромідами та 2-хлороциклогексаноном при проведенні реакції в ДМФА в присутності калій карбонату. Встановлено, що при перенесенні реакційної суміші в спиртовий розчин HCl продукт N^1 -заміщення циклізується на 2,6,7-тризаміщений 1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразол.
2. Запропонована одностадійна процедура гетероциклізації 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів з α -галогенкетонами – кип'ятіння вихідних реагентів в пропанолі-1, яка дозволила дещо збільшити вихід кінцевих речовин і виключити етап роботи з маслянистим продуктом.
3. В реакції 4-арилсульфоніл-5-амінопіразолів з α,β -дикарбонільними реагентами (ацетилацетоном, ацетооцтовими естерами) доведено утворення похідних піразоло[1,5-*a*]піримідину.
4. Вперше встановлено, що взаємодія 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-*N*-арил-амінопіразолів з 3-ацетилтетрагідрофуран-2-оном супроводжується розкриттям тетрагідрофуранового циклу і утворенням оксиетильного похідного піразоло[1,5-*a*]піримідин-4-ону.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Tkachenko P., Tkachenko O., Netosova K., Borisov O., Zhuravel I. Products of interaction of substituted 5-aminopyrazoles with α -haloketones as potential pharmaceutical agents. *ScienceRise: Pharm. Science*. 2017. № 5 (9). P. 25–28.
2. Tkachenko P.V., Netosova K.Yu., Zhuravel I.O. Interaction of substituted 5-aminopyrazoles with β -dicarbonyl compounds. Topical issues of new drugs development: XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student: Book of Abstracts, April 18-20, 2018. Kharkiv, 2018. Kharkiv: NUPh. P. 27.

РОЗДІЛ 5

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ МОДИФІКОВАНИХ ПОХІДНИХ 3(5)-АМІНОПІРАЗОЛУ

Інфекційні та гнійно-запальні захворювання супроводжують людство протягом багатьох сторіч. На сьогодні за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) інфекційні хвороби та їх ускладнення посідають третє місце в структурі захворюваності, смертності та причин інвалідності [166]. Ситуація ускладнюється тим, що за останні 20 – 30 років з'явилося декілька десятків нових інфекційних захворювань, і ВООЗ навіть видала рекомендації щодо правил надання назв новим інфекційним хворобам людини [167-170].

Не зважаючи на той факт, що за широтою застосування антибактеріальні препарати займають перше місце в світі серед інших лікарських засобів, ВООЗ констатує, що кількість протимікробних засобів, що знаходяться на стадії розробки за останнє десятиріччя різко зменшилась [166]. Це обумовлено низкою економічних та наукових факторів, зокрема обмеженістю ринку для нових препаратів (малий курс лікування, державні обмеження на нові препарати, регіональність тропічних і орфанних хвороб), біологічними проблемами (відкриття все нових мішеней, формування резистентності мікроорганізмів до відомих молекул), високими вимогами до токсичності потенційних субстанцій. Все це може сприяти відсутності можливостей для ефективної антибактеріальної терапії в майбутньому .

Важливо відмітити, що з часу відкриття фторхінолонів і антибіотиків цефалоспоринового ряду (1960-ті роки ХХ сторіччя) не запропоновано принципово нової базової структури антибактеріальної дії. Перелік «Критично важливих протимікробних препаратів» залишається незмінним:

серед найбільш пріоритетних цефалоспорини 3-го, 4-го і 5-го поколінь, глікопептиди, макроліди і кетоліди, поліміксини, хінолони [166-173].

Застосування багатьох груп антибактеріальних препаратів на сьогодні значно обмежується вираженою мінливістю мікроорганізмів, формуванням і поширенням стійких до лікарських засобів штамів, підвищенням ролі грамнегативної, грибової мікрофлори і асоціацій мікроорганізмів в інфекційній патології, вираженою алергізацією населення, активізацією ендогенної мікрофлори.

В той же час більше шести мільйонів хімічних сполук в тій чи іншій мірі проявляють протимікробну активність, однак така їх кількість значно перевищує можливості всебічного вивчення кожної речовини з метою впровадження в медичну практику. В якості однієї з найбільш ефективних методологій оптимізації пошуку активних молекул широко використовуються різноманітні скринінгові технології на основі аналізу зв'язків «структура-активність» [174-179].

У галузі розробки нових протимікробних засобів основним завданням досліджень є, у першу чергу, пошук надійних і безпечних хімічних сполук, активних по відношенні до полірезистентних штамів мікроорганізмів.

Аналіз одержаного PASS-паketу ймовірної біологічної дії похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу показав, що ці сполуки є перс пективними для вивчення їх фармакологічної активності (розділ 3.4), та дозволив спланувати біологічні дослідження синтезованих сполук. На увагу заслуговує високий показник ймовірності протимікробної та фунгіцидної дії, що актуально в умовах стрімкого розвитку антибіотикорезистентності.

Дослідження з вивчення протимікробної дії синтезованих сполук було сплановано у два етапи. На першому з них проводили мікробіологічний скринінг за стандартним набором тест-культур референтних штамів грампозитивних, грамнегативних бактерій та грибів роду *Candida*. На другому етапі вивчали протимікробну активність декількох найбільш активних речовин по

відношенню до розширеного спектру музейних та клінічних референтних тест-штамів.

5.1 Вплив синтезованих похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-піразолу на тест-культури патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів

Для первинного мікробіологічного скринінгу було застосовано набір еталонних штамів тест-культур грампозитивних і грамнегативних бактерій, що належать до різноманітних за морфофізіологічними властивостями клінічно значущих груп збудників інфекційних та гнійно-запальних захворювань людини: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus anthracoides* ATCC 1312. Протигрибкову дію сполук вивчали на тест-культурі дріжджеподібного гриба роду *Candida* – референтному тест-штамі *Candida albicans* ATCC 885-653.

Визначення протимікробної дії досліджуваних речовин проводили методом серійних розведень у рідких живильних середовищах, який дозволяє дати кількісну оцінку протимікробної активності. Посіви з мікроорганізмами, що вивчалися, витримували в термостаті при температурі 37 °С на протязі 18–24 годин. Результати враховували по відсутності росту в останній пробірці, що відповідає мінімальній інгібуючій (бактеріостатичній) концентрації (МБстК). Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) з двох-трьох останніх пробірок ряду здійснювали висів 0,1 мл в чашки Петрі з твердим живильним середовищем. Після 18–24 годин інкубування при температурі 37 °С відмічали мінімальну концентрацію, яка не давала росту на агарі і яка відповідала значенню МБцК.

Результати скринінгового дослідження протимікробної та проти грибової активності чотирьох груп похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-піразолу наведені в таблицях 5.1–5.4. У ході досліджень встановлено, що

значна частка вперше синтезованих речовин проявили протимікробну активність відносно грампозитивних (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus anthracoides* ATCC 1312), грамнегативних (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636) мікроорганізмів та грибів роду *Candida*.

В ряду 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів **3b-g** найбільшу активність на рівні концентрацій 12.5–25.0 мкг/мл по відношенню до всього набору грампозитивних і грамнегативних бактерій проявили сполуки з атомом хлору в 4-ому положенні бензольного циклу – **3d** і **3e**. Також слід відмітити вплив незаміщеної фенільної похідної **3c** на *Ps. aeruginosa* на рівні 25–50.0 мкг/мл.

Протимікробна активність *N*¹-бензил-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів **6a-o** виражена менше. Лише дві сполуки з протестованих речовин даного класу проявили активність на рівні 25 мкг/мл: 3-хлоробензилпохідна **6d** – по відношенню до *Ps. aeruginosa*, і 4-хлоробензилпохідна **6l** – по відношенню до *St. aureus*. Таким чином, введення бензольного радикала в положення 1 гетероциклу є небажаною модифікацією для пошуку протимікробних засобів. На увагу заслуговує лише одна сполука даного ряду – *N*¹-(4-хлоробензил)-4-фенілсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразол **6e**, для якої в експерименті встановлено протигрибкову активність на рівні 25–50.0 мкг/мл, що вище ніж для препарату порівняння.

Значно кращі результати отримані при тестуванні *N*-арил-(5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамідів **7a-o**. Значна кількість речовин виявила активність по відношенню до двох і більше штамів одночасно (8 із 15). Здатність впливати на *St. aureus* на пряму корелює з наявністю атома галогену в бензольному кільці ацетамідного фрагмента: найвищі показники активності встановлені для дигалогенозаміщених сполук **7a-c**. Речовини з двома метильними або метоксильними замісниками в арилацетамідній частині (**7f-h**) та **7j** виявили високу активність по

відношенню до *E. coli*. Також високий показник активності в даній групі речовин щодо *Ps. aeruginosa* (п'ять речовин на рівні 25–50.0 мкг/мл), що дає підстави стверджувати, що на прояв даної властивості не впливає наявність або природа замісника в першому положенні гетероцикла.

Пригнічення росту *Pr. vulgaris* спостерігали лише при тестуванні трьох сполук **7d-f**, замісника в сульфоарильній групі та присутність алкільних радикалів в ацетамідному фрагменті. Слід зазначити, що даний вид активності був відсутній у бензильних аналогів **6a-o**.

Лише одна речовина – **7g**, проявила бактерицидну дію щодо *B. anthracoides*. І цей вид активності загалом не притаманний даному класу сполук.

Хороші результати показали *N*-арил-(5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетаміди **7a-o** при тестуванні на протигрибкову активність. Шість речовин проявляють фунгістатичну дію в концентраціях 12.5–25.0 мкг/мл, що значно вище, ніж у препарата порівняння Флуконазолу (50.0 мкг/мл).

При заміні тіоалкільної функції у 3-ому положенні гетероциклу на феніламіногрупу значних змін в активності щодо стандартних штамів мікроорганізмів не відбулося. Також відсутня бактерицидна дія по відношенню до *Pr. vulgaris*; низький відсоток речовин, активних по відношенню до *St. aureus* (3 речовини із 11 протестованих), *E. coli* (2 речовини із 11), *Ps. aeruginosa* (1 речовина), *B. anthracoides* (1 речовина).

На увагу заслуговує протигрибкова активність *N*-арил-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-*N*-феніламінопіразол-1-іл]ацетамідів **13a-k**. У 9 із 11 сполук даного ряду встановлена фунгіцидна дія на рівні препарата порівняння і вище.

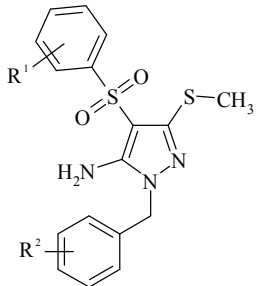
Виходячи з результатів мікробіологічного тестування можна констатувати, що найбільш вагомий вплив на прояв протимікробної дії має наявність двох арильних фрагментів в молекулі, поєднаних з піразольним циклом через

гетероатом, що забезпечує конфірмаційну рухливість молекули і надає можливість більш щільного закріплення ліганду в активному сайті фермента.

Також слід зазначити більш виражену протигрибкову дію похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолів і *N*-арил-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)-сульфоніл-3-алкілтіо/*N*-феніламінопіразол-1-іл]ацетамідів. У більшості випадків умовою прояву фунгіцидної дії є наявність атому галогену в одному із арильних кілець (атом флюору або атом хлору).

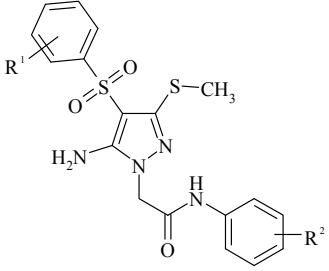
Таблиця 5.2

Протимікробна активність *N*¹-бензил-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів

		Мінімальна (бактеріостатична / бактеріцидна) концентрація, мг/мл											
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636		<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	
Код	R ¹ /R ²	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
6a	H / H	100	100	100	200	50	100	100	200	100	200	50	100
6b	H / 2-F	50	100	100	200	50	100	100	100	100	100	50	50
6c	H / 2-Cl	50	50	50	100	25	50	100	200	100	100	50	50
6d	H / 3-Cl	50	100	50	100	25	50	50	100	50	100	50	50
6e	H / 4-Cl	100	100	100	100	50	100	50	50	100	100	25	50
6f	H / 4-Br	50	100	50	100	100	200	50	100	50	100	100	100
6g	H- / 4-Me	100	200	100	200	100	200	100	200	100	100	100	100
6h	H / 2,4-diMe	50	100	100	200	50	100	100	200	100	100	50	50

Таблиця 5.3

Протимікробна активність *N*-арил-(5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамідів

		Мінімальна (бактеріостатична / бактерицидна) концентрація, мг/мл											
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636		<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	
Код	R ¹ /R ²	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
7a	H / 2,5-diF	12.5	25	25	100	50	100	100	250	50	100	12.5	25
7b	H / 2-F-4-Br	12.5	50	25	100	25	50	100	100	100	100	12.5	50
7c	H / 2-Cl-4-F	12.5	50	25	100	25	50	100	100	100	100	12.5	50
7d	H / 2-Et	50	100	50	50	50	100	25	50	25	100	25	50
7e	H / 4-OMe	100	100	100	50	50	100	25	50	25	100	25	50
7f	H / 2,5-diOMe	50	100	25	50	50	50	25	50	25	100	50	100
7g	H- / 2-OMe-5-Me	50	100	25	50	25	50	50	50	25	25	50	50

<i>Продовження табл. 5.3</i>													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
7h*	4-Cl / 3,5-diMe	25	50	25	50	25	100	50	100	50	100	50	50
7i*	4-OMe / 2-F	50	100	50	100	50	100	100	200	100	200	50	100
7j*	4-OMe / 4-F	12.5	50	25	50	25	25	100	100	100	100	12,5	50
7k*	4-OMe / 3,5-diMe	50	100	50	100	100	200	100	200	100	200	50	100
7l*	4-OMe / 3-Et	25	50	50	100	25	25	100	100	100	100	100	200
7m	4-Me / 3,4-diMe	50	100	100	100	50	100	50	100	100	200	50	100
7n	4-OMe / 2-Me	50	100	50	200	50	100	100	200	100	100	50	50
7o	4-OMe / 4-Me	100	200	50	100	50	100	50	50	100	200	25	50
<i>Palinum</i>		6,25		25		12.5		12.5		12.5			
<i>Nevigramon</i>		50		50		50				6.25			
<i>Fluconazolum</i>												50	

* - 3-етилтіопхідні

Таблиця 5.4

Протимікробна активність *N*-арил-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-*N*-феніламінопіразол-1-іл]ацетамідів

		Мінімальна (бактеріостатична / бактерицидна) концентрація, мг/мл											
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636		<i>Bacillus anthracoides</i> ATCC 1312		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	
Код	R ¹	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К	МБ _{ст} К	МБ _ц К
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
13a	H	50	100	50	200	50	100	25	100	25	50	25	25
13b	2-F	50	100	25	100	50	100	100	100	100	100	25	50
13c	2,4-diF	25	50	50	100	25	50	100	200	100	100	12.5	25
13d	2-Cl-4-F	25	100	25	50	100	100	100	100	100	100	12.5	50
13e	2-Me-5-F	50	100	50	100	50	100	100	100	100	100	50	50
13f	4-i-Pr	50	100	50	100	100	200	100	100	25	100	50	100
13g	2,4-diMe	25	50	25	100	50	50	50	100	50	100	100	100
13h	3,5-diMe	50	100	25	50	100	100	100	200	100	100	12.5	50

5.2 Вивчення спектру протимікробної активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу

За результатами первинного мікробіологічного скринінгу, що встановив наявність високої антибактеріальної та протигрибкової активності відносно стандартного набору референтних штамів тест-культур у низки похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу, було відібрано ряд найбільш активних сполук для подальшого поглибленого дослідження їх протимікробної активності відносно розширеного спектру музейних та клінічних штамів мікроорганізмів і грибів роду *Candida*.

Для поглибленого дослідження протимікробної активності було обрано 5 речовин:

- 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол **3e**;
- 5-аміно-*N*¹-(4'-хлоробензил)-4-(4''-метилфеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **6l**;
- *N*-(2'-флюоро-4'-бромфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7b**;
- *N*-(4''-флюорофеніл)-{(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)}ацетамід **7j**.
- *N*-(2,4-дифлюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13c**.

По-перше, було здійснено експеримент з пошуку агентів, активних до збудника стафілококової інфекції, враховуючи її широке розповсюдження і появу антибіотикостійких штамів стафілококів. Дослідження з вивчення протистафілококової дії синтезованих сполук проводили на 14 музейних та клінічних референтних тест-штамах стафілококу: *St. aureus* № 16580, *St. aureus* № 16581, *St. aureus* № 16583, *St. aureus* № 16586, *St. aureus* № 16588, *St. epidermidis* № 16589, *St. aureus* № 16590, *St. haemolyticus* № 16591, *St. aureus* № 16582, *St. epidermidis* № 16593, *St. aureus* № 16594, *St. haemolyticus* № 16595, *St. aureus* № 16561, *St. aureus* ATCC 25923.

Результати досліджень по вивченню протистафілококової активності окремих похідних 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолу наведені в таблиці 5.5.

У ході експерименту було встановлено, що обрані речовини проявили високу бактеріостатичну активність та помірну бактерицидну дію по відношенню до низки клінічних тест-штамів стафілококу (*St. aureus* № 16580, *St. aureus* № 16581, *St. aureus* № 16583, *St. epidermidis* № 16593, *St. aureus* ATCC 25923). Мінімальна бактеріостатична концентрація склала 12.5 мкг/мл. Значно менш активними тестуємі сполуки виявилися до штамів *St. aureus* № 16588, *St. aureus* № 16594, *St. aureus* № 16562, *St. haemolyticus* № 16590, *St. haemolyticus* № 16593.

Наступним був експеримент з вивчення активності обраних сполук по відношенню до розширеного ряду тест-штамів культур музейних та клінічних грампозитивних і грамнегативних бактерій: *Shigella flexneri* ГІСК 170, *Shigella sonnei* ГІСК 5772, *Proteus vulgaris* X 19 4137 “H”, *Enterobacter aerogenes* 418, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Salmonella enteritidis*, гр. P, Y/ ratin № 27, *Klebsiella pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *Rachnella aquatilis* ATCC 33071, *Rachnella aquatilis* ATCC 33989, *Rachnella aquatilis* 3-88, *Rachnella aquatilis* 2-87. Результати тестування представлені в таблиці 5.6.

Слід зазначити, що тестуємі сполуки на рівні препаратів порівняння активні по відношенню до більшості клінічних штамів *Shigella*, *Enterobacter* і збудника пневмонії *Klebsiella* (на рівні 50 мкг/мл). На окрему увагу заслуговують значні показники активності сполук **3e**, **6l** і **7j** відносно окремих штамів *Rachnella* (в концентрації 25–50 мкг/мл).

Проевдені дослідження засвідчують широкий спектр протимікробної дії, притаманний вперше синтезованим похідним 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолів і *N*-арил-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-алкілтіо/*N*-феніл-амінопіразол-1-іл]ацетамідів.

Таблиця 5.5

**Активність похідних 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-алкілтіопіразолів
по відношенню до штамів стафілококу, мкг/мл**

№ п/п	Тест-штам мікроорганізм мму	Сполуки									
		3e		6l		7b		7j		13c	
		МБс тК	МБц К	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК
1	<i>St. aureus</i> № 16580	25	50	25	50	25	50	12.5	50	25	50
2	<i>St. aureus</i> № 16581	25	50	100	100	50	100	25	25	50	100
3	<i>St. aureus</i> № 16583	50	50	50	100	25	50	25	50	100	100
4	<i>St. aureus</i> № 16586	50	100	25	50	12,5	50	12,5	25	100	100
5	<i>St. aureus</i> № 16588	50	50	50	100	50	100	50	100	50	100
6	<i>St. epidermidis</i> № 16589	25	50	100	200	25	50	25	50	100	200
7	<i>St. aureus</i> № 16590	50	100	25	100	25	100	50	100	50	100
8	<i>St. haemolyti- cus</i> № 16590	100	100	50	50	50	100	50	50	100	100
9	<i>St. aureus</i> № 16582	50	100	50	100	25	50	25	100	50	100
10	<i>St. epidermidis</i> № 16593	100	100	100	100	50	100	50	100	50	50
11	<i>St. aureus</i> № 16594	100	200	25	50	50	100	50	100	50	100
12	<i>St. haemolyti- cus</i> № 16595	100	200	50	100	100	200	25	50	50	100
13	<i>St. aureus</i> № 16561	50	50	100	100	50	100	100	100	50	100
14	<i>St. aureus</i> ATCC 25923	12.5	50	25	50	12.5	50	12.5	50	25	50

Таблиця 5.6

**Протимікробна дія похідних 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-
алкілтіопіразолів, мкг/мл**

№ п/п	Тест-штам мікроорганізу	Сполуки									
		3e		6l		7b		7j		13c	
		МБс тК	МБ цК	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК	МБ стК	МБ цК
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	50	50	100	25	100	25	50	50	100
2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	50	50	50	100	25	50	25	25	25	50
3	<i>Pr. vulgaris</i> ATCC 4636	25	50	50	100	100	100	100	100	100	200
4	<i>Pr. vulgaris</i> X 19 4137 "H"	50	100	50	100	50	100	100	100	50	100
5	<i>B. anthracoides</i> ATCC 1312	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	<i>B. cereus</i> ATCC10702	100	100	25	50	25	50	50	100	25	50
7	<i>S. flexneri</i> ГІСК 170	50	100	50	100	100	100	100	200	100	100
8	<i>S. sonnei</i> ГІСК 5772	50	100	50	100	25	50	50	50	100	200
9	<i>E. aerogenes</i> 418	50	50	50	100	50	50	50	50	100	100
10	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	100	100	100	100	50	50	50	100	50	100
11	<i>S. enteritidis</i> гр. P,Y/ratin № 27	100	100	50	50	50	100	100	100	50	100
12	<i>K. pneumoniae</i> K-7	50	100	100	100	50	100	100	200	50	100
13	<i>R. aquatilis</i> ATCC 33071	50	50	50	100	25	50	100	200	100	200
14	<i>R. aquatilis</i> ATCC 33989	50	100	25	25	50	100	25	50	100	100
15	<i>R. aquatilis</i> 3-88	25	50	100	100	50	50	25	50	50	100
16	<i>R. aquatilis</i> 2-87	25	50	100	100	50	100	100	100	100	100

5.3 Вивчення спектру протигрибкової активності похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу

Проблема інфекційних захворювань, зокрема поширення грибкових інфекцій, супроводжує людство протягом усієї історії. Род *Candida* налічує понад 154 видів грибів, близько 20 з них є збудниками різних форм кандидозів. Загалом за даними медичної статистики більш ніж 20 % населення планети є носіями дріжджеподібних грибів. Проте через невисоку патогенність гриба захворювання у більшості випадків не виникає. Фактично кандидоз – опортуністична інфекція, тобто розвивається на тлі недостатності імунного захисту організму. Протягом останніх років кількість людей з послабленим імунним статусом (стресові ситуації, ВІЛ-інфекції, аутоімунні захворювання) постійно зростає, і ця тенденція лише посилюється. А далі, внаслідок зниження бар'єрних функцій і ослаблення захисних сил організму людини, активується опортуністична інфекція, що призводить до розвитку кандидозної інфекції, що в свою чергу ще більше послабляє імунну систему.

Проблема грибкових інфекцій, яка спричинена вказаними негативними чинниками і опортуністичними патогенами полягає в тому, що вони погано піддаються лікуванню, виникають вторинні рецидиви хвороб і більш, ніж; в 30 % випадків мають невтішне прогностичне значення [180-185].

За минулі два десятиліття гриби роду *Candida* з патогенів, які раніше зустрічались досить рідко, стали одними з основних опортуністичних мікроорганізмів, що викликають внутрішньолікарняні інфекції. Значного зросла кількість інфекційних захворювань в стаціонарних відділеннях клінік, де необхідними є маніпуляції, пов'язані з порушенням цілісності тканин (хірургічні втручання, ін'єкції, катетерізація судин, протезування тощо).

Актуальність проблеми стає ще очевиднішою, зважаючи на широке і часто безконтрольне застосування в медичній практиці імунодепресантів, цитостатиків, антибіотиків та гормональних препаратів.

Для поглибленого дослідження про грибкової активності було обрано чотири речовини:

- 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол **3e**;
- *N*-(2',5'-дифлюорофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7a**;
- *N*-(2,4-дифлюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13c**;
- *N*-(2,4-диметилфеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13g**.

Дослідження проводили на 9 клінічних штаммах грибів роду *Candida*: *C. pseudotropicalis* ВКПГУ 601/33, *C. parapsilosis* ВКПГУ 488/10, *C. kefyr* 85/2, *C. famata* 40 б/з, *C. famata* 18/2, *C. catenulata* (Скляр-27), *C. albicans* (Скляр-31), *C. albicans* (Скляр-20), *C. rugosa* (Скляр-2/1). Результати визначення пригнічуючої та фунгіцидної концентрації наведено в таблиці 5.7.

За результатами дослідження встановлено, що похідні 5-аміно-4-арил-сульфоніл-3-алкілтіопіразолів, що тестувалися, проявляють високу та помірну фунгістатичну активність в концентрації 12.5–50 мкг/мл, що свідчить про перспективність даного класу сполук в плані пошуку нових молекул – антифунгальних агентів.

Найбільш перспективною речовиною для розробки протигрибкової субстанції можна вважати 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол **3e**, який виявив високу фунгістатичну активність (в концентрації 12.5 мкг/мл) відносно чотирьох клінічних штамів *Candida*, та помірну фунгістатичну дію (в концентрації 25 мкг/мл) щодо решта п'яти штамів *Candida*.

Таблиця 5.7

**Протигрибкова дія похідних 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-
алкілтіопіразолів, мкг/мл**

№ п/п	Тест-штам мікроорганізму	Сполуки							
		3e		7a		13c		13g	
		МФ _{ст} К	МФ _ц К	МФ _{ст} К	МФ _ц К	МФ _{ст} К	МФ _ц К	МФ _{ст} К	МФ _ц К
1	<i>Candida pseudotropicalis</i> ВКПГУ 601/33	12.5	50	12.5	50	12.5	50	25	25
2	<i>Candida parapsilosis</i> ВКПГУ 488/10	25	50	25	50	12.5	25	25	50
3	<i>Candida kefyr</i> 85/2	12.5	50	50	50	25	50	12.5	50
4	<i>Candida famata</i> 40 б/з	25	100	12.5	50	100	100	50	100
5	<i>Candida famata</i> 18/2	25	50	25	25	50	50	25	50
6	<i>Candida catenulata</i> (Скляр-27)	12.5	25	12.5	50	50	100	50	100
7	<i>Candida albicans</i> (Скляр-31)	25	50	25	50	50	50	50	100
8	<i>Candida albicans</i> (Скляр-20)	12.5	50	25	50	25	50	50	50
9	<i>Candida rugosa</i> (Скляр-2/1)	25	25	25	25	50	100	25	25

5.4 Вплив похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу на формування резистентності у грам позитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida*

Розвиток резистентності багатьох бактеріальних патогенів до основних груп антибіотиків досить часто робить традиційну терапію неефективною.

Основні причини виникнення цього явища пов'язані як з природою мікроорганізму-збудника (мутації у звичайних генах, передача резистентності генів від одних мікроорганізмів до інших), так і з впливом зовнішніх чинників (послаблення імунного статусу людини, формування стійких внутрішньо лікарняних штамів тощо) .

Слід зазначити, що проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків виникла практично одночасно з їх відкриттям, і з часом процес формування толерантності мікроорганізму до антибіотика значно прискорився. Тому на сьогоднішній день стримування поширення вже існуючих резистентних форм мікроорганізмів та запобігання появі нових полірезистентних штамів залишається актуальною задачею сучасної антибіотикотерапії. Основними шляхами вирішення цієї проблеми слід вважати як пошук принципово нових молекул антибіотичної дії, так і раціональне та обережне застосування в медичній практиці відомих протимікробних засобів.

Враховуючи вище зазначене, нами було досліджено можливість формування стійкості у грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* до нових похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу. Вивчалось формування резистентності по відношенню до трьох музейних штамів мікроорганізмів: *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 і *C. albicans* ATCC 885-653. Для дослідження було обрано сполуки, які проявили високу протимікробну активність щодо зазначених збудників, а саме: *N*-(2'-флюоро-4'-бромфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7b** і *N*-(4''-флюорофеніл)-{(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл}ацетамід **7j** – для вивчення резистентності *St. aureus* ATCC 25923 та *E.coli* ATCC 25922; 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол **3e** – для дослідження стійкості *C. albicans* ATCC 885-653.

Вивчення проводили шляхом пасажів тест-штамів на живильних середовищах, що містили зростаючі дози тестуємих речовин. Усього було виконано по 30 пасажів на кожну речовину. У якості препаратів порівняння було

обрано антибіотики гентаміцин та ністатин. Дані щодо формування резистентності *St. aureus* ATCC 25923 до синтезованих сполук **7b** і **7j** наведені в таблиці 5.8.

Таблиця 5.8

**Вплив сполук 7b і 7j на формування резистентності
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

Код		Вихідна чутливість	Чутливість штамів після пасажів					
			5	10	15	20	25	30
7b	МБстК (мкг/мл)	12.5	12.5	25	25	25	50	100
	кратність зниження	0	0	2	2	2	4	8
7j	МБстК (мкг/мл)	12.5	12.5	12.5	25	50	50	100
	кратність зниження	0	0	0	2	4	4	8
ПП*	МстК (мкг/мл)	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	6.4	12.8
	кратність зниження	0	2	4	8	16	16	32

ПП* - Гентаміцин

Формування резистентності штаму *St. aureus* ATCC 25923 до сполук **7b** та **7j** відбувається повільно, але нерівномірно. Після 5-го пасажу вихідна МБстК не змінювалась у обох сполук, після 10 пасажів МБстК для сполуки **7j** залишилась на вихідному рівні, а для сполуки **7b** знизилась в 2 рази і це значення зберігалось і після 20 пасажів. Чутливість *St. aureus* ATCC 25923 до сполуки **7j** після 20 пасажів знизилась в 4 рази. Динаміка формування резистентності *St. aureus* ATCC 25923 до тестуємих сполук представлена на рис. 5.1.

Вихідна МБстК гентаміцину для штаму *St. aureus* ATCC 25923 в даному експерименті становила 0.4 мкг/мл. Після 5-го пасажу вона зросла у 2 рази, до 10 пасажу досягла 1.6 мкг/мл та перевищувала вихідний рівень у 4 рази. Після 15-го пасажу МБстК гентаміцину зросла у 8 разів, а після 20 – у 16 разів та зберігалась на цьому рівні до 25 пасажу. На момент закінчення експерименту МБстК становила 12.8 мкг/мл, що перевищувало вихідну кон-

центрацію у 32 рази.

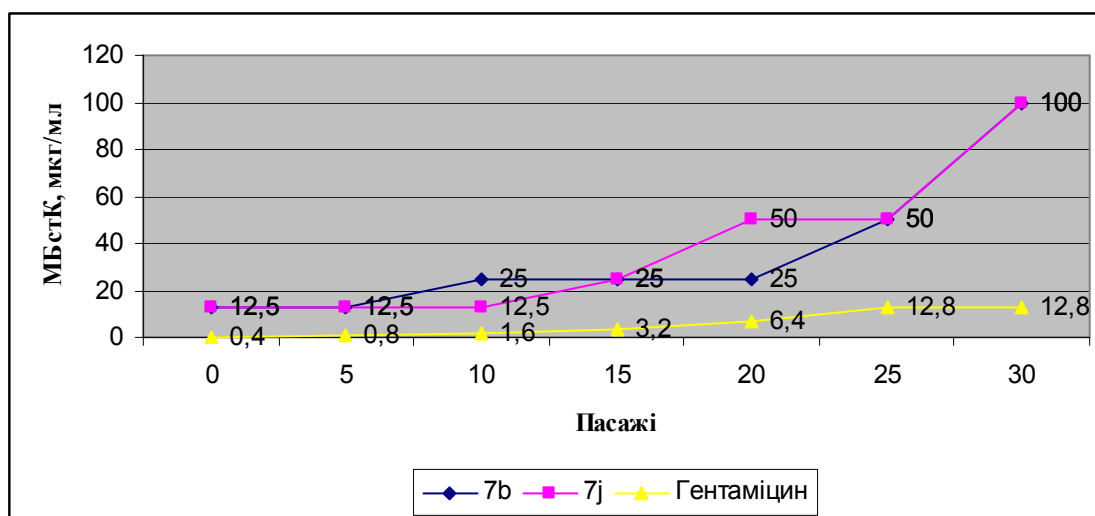


Рис. 5.1 Динаміка формування резистентності штаму *St. aureus* ATCC 25923 до сполук **7b** і **7j**.

Результати досліджень показали, що після 30 пасажів чутливість *St. aureus* ATCC 25923 до відібраних сполук зменшилась у 8 разів, що свідчить про досить повільне формування стійкості *St. aureus* ATCC 25923 до тестуємих речовин. По відношенню до препарату порівняння гентаміцину формування резистентності відбувається більш повільно.

Аналогічним чином було проведено визначення швидкості формування стійкості *E.coli* ATCC 25922 до відібраних сполук. Після 10-го пасажу не зафіксовано зростання МБстК тестуємих сполук. Після 15-го пасажу МБстК сполуки **7j** зростає у 2 рази, а МБстК сполуки **7b** залишилась на рівні вихідної. Після 20 пасажів МБстК обох сполук перевищувала вихідний рівень у 2 рази, а по завершенні експерименту МБстК обох речовин зростає у 8 разів.

Таблиця 5.9

**Вплив сполук 7b і 7j на формування резистентності
Escherichia coli ATCC 25922**

Код		Вихідна чутливість	Чутливість штамів після пасажів					
			5	10	15	20	25	30
7b	МБстК (мкг/мл)	25	25	25	25	50	50	100
	кратність зниження	0	0	0	0	2	2	8
7j	МБстК (мкг/мл)	25	25	25	50	50	100	100
	кратність зниження	0	0	0	2	2	8	8
ПП*	МстК (мкг/мл)	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	12.8
	кратність зниження	0	2	4	8	16	32	32

ПП* - Гентаміцин

Таким чином чутливість *E.coli* ATCC 25922 до похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфонілпіразолу формується повільно і після 30 пасажів зменшується у 8 разів (рис. 5.2).

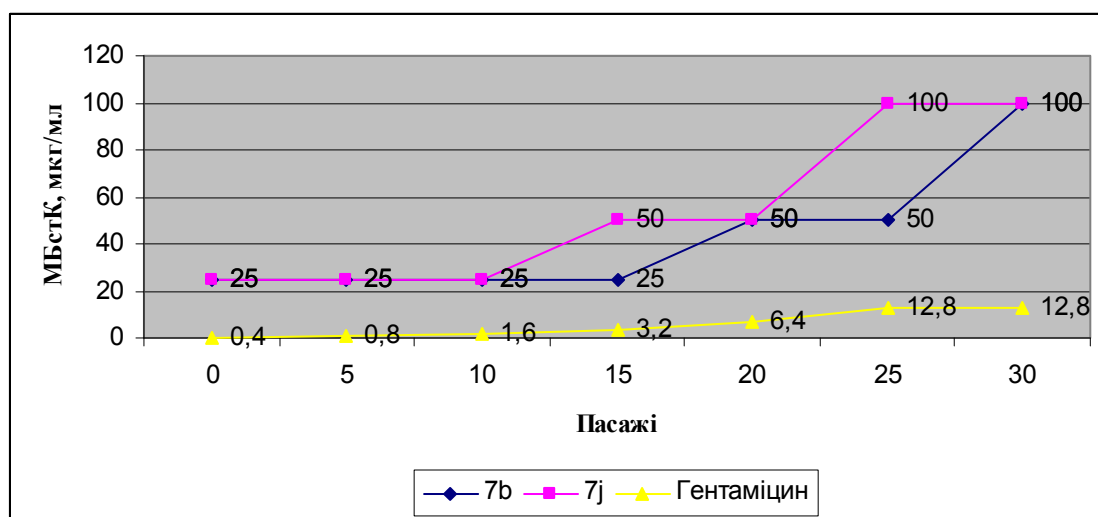


Рис. 5.2 Динаміка формування резистентності штаму *E.coli* ATCC 25922 до сполук 7b і 7j

Дослідження швидкості формування резистентності *Candida albicans* ATCC 885-653 до 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразолу 3e

проводили методом пасажів з використанням як препарату порівняння ністатину. Результати наведено в таблиці 5.10.

Таблиця 5.10

Вплив 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразолу *Зе* на формування резистентності *Candida albicans* АТСС 885-653

Код		Вихідна чутливість	Чутливість штамів після пасажів					
			5	10	15	20	25	30
Зе	МФстК (мкг/мл)	12.5	12.5	25	25	50	50	100
	кратність зниження	0	0	2	2	4	4	8
ПП*	МФстК (мкг/мл)	50	100	200	400	800	1600	1600
	кратність зниження	0	2	4	8	16	32	32

ПП* - Ністатин

Отримані дані свідчать, що формування резистентності у *Candida albicans* АТСС 885-653 до 5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразолу *Зе* відбувається дуже повільно. По завершенню експерименту після 30 пасажів МФстК зростає лише у 8 разів. Чутливість даного штаму до препарату порівняння ністатину зменшується набагато швидше, та по завершенню експерименту його МФстК знизилась у 32 рази (рис. 5.3).

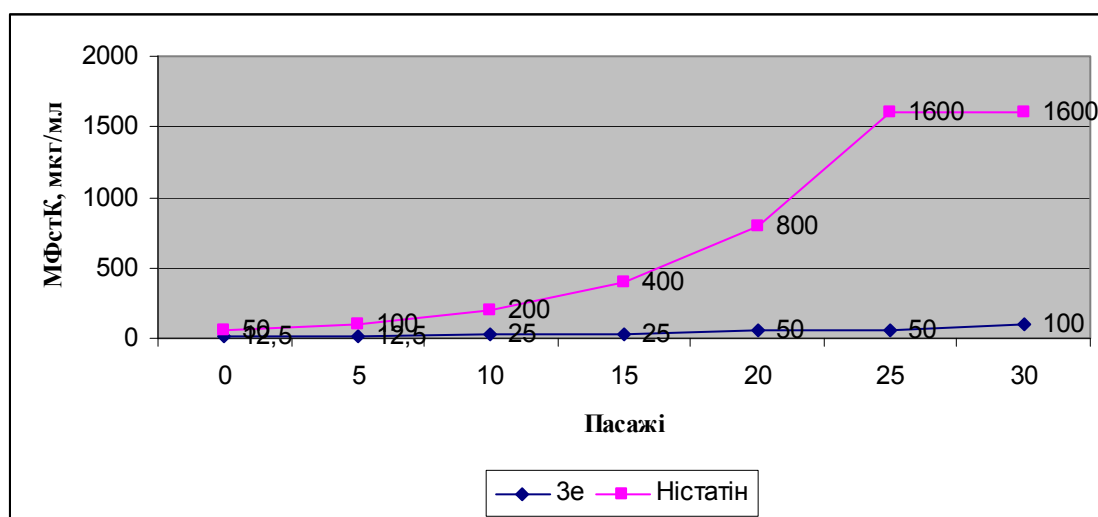


Рис. 5.3 Динаміка формування резистентності штаму *Candida albicans* АТСС 885-653 до сполуки *Зе*.

Висновки до розділу 5

1. Базуючись на сучасних методах *in silico* досліджень сплановано та проведено мікробіологічний скринінг 46 вперше синтезованих похідних 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолів на 37 штаммах мікроорганізмів. Встановлено, що значна більшість протестованих речовин проявляють високу протимікробну та протигрибкову активність. Встановлено повільне формування стійкості музейних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 і *C.albicans* ATCC 885-653 до цих речовин.

2. Для проведення поглиблених фармакологічних досліджень в якості протигрибкового агента рекомендовано 4-(4-хлорофеніл)сульфоніл-5-аміно-3-етилтіо-піразол; та *N*-(2'-флюоро-4'-бромофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід, який показав високу активність по відношенню до грампозитивної мікрофлори.

3. Встановлені елементи залежності «структура–активність» дозволили визначити оптимальні шляхи модифікації структури та запропонувати раціональний дизайн біологічно активних молекул на основі базової структури 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолу для подальшої розробки протимікробних та протигрибкових агентів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Ткаченко П. В., Ткаченко Е. В., Журавель И. А., Казмирчук В. В., Дербисбекова У. Б. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонил-производных 5-аминопиразолов. *Вестник КазНМУ*. 2017. № 2. С. 317–321.

2. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkylthiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action. *Вісник фармації*. 2017. № 2. С. 25–30.

3. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O., Kazmirchuk V. V. The synthesis and the antimicrobial activity of N^1 -substituted 5-amino-4-arylsulfonyl-3-*N*-phenylamano-pyrazoles. *Вісник фармації*. 2017. № 3. С. 3–9.

4. Ткаченко П. В., Ткаченко О. В., Журавель І. О., Казмірчук В. В. 4-(4'-Хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразол, який проявляє протигрибкову активність. Патент на корисну модель UA 124716, МПК А61К 31/505, С07D 239/69; Заявл. и 2017 09272 від 21.09.2017; Опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8.– 4 с.

РОЗДІЛ 6

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Загальна методика синтезу алкіл/арилсульфонілацетонітрилів 1a-f.

До розчину натрій гідрокарбонату (0.15 моль, 12.6 г) та натрій сульфату (0.15 моль, 18.9 г) в 50 мл води невеликими порціями додавали відповідний алкіл/арилсульфохлорид (0.15 моль). Реакційну масу інтенсивно перемішували протягом 1.5–2 годин. Отриманий в ході реакції натрій сульфат висушували на роторному випарнику, додавали 20 мл ДМФА та ретельно перемішували до утворення суспензії. До суміші порціями додавали хлороацетонітрил (0.15 моль, 11.3 г), продовжуючи перемішування протягом ще дві години при температурі 70–100°C. Після охолодження до кімнатної температури в колбу з реакційною масою додавали 150–200 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, ретельно промиваючи водою.

Метилсульфонілацетонітрил 1a. Вихід 86%.

Фенілсульфонілацетонітрил 1b. Вихід 91%.

4-Флюорофенілсульфонілацетонітрил 1c. Вихід 79%.

4-Хлорофенілсульфонілацетонітрил 1d. Вихід 92%.

4-Метилфенілсульфонілацетонітрил 1e. Вихід 88%.

4-Метоксифенілсульфонілацетонітрил 1f. Вихід 87%.

Загальна методика синтезу алкіл/арилсульфоніл-[2,2-біс-(метилтіо)вініл]-ацетонітрилів 2a-f. До суміші відповідного алкіл/арилсульфонілацетонітрилу **1** (80 ммоль) і сірковуглецю (90 ммоль, 5.4 мл) в 150 мл діоксану додавали розчин натрій гідроксиду (180 ммоль, 7.2 г) в 100 мл води і перемішували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Далі додавали метилйодид (180 ммоль, 21.2 мл), перемішували при кімнатній температурі ще протягом 3 годин. Суміш розбавляли 200 мл води. Осад, що утворився,

відфільтровували, промивали водою і сумішшю пропанол-2 – вода (1 : 1). Використовували в подальшому синтезі без додаткового очищення.

Метилсульфоніл-[2,2-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2a. Вихід 73%.

Фенілсульфоніл-[2,2-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2b. Вихід 91%.

4-Флюорофенілсульфоніл-[2',2'-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2c.
Вихід 69%.

4-Хлорофенілсульфоніл-[2',2'-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2d. Вихід 70%.

4-Метилфенілсульфоніл-[2',2'-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2e.
Вихід 67%.

4-Метоксифенілсульфоніл-[2',2'-біс-(метилтіо)вініл]ацетонітрил 2f.
Вихід 82%.

Загальна методика синтезу алкіл/арилсульфоніл-[2,2-біс-(етилтіо)вініл]-ацетонітрилів 2g-i. До суміші відповідного алкіл/арилсульфонілацетонітрилу **1** (80 ммоль) і сірковуглецю (90 ммоль, 5.4 мл) в 150 мл діоксану додавали розчин натрій гідроксиду (180 ммоль, 7.2 г) в 100 мл води і перемішували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Далі додавали етилхлорид (180 ммоль, 11.6 г), перемішували при кімнатній температурі ще протягом 3 годин. Суміш розбавляли 200 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою і сумішшю пропанол-2 – вода (1 : 1). Використовували в подальшому синтезі без додаткового очищення.

Фенілсульфоніл-[2,2-біс-(етилтіо)вініл]ацетонітрил 2g. Вихід 71%.

4-Хлорофенілсульфоніл-[2',2'-біс-(етилтіо)вініл]ацетонітрил 2h. Вихід 79%.

4-Метилфенілсульфоніл-[2',2'-біс-(етилтіо)вініл]ацетонітрил 2i. Вихід 76%.

Загальна методика синтезу 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразолів 3a-g. До розчину відповідного *S,S*-ацеталю **2** (80 ммоль) в 250

мл пропанолу-2 додавали гідрозин-гідрат (84 ммоль, 4.2 мл) та декілька крапель триетиламіну. Суміш кип'ятили протягом 3 годин, охолоджували та розбавляли 200 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою і сумішшю пропанол-2 – вода (1 : 1). Кристалізували із метанолу.

5-Аміно-4-метилсульфоніл-3-метилтіопіразол 3a. Вихід 69%; Т.пл. 217-18°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.38 (s, 3H, SCH₃), 2.96 (s, 3H, CH₃), 5.80 (s, 2H, NH₂), 12.00 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₅H₉N₃O₂S₂: розр. N, 20.27; експ. N, 20.30.

5-Аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 3b. Вихід 87%; Т.пл. 188°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.43 (s, 1H, SCH₃), 6.09 (s, 2H, NH₂), 7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.89 (d, 2H, Ar-H), 11.97 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₀H₁₁N₃O₂S₂: розр. N, 15.60; експ. N, 15.60.

5-Аміно-4-фенілсульфоніл-3-етилтіопіразол 3c. Вихід 76%; Т.пл. 236-38°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.13 (t, 3H, CH₃), 2.90 (q, 2H, CH₂), 6.12 (s, 2H, NH₂), 7.56 (d, 2H, Ar-H), 7.59 (s, 1H, Ar-H), 7.89 (d, 2H, Ar-H), 12.00 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₁H₁₃N₃O₂S₂: розр. N, 14.83; експ. N, 14.80.

5-Аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 3d. Вихід 82%; Т.пл. 209-11°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.32 (s, 3H, SCH₃), 6.17 (s, 2H, NH₂), 7.65 (d, 2H, Ar-H), 7.91 (d, 2H, Ar-H), 11.98 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₀H₁₀ClN₃O₂S₂: розр. N, 13.83; експ. N, 13.83.

5-Аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол 3e. Вихід 92%; Т.пл. 212-13°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.12 (t, 3H, CH₃), 2.87 (q, 2H, CH₂), 6.17 (s, 2H, NH₂), 7.64 (d, 2H, Ar-H), 7.89 (d, 2H, Ar-H), 12.00 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₁H₁₂ClN₃O₂S₂: розр. N, 13.22; експ. N, 13.23.

5-Аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол 3f. Вихід 62%; Т.пл. 244°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.19 (t, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.85 (q, 2H, CH₂), 6.08 (s, 2H, NH₂), 7.36 (d, 2H, Ar-H), 7.78 (d, 2H, Ar-H), 12.00 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₂H₁₅N₃O₂S₂: розр. N, 14.12; експ. N, 14.15.

5-Аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 3g. Вихід 87%; Т.пл. 212-13°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.36 (s, 3H, SCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.21 (s, 2H, NH₂), 7.51 (d, 2H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H), 11.22 (br.s, 1H, NH). Анал. для C₁₁H₁₃N₃O₃S₂: розр. N, 14.04; експ. N, 14.06.

Методики контролю якості субстанції 4-(4'-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу.

Ідентифікація. А. 10.0 мг субстанції розчиняють у метанолі Р та доводять до 50.0 мл тим самим розчинником. 5.0 мл отриманого розчину доводять до об'єму 25.0 мл метанолом Р.

Ультрафіолетовий спектр поглинання одержаного розчину в області довжин хвиль від 250 нм до 450 нм має максимуми за довжин хвиль 245±2 нм та 368±2 нм.

В. Інфрачервоний спектр поглинання субстанції в дисках із калію броміду Р в області від 400 см⁻¹ до 4000 см⁻¹ має наступні смуги поглинання: 3426, 2406, 1612, 1447 см⁻¹.

Кількісне визначення: 0,200 г субстанції розчиняли у 50,0 мл оцтової кислоти, титрували 0,1 М розчином хлорної кислоти потенціометрично до першого стрибка потенціалів на кривій титрування. 1 мл 0,1 М розчину хлорної кислоти відповідає 31,78 мг 4-(4-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу.

Вміст 4-(4-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу у субстанції, в процентах, розраховували за формулою:

$$X = \frac{V \cdot 0,03178 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \text{ де:}$$

V – об'єм 0,1 М розчину хлорної кислоти, що витрачено титрування досліджуваного розчину, мл;

K – коефіцієнт поправки;

0,03178 – кількість грам 4-(4-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-аміно-

піразолу, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину хлорної кислоти;

m – маса наважки субстанції;

W – значення зменшення маси при висушуванні субстанції, %.

Таблиця 6.1

Розрахунок невизначеності методики аналізу

Фактор	Розрахунок невизначеності, %
<u>Пробоподготовка:</u> -взяття наважки 200 мг.	$\Delta_{m1} = 0,2/200*100\% = 0,1$
<u>Кінцева аналітична операція:</u> -невизначеність концентрації 0,1 М розчину хлорної кислоти: наважка <i>калюй гідрофтала</i> PO при встановленні титру 0,1 М розчину хлорної кислоти– 350 мг; ▪встановлення титру – бюретка 25 мл з невизначенністю 0,05 мл) - невизначеність титрування субстанції (бюретка 25 мл з невизначенністю 0,05 мл)	$\Delta_{m2} = 0,2/350*100\% = 0,057$ $\Delta_{v2} = 0,05*25/100 = 0,2$ Δ_{v3} $= 0,05*25/100 = 0,2$

Таблиця 6.2

**Результат визначення параметрів лінійності, прецизійності і
правильності методики**

Розчин №	Введено X_i , г	Об'єм титранту, $V_{\text{екв}}$, мл	Y_i Знайдено, г	$Z_i = Y_i / X_i * 100\%$
1	0,162	5,09	0,162	99,94
2	0,172	5,41	0,172	100,29
3	0,181	5,73	0,182	100,33
4	0,199	6,33	0,200	100,50
5	0,201	6,36	0,202	100,65
6	0,221	6,99	0,222	100,24
7	0,221	6,99	0,222	100,45
8	0,240	7,61	0,241	100,37
9	0,240	7,61	0,239	99,54
<i>Середнє значення $Z_{\text{ср}}$</i>				<i>100,26</i>
<i>S_0 (стандартне відхилення), %</i>				<i>0,332</i>
<i>Відносний довірчий інтервал, $\Delta z = t(95\%, 8) * S_0(\%) = 1,8595 * S_0(\%)$</i>				<i>0,618</i>
<i>Похибка, $\delta = Z_{\text{ср}} - 100$</i>				<i>0,26</i>

Загальна методика синтезу N^1 -алкіл-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів 5a-b. До розчину калій карбонату (0.28 г, 0.002 моль) в 15 мл ДМФА додавали 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразол **3** (0.007 моль) і відповідний алкілюючий агент (метилйодид, етилхлорид) (0.009 моль). Реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівали до 80°C протягом 60 хвилин. Далі масу охолоджували до кімнатної температури і додавали 60 мл 50%-ного водного розчину пропанолу-2. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (двічі по 5 мл) і метанолом (3 мл).

5-Аміно- N^1 -метил-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 5a. Вихід 68%; Т.пл. 213-15°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.36 (s, 3H,

SCH₃), 3.49 (s, 3H, NCH₃), 6.26 (s, 2H, NH₂), 7.35 (d, 2H, Ar-H), 7.76 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₂H₁₅N₃O₂S₂: розр. N, 14.12; експ. N, 14.15.

5-Аміно-N¹-етил-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 5b. Вихід 73%; Т.пл. 181-82°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.15 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.25 (s, 3H, SCH₃), 3.82 (q, 2H, CH₂CH₃), 6.32 (s, 2H, NH₂), 7.55 (m, 3H, Ar-H), 7.86 (dd, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₂H₁₅N₃O₂S₂: розр. N, 14.12; експ. N, 14.12.

Загальна методика синтезу N¹-бензил-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів ба-о. До розчину калій карбонату (0.62 г, 0.0045 моль) в 30 мл ДМФА додавали 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразол **3** (0.0015 моль) і відповідний бензилхлорид (0.0018 моль). Реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівали до 80°C протягом 40 хвилин. Далі масу охолоджували до кімнатної температури і додавали 60 мл 50%-ного водного розчину пропанолу-2. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (двічі по 10 мл), метанолом (7 мл) і висушували.

5-Аміно-N¹-бензил-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол ба. Вихід 81%; Т.пл. 197-99°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.26 (s, 3H, SCH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 6.52 (s, 2H, NH₂), 7.10 (d, 2H, Ar-H), 7.28 (s+d, 3H, Ar-H), 7.58 (s+d, 3H, Ar-H), 7.92 (d, 2H, Ar-H); *m/z*: 359 [M⁺]. Анал. для C₁₇H₁₇N₃O₂S₂: розр. N, 11.68; експ. N, 11.72.

5-Аміно-N¹-(2'-флюоробензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол бб. Вихід 78%; Т.пл. 273-75°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.24 (s, 3H, SCH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 6.41 (s, 2H, NH₂), 7.16 (m, 4H, Ar-H), 7.55 (m, 3H, Ar-H), 7.81 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₇H₁₆FN₃O₂S₂: розр. N, 11.13; експ. N, 11.16.

5-Аміно-N¹-(2'-хлоробензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол бс. Вихід 83%; Т.пл. 255°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.26 (s, 3H, SCH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 6.44 (s, 2H, NH₂), 7.22-7.38 (m, 4H, Ar-H), 7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₇H₁₆ClN₃O₂S₂: розр. N, 10.67; експ. N, 10.66.

5-Аміно- N^1 -(3'-хлоробензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6d**.
 Вихід 63%; Т.пл. 261-63°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.29 (s, 3H, SCH₃), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.47 (s, 2H, NH₂), 7.10 (m, 1H, Ar-H), 7.35 (m, 3H, Ar-H), 7.61 (m, 3H, Ar-H), 7.80 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₇H₁₆ClN₃O₂S₂: розр. N, 10.67; експ. N, 10.68.

5-Аміно- N^1 -(4'-хлоробензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6e**.
 Вихід 90%; Т.пл. 247-48°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.31 (s, 3H, SCH₃), 5.06 (s, 2H, CH₂), 6.49 (s, 2H, NH₂), 7.14 (m, 2H, Ar-H), 7.36 (d, 2H, Ar-H), 7.57 (m, 3H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₇H₁₆ClN₃O₂S₂: розр. N, 10.67; експ. N, 10.69.

5-Аміно- N^1 -(4'-бромобензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6f**.
 Вихід 88%; Т.пл. 292°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.35 (s, 3H, SCH₃), 5.18 (s, 2H, CH₂), 6.41 (s, 2H, NH₂), 7.22 (d, 2H, Ar-H), 7.56 (d, 2H, Ar-H), 7.57-7.72 (m, 5H, Ar-H). Анал. для C₁₇H₁₆BrN₃O₂S₂: розр. N, 9.59; експ. N, 9.62.

5-Аміно- N^1 -(4'-метилбензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6g**.
 Вихід 66%; Т.пл. 220-21°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, SCH₃), 5.05 (s, 2H, CH₂), 6.49 (s, 2H, NH₂), 7.02 (d, 2H, Ar-H), 7.09 (d, 2H, Ar-H), 7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H); m/z : 373 [M⁺]. Анал. для C₁₈H₁₉N₃O₂S₂: розр. N, 11.24; експ. N, 11.26.

5-Аміно- N^1 -(2',4'-диметилбензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6h**. Вихід 70%; Т.пл. 216-17°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.15 (s, 6H, 2CH₃), 2.26 (s, 3H, SCH₃), 5.04 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.90 (s+d, 2H, Ar-H), 7.60 (s+m, 4H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₉H₂₁N₃O₂S₂: розр. N, 10.84; експ. N, 10.84.

5-Аміно- N^1 -(2',5'-диметилбензил)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **6i**. Вихід 79%; Т.пл. 235-38°C; ^1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, SCH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 6.41 (s, 2H, NH₂), 6.85 (s, 1H, Ar-H),

7.08 (s, 2H, Ar-H), 7.55 (d, 2H, Ar-H), 7.71 (m, 3H, Ar-H). Анал. для $C_{19}H_{21}N_3O_2S_2$: розр. N, 10.84; експ. N, 10.86.

5-Аміно- N^1 -(2'-флюоробензил)-4-(4''-хлорофеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6j. Вихід 80%; Т.пл. 269-72°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.22 (s, 3H, SCH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 6.47 (s, 2H, NH₂), 7.10-7.23 (m, 4H, Ar-H), 7.65 (d, 2H, Ar-H), 7.92 (d, 2H, Ar-H). Анал. для $C_{17}H_{15}ClFN_3O_2S_2$: розр. N, 10.20; експ. N, 10.23.

5-Аміно- N^1 -(4'-флюоробензил)-4-(4''-метилфеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6k. Вихід 64%; Т.пл. 270°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, SCH₃), 5.04 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.90 (s+d, 2H, Ar-H), 7.60 (s+m, 4H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H). Анал. для $C_{18}H_{18}FN_3O_2S_2$: розр. N, 10.73; експ. N, 10.75.

5-Аміно- N^1 -(4'-хлоробензил)-4-(4''-метилфеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6l. Вихід 75%; Т.пл. 293-96°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, SCH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 6.39 (s, 2H, NH₂), 7.14 (m, 2H, Ar-H), 7.36 (d, 2H, Ar-H), 7.66 (d, 2H, Ar-H), 7.93 (d, 2H, Ar-H). Анал. для $C_{18}H_{18}ClN_3O_2S_2$: розр. N, 10.30; експ. N, 10.30.

5-Аміно- N^1 -(2',5'-диметилбензил)-4-(4''-метилфеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6m. Вихід 68%; Т.пл. 286°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 6H, CH₃ + SCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 6.37 (s, 2H, NH₂), 6.86 (s, 1H, Ar-H), 7.02 (s, 2H, Ar-H), 7.55 (d, 2H, Ar-H), 7.74 (d, 2H, Ar-H). Анал. для $C_{20}H_{23}N_3O_2S_2$: розр. N, 10.46; експ. N, 10.47.

5-Аміно- N^1 -(2'-метилбензил)-4-(4''-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6n. Вихід 92%; Т.пл. 267-68°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, SCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 5.07 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.86 (d, 1H, Ar-H), 7.09 (d, 2H, Ar-H), 7.26 (m, 3H, Ar-H), 7.85 (d, 2H, Ar-H). Анал. для $C_{19}H_{21}N_3O_3S_2$: розр. N, 10.41; експ. N, 10.44.

5-Аміно- N^1 -(4'-метилбензил)-4-(4''-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол 6o. Вихід 85%; Т.пл. 222-24°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.26 (s, 3H, CH₃),

2.36 (s, 3H, SCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 5.07 (s, 2H, CH₂), 6.40 (s, 2H, NH₂), 6.86 (d, 2H, Ar-H), 7.12 (d, 2H, Ar-H), 7.56 (d, 2H, Ar-H), 7.81 (d, 2H, Ar-H). Анал. для C₁₉H₂₁N₃O₃S₂: розр. N, 10.41; експ. N, 10.42.

Загальна методика синтезу N-арил-(5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамідів 7а-м. До розчину калій карбонату (0.62 г, 0.0045 моль) в 30 мл ДМФА додавали 4-алкіл/арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразол **3** (0.0015 моль) і відповідний N-арилхлорацетамід (0.0018 моль). Реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівали до 80°C протягом 40 хвилин. Далі масу охолоджували до кімнатної температури і додавали 60 мл 50%-ного водного розчину пропанолу-2. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (двічі по 10 мл) і метанолом (7 мл).

N-(2',5'-Дифлюорофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7а**. Вихід 74%; Т.пл. 266-67°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.25 (s, 3H, SCH₃), 4.82 (s, 2H, CH₂), 6.49 (s, 2H, NH₂), 6.96 (m, 1H, Ar-H), 7.32 (m, 1H, Ar-H), 7.56 (d+m, 3H, Ar-H), 7.95 (d+m, 3H, Ar-H), 10.31 (s, 1H, NH). Анал. для C₁₈H₁₆F₂N₄O₃S₂: розр. N, 12.77; експ. N, 12.80.

N-(2'-Флюоро-4'-бромофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7б**. Вихід 83%; Т.пл. 219-20°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.29 (s, 3H, SCH₃), 4.85 (s, 2H, CH₂), 6.50 (s, 2H, NH₂), 7.34 (d, 1H, Ar-H), 7.60 (m, 4H, Ar-H), 7.95 (m, 3H, Ar-H), 10.18 (s, 1H, NH). Анал. для C₁₈H₁₆BrFN₄O₃S₂: розр. N, 11.21; експ. N, 11.18.

N-(2'-Хлоро-4'-флюорофеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7с**. Вихід 77%; Т.пл. 258-59°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.30 (s, 3H, SCH₃), 4.81 (s, 2H, CH₂), 6.51 (s, 2H, NH₂), 7.20 (m, 1H, Ar-H), 7.55 (m, 4H, Ar-H), 7.74 (m, 1H, Ar-H), 7.94 (dd, 2H, Ar-H), 9.78 (s, 1H, NH). Анал. для C₁₈H₁₆ClFN₄O₃S₂: розр. N, 12.30; експ. N, 12.35.

N-(2'-Етилфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)-ацетамід **7д**. Вихід 64%; Т.пл. 231-32°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.06 (t, 3H,

CH₂CH₃), 2.30 (s, 3H, SCH₃), 2.53 (q, 2H, CH₂CH₃), 4.78 (s, 2H, CH₂), 6.47 (s, 2H, NH₂), 7.10–7.21 (m, 3H, Ar-H), 7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.59 (d, 2H, Ar-H), 7.63 (d, 1H, Ar-H), 7.94 (d, 2H, Ar-H), 9.24 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₀H₂₂N₄O₃S₂: розр. N, 13.00; експ. N, 13.03.

N-(4'-Метоксифеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7e**. Вихід 59%; Т.пл. 273-75°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 2.27 (s, 3H, SCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.45 (s, 2H, NH₂), 6.86 (d, 2H, Ar-H), 7.43 (d, 2H, Ar-H), 7.60 (s+m, 3H, Ar-H), 7.92 (dd, 2H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, NH); Анал. для C₁₉H₂₀N₄O₄S₂: розр. N, 12.94; експ. N, 12.98.

N-(2',5'-Диметоксифеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7f**. Вихід 71%; Т.пл. 198-99°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.26 (s, 3H, SCH₃), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.81 (s, 2H, CH₂), 6.50 (s, 2H, NH₂), 6.57 (m, 1H, Ar-H), 6.94 (d, 1H, Ar-H), 7.55–7.71 (m, 4H, Ar-H), 7.92 (d, 2H, Ar-H), 9.30 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₀H₂₂N₄O₅S₂: розр. N, 12.10; експ. N, 12.08.

N-(2'-Метокси-5'-метилфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7g**. Вихід 84%; Т.пл. 211-13°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, SCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.82 (s, 2H, CH₂), 6.46 (s, 2H, NH₂), 6.87 (m, 2H, Ar-H), 7.55 (d, 2H, Ar-H), 7.59 (s, 1H, Ar-H), 7.83 (s, 1H, Ar-H), 7.95 (d, 2H, Ar-H), 9.23 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₀H₂₂N₄O₄S₂: розр. N, 12.54; експ. N, 12.53.

N-(3'',5''-Диметилфеніл)-{(5-аміно-4-(4'-хлорофеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7h**. Вихід 69%; Т.пл. 240°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.13 (t, 3H, CH₃), 2.16 (s, 6H, 2CH₃), 2.84 (q, 2H, CH₂), 4.71 (s, 2H, CH₂), 6.48 (br.s, 2H, NH₂), 6.70 (s, 1H, Ar-H), 7.15 (s, 2H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H), 7.94 (d, 2H, Ar-H), 10.06 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₁H₂₃ClN₄O₃S₂: розр. N, 11.69; експ. N, 11.72.

N-(2''-Флюорофеніл)-(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7i**. Вихід 61%; Т.пл. 250-52°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.13 (t,

3H, SCH₂CH₃), 2.83 (q, 2H, SCH₂CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.73 (s, 2H, CH₂), 6.40 (s, 2H, NH₂), 7.10–7.17 (d+m, 4H, Ar-H), 7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 10.35 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₂₁FN₄O₄S₂: розр. N, 12.05; експ. N, 12.08.

N-(4''-Флюорофеніл)-{(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7j**. Вихід 80%; Т.пл. 278-80°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.12 (t, 3H, CH₃), 2.83 (q, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.74 (s, 2H, CH₂), 6.40 (s, 2H, NH₂), 7.09–7.18 (m, 4H, Ar-H), 7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H), 10.28 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₂₁FN₄O₄S₂: розр. N, 12.05; експ. N, 12.07.

N-(3'',5''-Диметилфеніл)-(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7k**. Вихід 69%; Т.пл. 257-58°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.12 (t, 3H, SCH₂CH₃), 2.19 (s, 6H, 2CH₃), 2.84 (q, 2H, SCH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.67 (s, 2H, CH₂), 6.38 (s, 2H, NH₂), 6.68 (s, 1H, Ar-H), 7.08 (d, 2H, Ar-H), 7.15 (s, 1H, Ar-H), 7.85 (d, 2H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₂H₂₆N₄O₄S₂: розр. N, 11.79; експ. N, 11.81.

N-(3''-Етилфеніл)-(5-аміно-4-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-3-етилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7l**. Вихід 67%; Т.пл. 245°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.12 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.15 (t, 3H, SCH₂CH₃), 2.54 (q, 2H, CH₂CH₃), 2.86 (q, 2H, SCH₂CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.71 (s, 2H, CH₂), 6.80 (br.s, 2H, NH₂), 6.90 (d, 1H, Ar-H), 7.09 (d, 2H, Ar-H), 7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.33 (m, 1H, Ar-H), 7.45 (s, 1H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H), 10.12 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₂H₂₆N₄O₄S₂: розр. N, 11.79; експ. N, 11.83.

N-(3',4'-Диметилфеніл)-(5-аміно-4-метилсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **7m**. Вихід 74%; Т.пл. 234-36°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 2.33 (s, 3H, SCH₃), 3.00 (s, 3H, CH₃), 4.74 (s, 2H, CH₂), 6.23 (s, 2H, NH₂), 7.03 (d, 1H, Ar-H), 7.22 (d, 1H, Ar-H), 7.31 (s, 1H, Ar-H), 10.10 (s, 1H, NH); *m/z*: 369 [M⁺]. Анал. для C₁₅H₂₀N₄O₃S₂: розр. N, 15.19; експ. N, 15.16.

Загальна методика синтезу N^1 -бензил-4-арилсульфоніл-5-(N -ацетиламіно)-3-метилтіопіразолів 8a-k. Суміш N^1 -бензил-4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолу **6** (1.5 ммоль) та відповідного хлорангідриду карбонової кислоти (1.7 ммоль) кип'ятили в діоксані (10 мл) протягом двох годин. Далі суміш охолоджували до кімнатної температури і розбавляли водою (10 мл). Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (2 рази по 5 мл) та метанолом (7 мл). Кристалізували із суміші метанол – діоксан (1 : 1).

N^1 -Бензил-5-(N -ацетиламіно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 8a. Вихід 71%; Т.пл. 253-55°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 2.08 (t, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, SCH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 7.19 (d, 2H, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 7.32 (d, 2H, Ar-H), 7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H), 10.25 (s, 1H, NH); m/z : 402 [M⁺]; Анал. для C₁₉H₁₉N₃O₃S₂: розр. N, 10.47; експ. N, 10.43.

N^1 -Бензил-5-(N -хлороацетиламіно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 8b. Вихід 62%; Т.пл. 217-19°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 2.31 (s, 3H, SCH₃), 4.34 (s, 2H, CH₂), 5.10 (s, 2H, CH₂), 7.19-7.29 (m, 5H, Ar-H), 7.54-7.68 (m, 3H, Ar-H), 7.93 (dd, 2H, Ar-H), 10.65 (s, 1H, NH); m/z : 437 [M+1⁺]; Анал. для C₁₉H₁₈ClN₃O₃S₂: розр. N, 9.64; експ. N, 9.66.

N^1 -Бензил-5-(N -пропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 8c. Вихід 67%; Т.пл. 249-52°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 1.02 (t, 3H, CH₃), 2.22 (m, 2H, CH₂), 2.32 (s, 3H, SCH₃), 5.03 (m, 2H, CH₂), 7.24 (d+m, 5H, Ar-H), 7.60 (m, 3H, Ar-H), 7.87 (m, 2H, Ar-H), 10.10 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₂₁N₃O₃S₂: розр. N, 10.11; експ. N, 10.14.

N^1 -(2',4'-Диметилбензил)-5-(N -ацетиламіно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 8d. Вихід 52%; Т.пл. 261-62°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 6H, 2CH₃), 2.29 (s, 3H, SCH₃), 5.02 (s, 2H, CH₂), 6.81 (m, 1H, Ar-H), 6.95 (d, 2H, Ar-H), 7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.95 (d, 2H, Ar-H), 10.20 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₁H₂₃N₃O₂S₂: розр. N, 10.16; експ. N, 10.16.

N^1 -(2',5'-Диметилбензил)-5-(N -пропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол 8e. Вихід 57%; Т.пл. 282°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 0.85 (t, 3H, CH₃),

2.15 (t, 3H, CH₃), 2.20 (t, 3H, CH₃), 2.22 (m, 2H, CH₂), 2.44 (s, 3H, SCH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 6.84 (s, 1H, Ar-H), 7.04 (s, 2H, Ar-H), 7.57 (d, 2H, Ar-H), 7.74 (m, 3H, Ar-H), 10.20 (s, 1H, NH); *m/z*: 444 [M⁺]; Анал. для C₂₂H₂₅N₃O₂S₂: розр. N, 9.83; експ. N, 9.87.

*N*¹-(2'-Флюоробензил)-5-(*N*-пропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **8f**. Вихід 44%; Т.пл. 298-99°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.02 (t, 3H, CH₃), 2.32 (m, 2H, CH₂), 2.37 (s, 3H, SCH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 7.12 (m, 4H, Ar-H), 7.57 (m, 3H, Ar-H), 7.82 (d, 2H, Ar-H), 10.15 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₂₀FN₃O₃S₂: розр. N, 9.69; експ. N, 9.72.

*N*¹-(3'-Хлоробензил)-5-(*N*-пропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **8g**. Вихід 49%; Т.пл. 255-57°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.05 (t, 3H, CH₃), 2.30 (m, 2H, CH₂), 2.41 (s, 3H, SCH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 7.12 (m, 1H, Ar-H), 7.30 (m, 3H, Ar-H), 7.60 (m, 3H, Ar-H), 7.88 (d, 2H, Ar-H), 10.17 (br.s, 1H, NH); *m/z*: 451 [M+1⁺]; Анал. для C₂₀H₂₀ClN₃O₃S₂: розр. N, 9.34; експ. N, 9.33.

*N*¹-(4'-Хлоробензил)-5-(*N*-пропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **8h**. Вихід 79%; Т.пл. >300°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.05 (t, 3H, CH₃), 2.30 (m, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, SCH₃), 5.09 (s, 2H, CH₂), 7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (d, 2H, Ar-H), 7.57 (m, 3H, Ar-H), 7.83 (d, 2H, Ar-H), 10.15 (s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₂₀ClN₃O₃S₂: розр. N, 9.34; експ. N, 9.37.

*N*¹-(2'-Флюоробензил)-5-(*N*-пропіонаміно)-4-(4''-хлорофеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **8i**. Вихід 60%; Т.пл. >300°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.01 (t, 3H, CH₃), 2.28 (m, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, SCH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂), 7.11 (m, 3H, Ar-H), 7.30 (m, 1H, Ar-H), 7.66 (d, 2H, Ar-H), 7.85 (d, 2H, Ar-H), 10.21 (br.s, 1H, NH); Анал. для C₂₀H₁₉ClFN₃O₃S₂: розр. N, 8.98; експ. N, 9.01.

*N*¹-(2'-Метилбензил)-5-(*N*-ацетиламіно)-4-(4''-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **8j**. Вихід 68%; Т.пл. 288-90°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, SCH₃), 5.04 (s, 2H, CH₂), 6.86 (d, 1H,

Ar-H), 7.07 (d, 2H, Ar-H), 7.15 (m, 3H, Ar-H), 7.82 (d, 2H, Ar-H), 10.12 (s, 1H, NH); Анал. для $C_{21}H_{23}N_3O_4S_2$: розр. N, 9.43; експ. N, 9.42.

*N*¹-(4-Метилбензил)-5-(*N*-пропіонаміно)-4-(4-метоксифеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **8k**. Вихід 72%; Т.пл. >300°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.03 (t, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.28 (m, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, SCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 5.00 (s, 2H, CH₂), 7.02 (d, 6H, Ar-H), 7.82 (d, 2H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, NH); Анал. для $C_{22}H_{25}N_3O_4S_2$: розр. N, 9.43; експ. N, 9.45.

Загальна методика синтезу *N*-арил-[5-(*N*-ациламіно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамідів 9a-b. *N*-арил-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетаміду **7** (1.5 ммоль) та хлорангідриду пропіонової кислоти (1.7 ммоль, 0.16 г) кип'ятили в діоксані (10 мл) протягом двох годин. Далі суміш охолоджували до кімнатної температури і розбавляли водою (10 мл). Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (2 рази по 5 мл) та метанолом (7 мл). Кристалізували із суміші метанол – діоксан (1 : 1).

N-(3',5'-Диметилфеніл)-[5-(*N*-пропіонаміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **9a**. Вихід 78%; Т.пл. 292°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.02 (t, 3H, CH₃), 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 2.42 (q, 2H, CH₂), 2.42 (s, 3H, SCH₃), 4.82 (s, 2H, CH₂), 6.68 (s, 1H, Ar-H), 7.12 (s, 2H, Ar-H), 7.59 (m, 3H, Ar-H), 7.88 (d, 2H, Ar-H), 10.04 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH); Анал. для $C_{23}H_{26}N_4O_4S_2$: розр. N, 11.51; експ. N, 11.52.

N-(2',4'-Диметоксифеніл)-[5-(*N*-пропіонаміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід **9b**. Вихід 62%; Т.пл. 254-56°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.09 (t, 3H, CH₃), 2.36 (q, 2H, CH₂), 2.42 (s, 3H, SCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.80 (s, 2H, CH₂), 6.45 (dd, 1H, Ar-H), 6.59 (d, 1H, Ar-H), 7.56 (s+m, 4H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H), 9.41 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH); Анал. для $C_{23}H_{26}N_4O_6S_2$: розр. N, 10.80; експ. N, 10.81.

Загальна методика синтезу N^1 -бензил-4-арилсульфоніл-5-(N,N -діацетиламіно)-3-метилтіопіразолів 10a-d. Суміш N^1 -бензил-4-арилсульфоніл-5-міно-3-метилтіопіразолу **6** (1.5 ммоль) та відповідного ангідриду карбонової кислоти (1.7 ммоль) кип'ятили в діоксані (10 мл) протягом двох годин. Далі суміш охолоджували до кімнатної температури і розбавляли водою (10 мл). Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (2 рази по 5 мл) та метанолом (7 мл). Кристалізували із суміші метанол – діоксан (1 : 1).

N^1 -(3-Хлоробензил)-5-(N,N -дипропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **10a**. Вихід 77%; Т.пл. 207-08°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 0.85 (t, 6H, 2CH₃), 2.34 (m, 4H, 2CH₂), 2.42 (s, 3H, SCH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂), 7.23 (m, 1H, Ar-H), 7.32 (s+d, 3H, Ar-H), 7.56-7.72 (m, 5H, Ar-H); Анал. для C₂₃H₂₄ClN₃O₄S₂: розр. N, 8.30; експ. N, 8.34.

N^1 -(4-Бромобензил)-5-(N,N -дипропіонаміно)-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол **10b**. Вихід 55%; Т.пл. 219-21°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 0.85 (t, 6H, CH₃), 2.35 (m, 4H, 2CH₂), 2.45 (s, 3H, SCH₃), 5.19 (s, 2H, CH₂), 7.20 (d, 2H, Ar-H), 7.51 (d, 2H, Ar-H), 7.57-7.72 (m, 5H, Ar-H); m/z : 551 [M⁺]; Анал. для C₂₃H₂₄BrN₃O₄S₂: розр. N, 7.63; експ. N, 7.66.

N^1 -(4'-Метилбензил)-5-(N,N -діацетиламіно)-4-(4''-хлорофеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **10c**. Вихід 60%; Т.пл. 266-67°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 2.09 (s, 6H, 2CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, SCH₃), 5.19 (s, 2H, CH₂), 7.15 (dd, 4H, Ar-H), 7.72 (dd, 4H, Ar-H); Анал. для C₂₁H₂₂ClN₃O₄S₂: розр. N, 8.75; експ. N, 8.73.

N^1 -(4'-Метилбензил)-5-(N,N -дипропіонаміно)-4-(4''-хлорофеніл)сульфоніл-3-метилтіопіразол **10d**. Вихід 71%; Т.пл. 234-35°C; $^1\text{H NMR}$ δ , м.ч.: 0.93 (t, 6H, 2CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, SCH₃), 2.30 (m, 4H, 2CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂), 7.08 (m, 4H, Ar-H), 7.72 (d, 4H, Ar-H); Анал. для C₂₃H₂₆ClN₃O₄S₂: розр. N, 8.27; експ. N, 8.28.

Загальна методика синтезу 5-аміно-4-арилсульфоніл-3- N -феніламінопіразолів 12a-b. До розчину натрій гідроксиду (85 ммоль, 3.4 г) у воді

(100 мл) додавали суміш відповідного арилсульфонілацетонітрилу **1** (80 ммоль) і фенілізотіоціанат (85 ммоль, 11.47 г) в діоксані (150 мл). Суміш 10 хвилин перемішували при кімнатній температурі. Далі в один прийом додавали метил йодид (85 ммоль, 5.3 г) і перемішували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш розбавляли прохолодною водою (200 мл). Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою і сумішшю пропанол-2 – вода (1 : 1). Гідразин-гідрат (66 ммоль, 3.3 мл) і кілька крапель триетиламіну додавали до отриманого відповідного *N,S*-ацеталю (60 ммоль) в пропанолі-2 (180 мл) і кип'ятили із зворотним холодильником протягом 3 годин. Після цього розчин розбавляли водою (150 мл). Осад, що утворився, відфільтровували і промивали водою і сумішшю пропанол-2 – вода (1 : 1). Далі використовували без перекристалізації.

*5-Аміно-4-фенілсульфоніл-3-*N*-феніламінопіразол **12a***. Вихід 91%; Т.пл. 196°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 6.10 (s, 2H, NH₂), 6.81 (t, 1H, NH), 7.18 (t, 2H, Ar-H), 7.71 (m, 6H, Ar-H), 7.95 (d, 2H, Ar-H), 11.30 (s, 1H, NH).

*5-Аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-*N*-феніламінопіразол **12b***. Вихід 96%; Т.пл. 206-07°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.29 (s, 3H, CH₃), 6.08 (s, 2H, NH₂), 6.75 (t, 1H, NH), 7.21 (t, 2H, Ar-H), 7.33 (d, 2H, Ar-H), 7.49 (m, 3H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 11.27 (s, 1H, NH).

*Загальна методика синтезу *N*-арил-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл]ацетамідів **13a-k***. До розчину калій карбонату (15 ммоль, 2.1 г) в 50 мл ДМФА додавали 5-аміно-4-(4-метилфеніл)сульфоніл-3-*N*-(феніламіно)піразол **12b** (5 ммоль, 1.64 г) і відповідний *N*-арилхлорацетамід (6 ммоль). Реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівали до 80°C протягом однієї години. Далі масу охолоджували до кімнатної температури і додавали 150 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, кристалізували із суміші етанол – ДМФА (1 : 1).

N-Феніл-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13a**. Вихід 61%; Т.пл. 278-80°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.65 (s, 2H, CH₂), 6.42 (s, 2H, NH₂), 6.79 (t, 1H, Ar-H), 7.02 (t, 1H, Ar-H), 7.17-7.35 (m, 5H, Ar-H), 7.25 (s, 1H, Ar-H), 7.50 (m 5H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.17 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₄H₂₃N₅O₃S: розр. N, 15.17; експ. N, 15.18.

N-(2-Флюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13b**. Вихід 78%; Т.пл. 271-72°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.69 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.80 (t, 1H, Ar-H), 7.18 (m, 4H, Ar-H), 7.34 (d, 2H, Ar-H), 7.51 (s+m, 5H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.25 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₄H₂₂FN₅O₃S: розр. N, 14.60; експ. N, 14.61.

N-(2,4-Дифлюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13c**. Вихід 82%; Т.пл. 264-66°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.78 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.80 (t, 1H, Ar-H), 6.92 (m, 1H, Ar-H), 7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.36 (m, 3H, Ar-H), 7.48 (s+d, 3H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.20 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₄H₂₁F₂N₅O₃S: розр. N, 14.08; експ. N, 14.10.

N-(2-Хлоро-4-флюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13d**. Вихід 70%; Т.пл. >300°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.40 (s, 2H, NH₂), 6.85 (m, 2H, Ar-H), 7.20-7.35 (m, 6H, Ar-H), 7.50 (s+m, 4H, NH+Ar-H), 7.90 (d, 2H, Ar-H), 10.42 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₄H₂₁FCIN₅O₃S: розр. N, 13.62; експ. N, 13.64.

N-(2-Метил-5-флюорофеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13e**. Вихід 80%; Т.пл. 291-92°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.70 (s, 2H, CH₂), 6.45 (s, 2H, NH₂), 6.83 (m, 2H, Ar-H), 7.17 (m, 3H, Ar-H), 7.34 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 4H, NH+Ar-H), 7.85 (d, 2H, Ar-H), 9.43 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₅H₂₄FN₅O₃S: розр. N, 14.19; експ. N, 14.22.

N-(4-Ізопропілфеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніл-аміно)піразол-1-іл)ацетамід **13f**. Вихід 68%; Т.пл. 218-19°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.10 (d, 6H, 2CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.76 (m, 1H, CH), 4.62 (s, 2H, CH₂), 6.42 (s, 2H, NH₂), 6.81 (t, 1H, Ar-H), 7.16 (m, 4H, Ar-H), 7.35 (d, 2H, Ar-H), 7.48 (m, 5H, NH+Ar-H), 7.89 (d, 2H, Ar-H), 10.05 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₇H₂₉N₅O₃S: розр. N, 13.91; експ. N, 13.95.

N-(2,4-Диметилфеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13g**. Вихід 88%; Т.пл. 269-70°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.11 (s, 6H, 2CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.62 (s, 2H, CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.67 (s, 1H, Ar-H), 6.83 (t, 1H, Ar-H), 7.16 (m, 4H, Ar-H), 7.34 (d, 2H, Ar-H), 7.48 (s+d, 3H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.02 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₆H₂₇N₅O₃S: розр. N, 14.30; експ. N, 14.35.

N-(3,5-Диметилфеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13h**. Вихід 81%; Т.пл. 248°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.11 (s, 6H, 2CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.67 (s, 2H, CH₂), 6.47 (s, 2H, NH₂), 6.64 (s, 1H, Ar-H), 7.03 (s, 3H, Ar-H), 7.18 (t, 2H, Ar-H), 7.34 (d, 2H, Ar-H), 7.54 (m, 3H, NH+Ar-H), 7.88 (d, 2H, Ar-H), 9.47 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₆H₂₇N₅O₃S: розр. N, 14.30; експ. N, 14.34.

N-(3-Метоксифеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніл-аміно)піразол-1-іл)ацетамід **13i**. Вихід 74%; Т.пл. 231-33°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 2.28 (s, 3H, CH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 4.65 (s, 2H, CH₂), 6.42 (s, 2H, NH₂), 6.61 (dd, 1H, Ar-H), 6.80 (t, 1H, Ar-H), 7.04 (dd, 1H, Ar-H), 7.17 (t, 3H, Ar-H), 7.30 (m, 1H, Ar-H), 7.32 (d, 2H, Ar-H), 7.48 (s+d, 3H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.20 (s, 1H, NH). Анал. для C₂₅H₂₅N₅O₄S: розр. N, 14.25; експ. N, 14.25.

N-(4-Етоксифеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13j**. Вихід 79%; Т.пл. >300°C; ¹H ЯМР, δ, м.ч.: 1.13 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃), 3.90 (q, 2H, CH₂CH₃), 4.61 (s, 2H, CH₂), 6.42 (s, 2H, NH₂), 6.81 (m, 3H, Ar-H), 7.18 (t, 2H, Ar-H), 7.35 (d, 2H, Ar-H), 7.48

(m, 5H, NH+Ar-H), 7.87 (d, 2H, Ar-H), 10.01 (s, 1H, NH). Анал. для $C_{26}H_{27}N_5O_4S$: розр. N, 13.85; експ. N, 13.88.

N-(3,4-Диметоксифеніл)-[5-аміно-4-(4'-метилфеніл)сульфоніл-3-(*N*-феніламіно)піразол-1-іл)ацетамід **13к**. Вихід 69%; Т.пл. 256-57°C; 1H ЯМР, δ , м.ч.: 2.30 (s, 3H, CH_3), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 4.60 (s, 2H, CH_2), 6.40 (s, 2H, NH_2), 6.80 (t, 1H, Ar-H), 6.87 (m, 1H, Ar-H), 6.99 (dd, 1H, Ar-H), 7.16 (t 2H, Ar-H), 7.32 (m, 3H, Ar-H), 7.49 (d, 2H, Ar-H), 7.52 (s, 1H, NH), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, NH). Анал. для $C_{26}H_{27}N_5O_3S$: розр. N, 14.30; експ. N, 14.28.

Загальна методика синтезу 2-метил/арил-6-метилтіо-7-арилсульфоніл-1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразолів 16а-с. Method A. В колбу з 4 мл ДМФА вносили відповідний 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол (0.001 моль), хлорацетон (0.0011 моль, 0.1 г) або фенацилбромід (0.0011 моль) та калій карбонат (0.004 моль, 0.55 г). Суміш перемішували при 50°C протягом 3 годин і розбавляли водою (10 мл). Маслянистий осад два-три рази промивали водою (порціями по 5 мл) і відокремлювали. Далі сирий продукт розчиняли в суміші 10 мл етанолу і 0.5 мл концентрованої хлористоводневої кислоти. Суміш кип'ятили протягом 2-4 годин і охолоджували. Осад, що утворився, відфільтровували, переносили у водний розчин натрій карбонату, ретельно перемішували. Далі осад відфільтровували і висушували.

Method B. В колбу з 15 мл пропанолу-1 вносили відповідний 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол (0.001 моль), хлорацетон (0.0011 моль, 0.1 г) або фенацилбромід (0.0011 моль). Суміш кип'ятили протягом 8-9 годин і охолоджували. Осад, що утворився, переносили у водний розчин натрій карбонату і ретельно перемішували. Далі осад відфільтровували і висушували.

2-Метил-6-метилтіо-7-фенілсульфоніл-1*H*-імідазо[1,2-*b*]піразол 16а. Вихід 26% (*Method A*), 34% (*Method B*); Т.пл. 214-16°C; 1H NMR δ , м.ч.: 2.08

(s, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, SCH₃), 7.60 (m, 3H, Ar-H), 7.90 (dd, 2H, Ar-H), 8.03 (s, 1H, CH), 12.27 (br.s, 1H, NH).

2-(4'-Хлорофеніл)-6-метилтіо-7-фенілсульфоніл-1H-імідазо[1,2-b]піразол 16b. Вихід 45% (*Method B*); Т.пл. 187-89°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 2.49 (s, 3H, SCH₃), 7.54 (m, 5H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 8.02 (m, 2H, Ar-H), 8.32 (s, 1H, CH), 12.75 (s, 1H, NH).

2-(4'-Метилфеніл)-6-метилтіо-7-(4'-метоксифеніл)сульфоніл-1H-імідазо[1,2-b]піразол 16c. Вихід 37% (*Method B*); Т.пл. 201-02°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, SCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (d, 2H, Ar-H), 7.25 (d, 2H, Ar-H), 7.72 (d, 2H, Ar-H), 7.95 (d, 2H, Ar-H), 8.19 (s, 1H, CH), 12.61 (s, 1H, NH).

N-Феніл-[(2-(4'-метилфеніл)-6-метилтіо-7-(4''-метоксифеніл)сульфоніл-1H-імідазо[1,2-b]піразол-1-іл)ацетамід 17 синтезували аналогічно **7a-m**. Вихід 27%; Т.пл. 234-35°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, SCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 6.82 (d, 2H, Ar-H), 7.06 (m, 1H, Ar-H), 7.28 (m, 6H, Ar-H), 7.43 (d, 2H, Ar-H), 7.77 (d, 2H, Ar-H), 7.95 (s, 1H, CH), 10.30 (s, 1H, NH).

1-Фенілсульфоніл-2-метилтіо-4,6,7,8-тетрагідро-5H-3,3a,8-триаза-циклопента[а]інден 18 одержували аналогічно **16a-c**, використовуючи в якості алкілюючого агента α-хлороциклогексанон. Вихід 15% (*Method A*), 31% (*Method B*); Т.пл. 261-63°C; ¹H NMR δ, м.ч.: 1.73 (br.s, 4H, 2CH₂), 2.40 (s, 3H, SCH₃), 2.56 (m, 4H, 2CH₂), 7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.92 (dd, 2H, Ar-H), 12.05 (s, 1H, NH).

5,7-Диметил-2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-a]піримідин 19. В колбу з 5 мл крижаної оцтової кислоти вносили відповідний 5-аміно-4-арилсульфоніл-3-метилтіопіразол (0.001 моль) та ацетилацетон (0.0011 моль, 0.11 г). Суміш нагрівали до кипіння протягом 2 годин, охолоджували і розбавляли водою (10 мл). Осад, що утворився, відфільтровували, перено-

сили у водний розчин натрій карбонату, ретельно перемішували. Далі осад відфільтровували і висушували. Вихід 71%; Т.пл. 273-75°C; $^1\text{H NMR } \delta$, м.ч.: 2.62 (s, 3H, CH_3), 2.66 (s, 3H, CH_3), 2.67 (s, 3H, SCH_3), 6.67 (s, 1H, Ar-H), 7.40 (m, 1H, Ar-H), 7.54 (m, 2H, Ar-H), 8.23 (m, 3H, Ar-H).

5-Метил-2-метилтіо-3-фенілсульфонілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 20. 5-Аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол (0.0015 моль) та ацетооцтовий естер (0.0017 моль) кип'ятили в 10 мл оцтової кислоти протягом 2 годин, охолоджували і залишали при кімнатній температурі на ніч. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (2 по 5 мл), метиловим спиртом (7 мл). Далі осад відфільтровували і висушували. Вихід 84%; Т.пл. 293°C; $^1\text{H NMR } \delta$, м.ч.: 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.65 (s, 3H, SCH_3), 5.89 (s, 1H, CH), 7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.56 (m, 2H, Ar-H), 8.27 (m, 3H, Ar-H), 11.93 (br.s, 1H, NH).

Загальна методика синтезу 2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфонілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-онів 21. 5-Аміно-4-фенілсульфоніл-3-феніламінопіразол (0.0015 моль) та відповідний ацетооцтовий естер (0.0017 моль) кип'ятили в 10 мл оцтової кислоти протягом 2 годин, охолоджували і залишали при кімнатній температурі на ніч. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою (2 по 5 мл), метиловим спиртом (7 мл). Далі осад відфільтровували і висушували.

5-Метил-2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфонілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 21a. Вихід 79%; Т.пл. 240-41°C; $^1\text{H NMR } \delta$, м.ч.: 2.29 (s, 3H, CH_3), 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.65 (s, 3H, SCH_3), 5.89 (s, 1H, CH), 7.21 (t, 2H, Ar-H), 7.33 (d, 2H, Ar-H), 7.49 (m, 3H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 11.73 (br.s, 1H, NH).

5-Хлорометил-2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфонілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 21b. Вихід 76%; Т.пл. 263-65°C; $^1\text{H NMR } \delta$, м.ч.: 1.87 (s, 2H, CH_2), 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.65 (s, 3H, SCH_3), 5.70 (s, 1H, CH), 7.20 (t, 2H, Ar-H), 7.33 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 3H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 11.84 (br.s, 1H, NH).

*5-Метил-6-(етиленкарбетокси)-2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфо-
нілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 21c.* Вихід 82%; Т.пл. 237-38°C; ¹H
NMR δ, м.ч.: 1.83 (s, 2H, CH₃), 2.12 (t, 2H, CH₂), 2.18 (t, 2H, CH₂), 2.34 (m, 2H,
CH₂CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.65 (s, 3H, SCH₃), 3.25 (t, 3H, CH₂CH₃), 7.28 (t,
2H, Ar-H), 7.37 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 3H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, Ar-H), 12.05
(br.s, 1H, NH).

*5-(Метиленкарбетокси)-2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфо-
нілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 21d.* Вихід 79%; Т.пл. 261-63°C; ¹H
NMR δ, м.ч.: 2.19 (s, 2H, CH₂), 2.31 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.65 (s,
3H, SCH₃), 3.25 (t, 3H, CH₂CH₃), 7.21 (t, 2H, Ar-H), 7.30 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m,
3H, Ar-H), 7.82 (d, 2H, Ar-H), 11.17 (br.s, 1H, NH).

*5-Метил-6-(етиленгідрокси)-2-феніламіно-3-(4-метилфеніл)сульфо-
нілпіразоло[1,5-а]піримідин-7(4H)-он 21e.* Вихід 73%; Т.пл. 255°C; ¹H NMR δ,
м.ч.: 1.87 (s, 2H, CH₃), 2.12 (t, 2H, CH₂), 2.19 (t, 2H, CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃),
2.62 (s, 3H, SCH₃), 7.30 (t, 2H, Ar-H), 7.42 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 3H, Ar-H),
7.89 (d, 2H, Ar-H), 12.00 (br.s, 1H, NH).

ВИСНОВКИ

У роботі наведено експериментальне вирішення наукової задачі щодо синтезу нових біологічно активних речовин на основі модифікованих похідних 3(5)-амінопіразолу, а саме досліджено способи синтезу заміщених 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолів та проаналізовано шляхи їх хімічної модифікації. Методами комп'ютерного прогнозування та біологічного скринінгу підтверджено перспективність пошуку протимікробних та протигрибкових субстанцій в досліджуваному ряду сполук.

1. За реакцією гетероциклізації арилсульфонілацетонітрилів з гідразин-гідратом синтезовано 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-алкілтіопіразоли. Методами ЯМР-спектроскопії доведено утворення продуктів N^l -заміщення в ході їх алкілування бензилхлоридами і N -ариламидами хлороцтової кислоти, та утворення моно- та діациламінопохідних – в реакціях з хлорангідридами та ангідридами кислот відповідно.

2. Розроблено стратегію введення амінної функції в положення 3 піразолу – взаємодією арилсульфонілацетонітрилів з арилізотіоціанатами з подальшою гетероциклізацією з гідразин-гідратом. Як результат алкілування 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-ариламінопіразолів виділено виключно продукти N^l -заміщення.

3. Розроблено методики гетероциклізації 4-арилсульфоніл-5-аміно-3-метилтіопіразолів та 4-арилсульфоніл-5-аміно-3- N -ариламінопіразолів з α -галогенкетонами та α,β -дикарбонільними реагентами. В реакції з хлорацетоном, фенацилбромідами та 2-хлороциклогексаноном в ізопропанолі виділено 2,6,7-тризаміщені 1 H -імідазо[1,2- b]піразоли. В реакції з ацетилацетоном, заміщеними ацетооцтовими естерами, 3-ацетилтетрагідрофуран-2-оном доведено утворення похідних піразоло[1,5- a]піримідину та піразоло[1,5- a]піримідин-4-ону.

4. Здійснено дизайн комбінаторної бібліотеки похідних 5-аміно-4-алкіл/арилсульфоніл-3-алкілтіо/3-алкіламіно/3-ариламінопіразолів та за результатами віртуального скринінгу визначено основні напрямки біологічних випробувань. Здійснено синтез фокусованої вибірки речовин для тестування на протимікробну та протигрибкову активність.

5. Базуючись на сучасних методах *in silico* досліджень сплановано та проведено мікробіологічний скринінг 46 вперше синтезованих похідних 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолів на 37 штаммах мікроорганізмів. Встановлено, що значна більшість протестованих речовин проявляють високу протимікробну та протигрибкову активність. Встановлено повільне формування стійкості музейних штамів *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 і *C.albicans* ATCC 885-653 до цих речовин. Встановлені елементи залежності «структура–активність» дозволили визначити оптимальні шляхи модифікації структури та запропонувати раціональний дизайн біологічно активних молекул на основі базового фрагмента 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолу для подальшої розробки протимікробних та протигрибкових агентів.

6. Для проведення поглиблених фармакологічних досліджень в якості протигрибкового агента рекомендовано 4-(4-хлорофеніл)сульфоніл-5-аміно-3-етилтіо-піразол; та *N*-(2'-флюоро-4'-бромфеніл)-(5-аміно-4-фенілсульфоніл-3-метилтіопіразол-1-іл)ацетамід, який показав високу активність по відношенню до грампозитивної мікрофлори. Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення субстанції 4-(4-хлорофеніл)сульфоніл-5-аміно-3-етилтіопіразолу, методику визначення супровідних домішок. Валідаційні параметри методик відповідають необхідним критеріям прийнятності.

7. Встановлені елементи залежності «структура–активність» дозволили визначити оптимальні шляхи модифікації структури та запропонувати раціональний дизайн біологічно активних молекул на основі базової структури 5-аміно-4-арилсульфонілпіразолу для подальшої розробки протимікробних та протигрибкових агентів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Anwar H. F., Elnagdi M. H., Anwar H. F. Recent developments in aminopyrazole chemistry. *ARKIVOC*. 2009. No 1. P. 198–250. DOI: 10.3998/ark.5550190.0010.107.
2. Aggarwal R., Kumar V., Kumar R., Singh S. P. Approaches towards the synthesis of 5-aminopyrazoles. *Beilstein J. Org. Chem.* 2011. Vol. 7. P. 179–197. DOI:10.3762/bjoc.7.25.
3. Marinozzi M., Marcelli G., Carotti A. N-Aryl-5-aminopyrazole: a versatile architecture in medicinal chemistry. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2015. Vol. 15, No 4. P. 272–299. DOI: 10.2174/1389557515666150312154536.
4. Elmaati T. M. A., El-Taweel F. M. New trends in the chemistry of 5-aminopyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* 2004. Vol. 41. P. 109–134. DOI: 10.1002/jhet.5570410201.
5. Ozturk T., Ertas E., Mert O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chem. Rev.* 2007. Vol. 107, No 11. P. 5210–5278. DOI: 10.1021/cr040650b.
6. Dodd D. S., Martinez R. L., Kamau M. et al. Solid-Phase Synthesis of 5-Substituted Amino Pyrazoles. *J. Comb. Chem.* 2005. Vol. 7, No 4. P. 584–588. DOI: 10.1021/cc049814s.
7. Dömling A. Recent Developments in Isocyanide Based Multicomponent Reactions in Applied Chemistry. *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106, No 1. P. 17–89. DOI: 10.1021/cr0505728.
8. Myers M. C., Napper A. D., Motlekar N. et al. Identification and characterization of 3-substituted pyrazolyl esters as alternate substrates for cathepsin B: The confounding effects of DTT and cysteine in biological assays *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007. Vol. 17, No 17. P. 4761–4766. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.06.091.
9. Pitucha M., Mazur L., Kosikowska U. et al. Synthesis, structure, and antibacterial evaluation of new N-substituted-3-amino-5-oxo-4-phenyl-2,5-

- dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioamides. *Heteroatom Chemistry*. 2010. Vol. 21, No 4. P. 215–221. DOI: 10.1002/hc.20598.
10. Majumdar P., Pati A., Patra M. et al. Acid Hydrazides, Potent Reagents for Synthesis of Oxygen-, Nitrogen-, and/or Sulfur-Containing Heterocyclic Rings. *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114, No 5. P. 2942–2977. DOI: 10.1021/cr300122t.
 11. Broxer S., Fitzgerald M. A., Sfougataki C. et al. The Development of a Robust Process for a CRF₁ Receptor Antagonist. *Org. Process Res. Dev.* 2011. Vol. 15, No 2. P. 343–352. DOI: 10.1021/op100270u.
 12. Asano T., Yamazaki H., Kasahara C. et al. Identification, Synthesis, and Biological Evaluation of 6-[(6R)-2-(4-Fluorophenyl)-6-(hydroxymethyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-2-(2-methylphenyl)pyridazin-3(2H)-one (AS1940477), a Potent p38 MAP Kinase Inhibitor. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 17. P. 7772–7785. DOI: 10.1021/jm3008008.
 13. Yoshida S., Hayashi Y., Obitsu K. et al. Development of a Practical and Scalable Synthesis of a Potent p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* 2012. Vol. 16, No 11. P. 1818–1826. DOI: 10.1021/op300237b.
 14. Leach A. G., McCoull W., Bailey A. Experimental Testing of Quantum Mechanical Predictions of Mutagenicity: Aminopyrazoles. *Chem. Res. Toxicol.* 2013. Vol. 26, No 5. P. 703–709. DOI: 10.1021/tx3005136.
 15. Milburn R. R., Thiel O. R., Achmatowicz M. Development of a Practical Synthesis of a Pyrazolopyridinone-Based p38 MAP Kinase Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* 2011., Vol. 15, No 1. P. 31–43. DOI: 10.1021/op100205s.
 16. Dolle R. E., Le Bourdonnec B., Goodman A. J. et al. Comprehensive Survey of Chemical Libraries for Drug Discovery and Chemical Biology: 2008. *J. Comb. Chem.* 2009. Vol. 11, No 5. P. 739–790. DOI: 10.1021/cc9000828.

17. Markwalder J. A., Arnone M. R., Benfield P. A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 1-Aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47, No 24. P. 5894–5911. DOI: 10.1021/jm020455u.
18. Gao Y., Lam Y. Synthesis of pyrazolo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-4(3H)-ones. *J. Comb. Chem.* 2010. Vol. 12. P. 69–74.
19. Bagley M. C., Baashen M., Paddock V. L. et al. Regiocontrolled synthesis of 3- and 5-aminopyrazoles, pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines, pyrazolo[3,4-*b*]pyridines and pyrazolo[3,4-*b*]quinolinones as MAPK inhibitors. *Tetrahedron.* 2013. Vol. 69, No 39. P. 8429–8438. DOI:10.1016/j.tet.2013.07.055.
20. Dressen D., Garofalo A. W., Hawkinson J. et al. Preparation and Optimization of a Series of 3-Carboxamido-5-phenacylaminopyrazole Bradykinin B1 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* 2007. Vol. 50, No 21. P. 5161–5167. DOI: 10.1021/jm051292n.
21. Iida T., Satoh H., Maeda K. et al. Practical Synthesis of a Neuropeptide Y Antagonist via Stereoselective Addition to a Ketene. *J. Org. Chem.* 2005. Vol.70, No 23. P. 9222–9229. DOI: 10.1021/jo0512709.
22. Yu H., Moore M. L., Erhard K. et al. [3a,4]-Dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines: Novel, Potent, and Selective Phosphatidylinositol-3-kinase β Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013. Vol. 4, No 2. P. 230–234. DOI: 10.1021/ml300330m.
23. Tsyganov D. V., Konyushkin L. D., Karmanova I. B. et al. *cis*-Restricted 3-Aminopyrazole Analogues of Combretastatins: Synthesis from Plant Polyalkoxybenzenes and Biological Evaluation in the Cytotoxicity and Phenotypic Sea Urchin Embryo Assays. *J. Nat. Prod.* 2013. Vol. 76, No 8. P. 1485–1491. DOI: 10.1021/np400310m.
24. Griffith D. A., Hargrove D. M., Maurer T. S. et al. Discovery and evaluation of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as neuropeptide Y1 receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011. No 21. P. 2641–2645.

25. Wang S.-Fu, Zhu Y.-L., Zhu P.-T. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 5-phenyl-1*H*-pyrazole derivatives as potential BRAF^{V600E} inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 22, No 21. P. 6201–6208. DOI:10.1016/j.bmc.2014.08.029.
26. Moy F. J., Lee A., Gavrin L. K. et al. Novel Synthesis and Structural Characterization of a High-Affinity Paramagnetic Kinase Probe for the Identification of Non-ATP Site Binders by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53, No 3. P. 1238–1249. DOI: 10.1021/jm901525b.
27. Gavrin L. K., Lee A., Provencher B. A. et al. Synthesis of Pyrazolo[1,5- α]pyrimidinone Regioisomers. *J. Org. Chem.* 2007. Vol. 72, No 3. P. 1043–1046. DOI: 10.1021/jo062120g.
28. Mitchell D., Cole K. P., Pollock P. M. et al. Development and a Practical Synthesis of the JAK2 Inhibitor LY2784544. *Org. Process Res. Dev.* 2012. Vol. 16, No 1. P. 70–81. DOI: 10.1021/op200229j.
29. Surmont R., Verniest G., De Kimpe N. New Synthesis of Fluorinated Pyrazoles. *Org. Lett.* 2010. Vol. 12, No 20. P. 4648–4651. DOI: 10.1021/ol1019713.
30. Zhou H.-B., Sheng S., Compton D. R. et al. Structure-Guided Optimization of Estrogen Receptor Binding Affinity and Antagonist Potency of Pyrazolopyrimidines with Basic Side Chains. *J. Med. Chem.* 2007. Vol. 50, No 2. P. 399–403. DOI: 10.1021/jm061035y.
31. Goldstein D. M., Alfredson T., Bertrand J. et al. Discovery of S-[5-Amino-1-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-[3-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]methanone (RO3201195), an Orally Bioavailable and Highly Selective Inhibitor of p38 Map Kinase. *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49, No 5. P. 1562–1575. DOI: 10.1021/jm050736c.
32. Compton D. R., Sheng S., Carlson K. E. et al. Pyrazolo[1,5- α]pyrimidines: Estrogen Receptor Ligands Possessing Estrogen Receptor β Antagonist Activity. *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47, No 24. P. 5872–5893. DOI:

- 10.1021/jm049631k.
33. Regan J., Capolino A., Cirillo P. F. et al. Structure–Activity Relationships of the p38 α MAP Kinase Inhibitor 1-(5-tert-Butyl-2-p-tolyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-[4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)naphthalen-1-yl]urea (BIRB 796). *J. Med. Chem.* 2003. Vol. 46, No 22. P. 4676–4686. DOI: 10.1021/jm030121k.
34. Ji N., Meredith E., Liu D. et al. Syntheses of 1-substituted-3-aminopyrazoles. *Tetrahedron Letters*. 2010. Vol. 51, No 52. P. 6799–6801. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.10.073.
35. Traxler P., Bold, G. Frei J. et al. Use of a Pharmacophore Model for the Design of EGF-R Tyrosine Kinase Inhibitors: 4-(Phenylamino)pyrazolo-[3,4-d]pyrimidines. *J. Med. Chem.* 1997, Vol. 40, No 22. P. 3601–3616. DOI: 10.1021/jm970124v.
36. Mukaiyama H., Nishimura T., Kobayashi S. Discovery of Novel 2-Anilino-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as c-Src Kinase Inhibitors for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2007. Vol. 55, No 6. P. 881–889. DOI: 10.1248/cpb.55.881.
37. Borisov A. V., Detistov O. S., Pukhovaya V. I. et al. Parallel Liquid-Phase Synthesis of 5-(1H-4-Pyrazolyl)-[1,2,4]oxadiazole Libraries. *J. Comb. Chem.* 2009. Vol. 11, No 6. P. 1023–1029. DOI: 10.1021/cc900070m.
38. Surmont R., Verniest G., De Schrijver M. et al. Synthesis of 3-Amino-4-fluoropyrazoles. *J. Org. Chem.* 2011. Vol. 76, No 10. P. 4105–4111. DOI: 10.1021/jo2000989.
39. Wang T., Lamb M. L., Scott D. A. et al. Identification of 4-Aminopyrazolylpyrimidines as Potent Inhibitors of Trk Kinases. *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, No 15. P. 4672–4684. DOI: 10.1021/jm800343j.
40. Peruncheralathan S., Yadav A. K., Ila H., Junjappa H. Highly Regioselective Synthesis of 1-Aryl-3 (or 5)-alkyl/aryl-5 (or 3)-(N-cycloamino)pyrazoles. *J. Org. Chem.* 2005. Vol. 70, No 23. P. 9644–9647. DOI: 10.1021/jo051478u.

41. Kumar S., Ila H., Junjappa H. Efficient Routes to Pyrazolo[3,4-b]indoles and Pyrazolo[1,5-a]benzimidazoles via Palladium- and Copper-Catalyzed Intramolecular C–C and C–N Bond Formation. *J. Org. Chem.* 2009. Vol. 74, No 18. P. 7046–7051. DOI: 10.1021/jo901309t.
42. Kryštof V., Cankař P., Fryšová I. et al. 4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK Inhibitors: SAR Study, Crystal Structure in Complex with CDK2, Selectivity, and Cellular Effects. *J. Med. Chem.* 2006, Vol. 49, No 22. P. 6500–6509. DOI: 10.1021/jm0605740.
43. Fustero S., Sánchez-Roselló M., Barrio P., Simón-Fuentes A. From 2000 to Mid-2010: A Fruitful Decade for the Synthesis of Pyrazoles. *Chem. Rev.* 2011. Vol. 111, No 11. P. 6984–7034. DOI: 10.1021/cr2000459.
44. Thaher B. A., Arnsmann M., Totzke F. Tri- and Tetrasubstituted Pyrazole Derivates: Regioisomerism Switches Activity from p38MAP Kinase to Important Cancer Kinases. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 2. P. 961–965. DOI: 10.1021/jm201391u.
45. Wen L. R., Jin X.-J., Niu X.-D., Li M. Copper-Catalyzed Tandem Reactions for Synthesis of Pyrazolo[5,1-a]isoquinolines with Heterocyclic Ketene Aminals as Ligands. *J. Org. Chem.* 2015. Vol. 80, No 1. P. 90–98. DOI: 10.1021/jo5020323.
46. Pinna G., Loriga G., Lazzari P. et al. Tricyclic pyrazoles. Part 6. Benzo-furo[3,2-c]pyrazole: A versatile architecture for CB₂ selective ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 82. P. 281–292. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.055.
47. Anary-Abbasinejad M., Shamsb N., Heidari M. One-pot synthesis of highly functionalised 1H-pyrazoles from arylcarbohydrazides, cyclohexyl isocyanide, and acetylene diesters. *ARKIVOC.* 2012. Vol. Ix. P. 13–20.
48. Adib M., Mohammadi B., Bijanzadeh H. R. A Novel One-Pot, Three-Component Synthesis of Dialkyl 5-(Alkylamino)-1-aryl-1H-pyrazole-3,4-dicarboxylates. *Synlett.* 2008. No 20. P. 3180–3182. DOI: 10.1055/s-0028-

- 1087365.
49. Su M., Hoshiya N., Buchwald S. L. Palladium-Catalyzed Amination of Unprotected Five-Membered Heterocyclic Bromides. *Org. Lett.* 2014. Vol. 16, No 3. P. 832–835. DOI: 10.1021/ol4035947.
 50. Шихалиев Н. Г., Гейдарова С. Дж., Гурбанова Н. В., Музалевский В. М. Синтез 5,5'-(1,4-фенилен)бис(1H-пиразол-3-амина) на основе реакции каталитического олефинирования. *Вестник Бакинского университета.* 2013. № 1. С. 9–14.
 51. Ioannidis S., Lamb M. L., Wang T. et al. Discovery of 5-Chloro-N²-[(1S)-1-(5-fluоропуридин-2-yl)ethyl]-N⁴-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidine-2,4-diamine (AZD1480) as a Novel Inhibitor of the Jak/Stat Pathway. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No 1. P. 262–276. DOI: 10.1021/jm1011319.
 52. Butters M., Catterick D., Craig A. et al. Critical Assessment of Pharmaceutical Processes – A Rationale for Changing the Synthetic Route. *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106, No 7. P. 3002–3027. DOI: 10.1021/cr050982w.
 53. Dalinger I. L., Vatsadse I. A., Shevelev S. A., Ivachtchenko A.V. Liquid-Phase Synthesis of Combinatorial Libraries Based on 7-Trifluoromethyl-Substituted Pyrazolo[1,5-a]Pyrimidine Scaffold. *J. Comb. Chem.* 2005. Vol. 7, No 2. P. 236–245. DOI: 10.1021/cc049855o.
 54. Gross R. S., Guo Z., Dyck B. Design and Synthesis of Tricyclic Corticotropin-Releasing Factor-1 Antagonists. *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48, No 18. P. 5780–5793. DOI: 10.1021/jm049085v.
 55. Dunn P. J. Synthesis of Commercial Phosphodiesterase(V) Inhibitors. *Org. Process Res. Dev.* 2005. Vol. 9, No 1. P. 88–97. DOI: 10.1021/op040019c.
 56. Rzepecki P., Schrader T. β -Sheet Ligands in Action: KLVFF Recognition by Aminopyrazole Hybrid Receptors in Water. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, No 9. P. 3016–3025. DOI: 10.1021/ja045558b.
 57. Rzepecki P., Gallmeier H., Geib N. et al. New Heterocyclic β -Sheet Ligands with Peptidic Recognition Elements. *J. Org. Chem.* 2004. Vol. 69, No 16. P.

- 5168–5178. DOI: 10.1021/jo0496603.
58. Li F., Nie J., Sun L. et al. Silver-Mediated Cycloaddition of Alkynes with CF_3CHN_2 : Highly Regioselective Synthesis of 3-Trifluoromethylpyrazoles. *Angewandte Chemie*. Volume 2013. Vol. 52, No 24. P. 6255–6258. DOI: 10.1002/anie.201301870.
59. Pérez-Aguilar M. C., Valdés C. Regioselective One-Step Synthesis of Pyrazoles from Alkynes and N-Tosylhydrazones: [3+2]-Dipolar Cycloaddition[1,5] Sigmatropic Rearrangement Cascade. *Angewandte Chemie*. Vol. 52, No 28. P. 7219–7223. DOI: 10.1002/anie.201301284.
60. Cheng H., Lundy DeMello K. M, Li J. et al. Synthesis and SAR of heteroaryl-phenyl-substituted pyrazole derivatives as highly selective and potent canine COX-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006. Vol. 16, No 8. P. 2076–2080.
61. Selvam T. P., Kumar P. V., Saravanan G., Prakash C. R. Microwave-assisted synthesis, characterization and biological activity of novel pyrazole derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* 2014. Vol. 18, No 6. P. 1015–1021. DOI:10.1016/j.jscs.2011.12.006.
62. Tewari A. K., Singh V.P., Yadav P. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorganic Chemistry*. 2014. Vol. 56. P. 8–15. DOI: 10.1016/j.bioorg.2014.05.004.
63. Smurnyy Y, Toms A. V. , Hickson G. R. et al. Binucleine 2, an isoform-specific inhibitor of Drosophila Aurora B kinase, provides insights into the mechanism of cytokinesis. *ACS Chem. Biol.* 2010. Vol. 5, No 11. P. 1015–1020. DOI: 10.1021/cb1001685.
64. Cervello M., Bachvarov D., Lampiasi N. Et al. Novel combination of sorafenib and celecoxib provides synergistic anti-proliferative and proapoptotic effects in human liver cancer cells. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, No 6. P. e65569. doi: 10.1371/journal.pone.0065569.

65. Prasath R., Bhavana P., Sarveswari S. et al. Efficient ultrasound-assisted synthesis, spectroscopic, crystallographic and biological investigations of pyrazole-appended quinolinyl chalcones. *J. Mol. Structure*. 2015. Vol. 1081, No 5. P. 201–210. DOI:10.1016/j.molstruc.2014.10.026.
66. Shao N., Chen T., Zhang T. et al. Cascade regioselective synthesis of pyrazoles from nitroallylic acetates and *N*-tosyl hydrazine. *Tetrahedron*. 2014. Vol. 70, No 4. P. 795–799. DOI:10.1016/j.tet.2013.12.046.
67. Cui J. J., McTigue M., Nambu M. et al. Discovery of a Novel Class of Exquisitely Selective Mesenchymal-Epithelial Transition Factor (c-MET) Protein Kinase Inhibitors and Identification of the Clinical Candidate 2-(4-(1-(Quinolin-6-ylmethyl)-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyrazin-6-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)ethanol (PF-04217903) for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 18. P. 8091–8109. DOI: 10.1021/jm300967g.
68. Lawrence H. R., Martin M. P., Luo Y. Development of *o*-Chlorophenyl Substituted Pyrimidines as Exceptionally Potent Aurora Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 17. P. 7392–7416. DOI: 10.1021/jm300334d.
69. Vizirianakis I. S., Chatzopoulou M., Bonovolias I. D. Et al. Toward the Development of Innovative Bifunctional Agents To Induce Differentiation and To Promote Apoptosis in Leukemia: Clinical Candidates and Perspectives. *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53, No 19. P. 6779–6810. DOI: 10.1021/jm100189a.
70. Musumeci F., Radi M., Brullo C., Schenone S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 24. P. 10797–10822. DOI: 10.1021/jm301085w.
71. Hanan E. J., van Abbema A., Barrett K. et al. Discovery of Potent and Selective Pyrazolopyrimidine Janus Kinase 2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 22. P. 10090–10107. DOI: 10.1021/jm3012239.
72. Donohue S. R., Halldin C., Pike V.W. A facile and regioselective synthesis

- of rimonabant through an enamine-directed 1,3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Letters*. 2008. Vol. 49, No 17. P. 2789–2791. DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.02.132.
73. Dömling A., Wang W., Kan Wang K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. *Chem. Rev.* 2012. Vol. 112, No 6. P. 3083–3135. DOI: 10.1021/cr100233r.
74. Genin M. J., Biles C., Keiser B. J. et al. Novel 1,5-Diphenylpyrazole Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors with Enhanced Activity versus the Delavirdine-Resistant P236L Mutant: Lead Identification and SAR of 3- and 4-Substituted Derivatives. *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43, No 5. P. 1034–1040. DOI: 10.1021/jm990383f.
75. Yoon J.J., Krumm S. A., Ndungu J. M. Et al. Target analysis of the experimental measles therapeutic AS-136A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. Vol. 53, No 9. P. 3860–3870. DOI: 10.1128/AAC.00503-09.
76. Yoshida S., Hayashi Y., Obitsu K. et al. Development of a Practical and Scalable Synthesis of a Potent p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* 2012. Vol. 16, No 11. P. 1818–1826. DOI: 10.1021/op300237b.
77. Palaska E., Aydin F., Uçar G., Erol D. Synthesis and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities of 1-Thiocarbamoyl-3,5- diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole Derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2008. Vol. 341. P. 209–215. DOI: 10.1002/ardp.200700159.
78. Pinto D. J., Orwat M. J., Quan M. L. et al. 1-[3-Aminobenzisoxazol-5'-yl]-3-trifluoromethyl-6-[2'-(3-(*R*)-hydroxy-*N*-pyrrolidiny)methyl-[1,1']-biphen-4-yl]-1,4,5,6-tetrahydropyrazolo-[3,4-*c*]-pyridin-7-one (BMS-740808) a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006. Vol. 16, No 15. P. 4141–4147.
79. Wong P. C., Crain Earl. J., Watson C. A. et al. Razaxaban, a direct factor

- Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits. *J. Thrombosis and Thrombolysis*. 2007. Vol. 24, No 1. P. 43–51.
80. Mert S., Kasımoğulları R., İça T. et al. Synthesis, structure–activity relationships, and in vitro antibacterial and antifungal activity evaluations of novel pyrazole carboxylic and dicarboxylic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 78, No 6. P. 86–96. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.033.
81. Estrada A. A., Chan B. K., Baker-Glenn C et al. Discovery of Highly Potent, Selective, and Brain-Penetrant Aminopyrazole Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Small Molecule Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2014/ Vol. 57, No 3. P. 921–936. DOI: 10.1021/jm401654j.
82. Chan B. K., Estrada A. A., Chen H. et al. Discovery of a Highly Selective, Brain-Penetrant Aminopyrazole LRRK2 Inhibitor. *Med. Chem. Lett.*, 2013. Vol. 4, No 1. P. 85–90. DOI: 10.1021/ml3003007.
83. Han Y. T., Kim K., Choi G. et al. Pyrazole-5-carboxamides, novel inhibitors of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 79, No 22. P. 128–142. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.072.
84. Zanaletti R., Bettinetti L., Castaldo C. et al. *N*-[5-(5-Fluoropyridin-3-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl]-4-piperidin-1-ylbutyramide (SEN78702, WYE-308775): A Medicinal Chemistry Effort toward an $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Preclinical Candidate. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 22. P. 10277–10281. DOI: 10.1021/jm3013568.
85. Hochdörffer K., März-Berberich Y., Nagel-Steger L. et al. Rational Design of β -Sheet Ligands Against $A\beta_{42}$ -Induced Toxicity *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, No 12. P. 4348–4358. DOI: 10.1021/ja107675n.
86. Myers M., Napper A. D., Motlekar N. et al. Identification and characterization of 3-substituted pyrazolyl esters as alternate substrates for cathepsin B: The confounding effects of DTT and cysteine in biological assays. *Bioorg.*

- Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17, No 17. P. 4761–4766. DOI:10.1016/j.bmcl.2007.06.091.
87. Iida T., Satoh H., Maeda K. et al. Practical Synthesis of a Neuropeptide Y Antagonist via Stereoselective Addition to a Ketene. *J. Org. Chem.* 2005. Vol. 70, No 23. P. 9222–9229. DOI: 10.1021/jo0512709.
88. Raffa D., Maggio B., Raimondi M. V. et al. Recent advanced in bioactive systems containing pyrazole fused with a five membered heterocycle. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 97, No 5. P. 732–746. DOI:10.1016/j.ejmech.2014.12.023.
89. Peyssonnaud C., Eychène A., Rap R., Ksr B. at al. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell.* 2001. Vol. 93. P. 53–62. DOI: 10.1016/S0248-4900(01)01125-X.
90. Bruno O., Brullo C., Bondavalli F. at al. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Pyrazolyl-*N*^c-alkyl/benzyl/phenylureas: a New Class of Potent Inhibitors of Interleukin 8-Induced Neutrophil Chemotaxis. *J. Med. Chem.* 2007. Vol. 50, No 15. P. 3618–3626. DOI: 10.1021/jm0704402.
91. Kamal A., Shaik A. B., Jain N. at al. Design and synthesis of pyrazole–oxindole conjugates targeting tubulin polymerization as new anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 92. P. 501–513. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.10.077.
92. Lessel U., Wellenzohn B., Fischer J. R. Rarey M. Design of Combinatorial Libraries for the Exploration of Virtual Hits from Fragment Space Searches with LoFT. *J. Chem. Inf. Model.* 2012. Vol. 52, No 2. P. 373–379. DOI: 10.1021/ci2003957.
93. Beno B.R., Langley D. R. MORPH: A New Tool for Ligand Design. *J. Chem. Inf. Model.* 2010. Vol. 50, No 6. P. 1159–1164. DOI: 10.1021/ci9004964.
94. Zhao M.-Y., Yin Y., Yu X.-W. et al. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR study of novel 4,5-dihydro-1*H*-pyrazole thiazole derivatives as

- BRAF^{V600E} inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 23, No 1. P. 46–54. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.11.029.
95. Wang S.-Fu, Zhu Y.-L., Zhu P.-T. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 5-phenyl-1*H*-pyrazole derivatives as potential BRAF^{V600E} inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2014. Vol. 22, No 21. P. 6201–6208. DOI:10.1016/j.bmc.2014.08.029.
96. Shi J. Bo, Tang W. J., Baoqi X. et al. Novel pyrazole-5-carboxamide and pyrazole–pyrimidine derivatives: Synthesis and anticancer. *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 90. P. 889–896. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.013.
97. Bamborough P., Drewry D., Harper G. et al. Assessment of Chemical Coverage of Kinome Space and Its Implications for Kinase Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, No 24. P. 7898–7914. DOI: 10.1021/jm8011036.
98. Pollard J. R., Mortimore M. Discovery and Development of Aurora Kinase Inhibitors as Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, No 9. P. 2629–2651. DOI: 10.1021/jm8012129.
99. Prime M. E., Courtney S. M., Brookfield F. A. et al. Phthalazinone Pyrazoles as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitors of Aurora-A Kinase. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No 1. P. 312–319. DOI: 10.1021/jm101346r.
100. Liu G., Abraham S., Tran L. et al. Discovery of Highly Potent and Selective Pan-Aurora Kinase Inhibitors with Enhanced in Vivo Antitumor Therapeutic Index. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 7. P. 3250–3260. DOI: 10.1021/jm201702g.
101. Mitchell D., Cole K.P., Pollock P.M. et al. Development and a Practical Synthesis of the JAK2 Inhibitor LY2784544. *Org. Process Res. Dev.* 2012. Vol. 16, No 1. P. 70–81. DOI: 10.1021/op200229j.
102. Thaher B. A., Arnsmann M., Totzke F. Tri- and Tetrasubstituted Pyrazole Derivates: Regioisomerism Switches Activity from p38MAP

- Kinase to Important Cancer Kinases. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 2. P. 961–965. DOI: 10.1021/jm201391u.
103. Yoshida S., Hayashi Y., Obitsu K. et al. Development of a Practical and Scalable Synthesis of a Potent p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* 2012. Vol. 16, No 11. P. 1818–1826. DOI: 10.1021/op300237b.
104. Rao V. K., Tiwari R., Chhikara B. S. et al. Copper triflate-mediated synthesis of 1,3,5-triarylpyrazoles in [bmim][PF₆] ionic liquid and evaluation of their anticancer activities. *RSC Adv.* 2013. Vol. 3, No 35. P. 15396–15403. DOI: 10.1039/C3RA41830H.
105. T. Wang, M. L. Lamb, D. A. Scott et al. Identification of 4-Aminopyrazolylpyrimidines as Potent Inhibitors of Trk Kinases. *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, No 15. P. 4672–4684. DOI: 10.1021/jm800343j.
106. Kwarcinski F. E., Fox C. C., Steffey M. E., Soellner M. B. Irreversible Inhibitors of c-Src Kinase That Target a Nonconserved Cysteine. *ACS Chem. Biol.* 2012. Vol. 7, No 11. P. 1910–1917. DOI: 10.1021/cb300337u.
107. Neelarapu R., Holzle D. L., Velaparthi S. Design, Synthesis, Docking, and Biological Evaluation of Novel Diazide-Containing Isoxazole- and Pyrazole-Based Histone Deacetylase Probes. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No 13. P. 4350–4364. DOI: 10.1021/jm2001025.
108. Statsuk A. V., Maly D. J., Seeliger M. A. Tuning a Three-Component Reaction For Trapping Kinase Substrate Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, No 51. P. 17568–17574. DOI: 10.1021/ja807066f.
109. Simard J. R., Getlik M., Grütter C. et al. Fluorophore Labeling of the Glycine-Rich Loop as a Method of Identifying Inhibitors That Bind to Active and Inactive Kinase Conformations. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010. Vol. 132, No 12. P. 4152–4160. DOI: 10.1021/ja908083e.
110. Díaz J. L., Cuberes R., Berrocal J. et al. Synthesis and Biological

- Evaluation of the 1-Arylpyrazole Class of σ_1 Receptor Antagonists: Identification of 4-{2-[5-Methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]-ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 19. P. 8211–8224. DOI: 10.1021/jm3007323.
111. Zhang H. Zhu P., Liu J. et al. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of pyrazole-fused 23-hydroxybetulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25, No 3. P. 728–732. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.11.058.
112. Stocchi E., Fornari F., Minguzzi M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazole derivatives as potential multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* 2012. Vol., No 2. P. 391–401. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.12.031.
113. Brand S., Cleghorn L. A. T., McElroy S. P. Discovery of a Novel Class of Orally Active Trypanocidal *N*-Myristoyltransferase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No 1. P. 140–152. DOI: 10.1021/jm201091t.
114. Balbi A., Anzaldi M., Macciò C. et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazole derivatives with anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2011. Vol. 46, No 11. P. 5293–5309. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.014.
115. Abdel-Wahab B. F., Khidre R. E., Farahat A. A. Pyrazole-3(4)-carbaldehyde: synthesis, reactions and biological activity. *ARKIVOC.* 2011. Vol. (i). P. 196–245.
116. Wang D.-J., Fan L., Zheng C.-Y., Fang Z.-D. Synthesis and antimicrobial activity of some new fluorinated 1*H*-pyrazoles. *J. Fluorine Chem.* 2010. Vol. 131, No 5. P. 584–586. DOI: 10.1016/j.jfluchem.2010.01.005.
117. Elmaaty T. A., Ma J., El-Taweel F. et al. Facile Bifunctional Dyeing of Polyester under Supercritical Carbon Dioxide Medium with New Antibacterial Hydrazono Propanenitrile Dyes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014. Vol. 53, No 40. P. 15566–15570. DOI: 10.1021/ie502088r.

118. Basha Sh. Sh., Reddy P. R., Padmaja A. et al. Synthesis and antimicrobial activity of 3-aryloxy-4-heteroaryl pyrroles and pyrazoles. *Med. Chem. Res.* 2015. Vol. 24, No 3. P. 954–964. DOI: 10.1007/s00044-014-1169-8.
119. Elmaaty T. A., Ma J., El-Taweel F. et al. Facile Bifunctional Dyeing of Polyester under Supercritical Carbon Dioxide Medium with New Antibacterial Hydrazono Propanenitrile Dyes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014. Vol. 53, No 40. P. 15566–15570. DOI: 10.1021/ie502088r.
120. Velaparthy S., Brunsteiner M., Uddin R. et al. 5-*tert*-Butyl-*N*-pyrazol-4-yl-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]isoxazole-3-carboxamide Derivatives as Novel Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Synthetase: Initiating a Quest for New Antitubercular Drugs. *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, No 7. P. 1999–2002. DOI: 10.1021/jm701372r.
121. Fernández-Villa D., Aguilar M. R., Rojo L. Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, No 20. P. 4996. DOI: 10.3390/ijms20204996.
122. Kompis I.M., Islam K., Then R. L. DNA and RNA Synthesis: Antifolates. *Chem. Rev.* 2005. No 105. P. 593–620. DOI: 10.1021/cr0301144
123. Steven M. 18 - Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria (Opal Aurora Pop-Vicas). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. 2015. Vol. 1. P. 235–251. doi: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7.
124. Wiener J. J.M., Gomez L., Venkatesan H. Tetrahydroindazole inhibitors of bacterial type II topoisomerases. Part 2: SAR development and potency against multidrug-resistant strains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. P. 2718–2722.
125. Gomez L., Hack M. D., Wu J. et al. Novel pyrazole derivatives as potent inhibitors of type II topoisomerases. Part 1: Synthesis and preliminary SAR analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. P.

- 2723–2727.
126. Han C., Guo Y.-C., Wang D.-D. et al. Novel pyrazole fused heterocyclic ligands: Synthesis, characterization, DNA binding/cleavage activity and anti-BVDV activity. *Chinese Chem. Letters*. 2015. Vol. 26, No 5. P. 534–538. DOI :10.1016/j.ccllet.2015.01.006.
 127. Khan S. A., Ahmad B. Alam T. Synthesis and antihepatotoxic activity of some new chalcones containing 1, 4 - dioxane ring system. *Pak J Pharm Sci*. 2006. Vol. 19, No 4. P. 290–294.
 128. Zhang Z., Ojo K. K., Vidadala R et al. Potent and Selective Inhibitors of CDPK1 from *T. gondii* and *C. parvum* Based on a 5-Aminopyrazole-4-carboxamide Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 5, No 1. P. 40–44. DOI: 10.1021/ml400315s.
 129. Sánchez-Moreno M., Sanz A. M., Gómez-Contreras F. Et al. *In Vivo* Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[g]-phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No 4. P. 970–979. DOI: 10.1021/jm101198k.
 130. Palaska E., Aydin F., Uçar G., Erol D. Synthesis and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities of 1-thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole Derivatives. *ArchPharm.* 2008. Vol. 341, No 4. P. 209–215. DOI: 10.1002/ardp.200700159.
 131. Hamberg M., Samuelsson B., Detection and Isolation of an Endoperoxide Intermediate in Prostaglandin Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973. Vol. 70. P. 899–903.
 132. Hwang S. H., Wagner K. M., Morisseau C. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of Urea-Containing Pyrazoles as Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No 8. P. 3037–3050. DOI: 10.1021/jm2001376.
 133. Burch J. D., Lau K., Barker J. J. Et al. Property- and Structure-Guided

- Discovery of a Tetrahydroindazole Series of Interleukin-2 Inducible T-Cell Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 57, No 13. P. 5714–5727. DOI: 10.1021/jm500550e.
134. Baraldi P. G., Tabrizi M. A., Gessi S., Borea P. A. Adenosine Receptor Antagonists: Translating Medicinal Chemistry and Pharmacology into Clinical Utility. *Chem. Rev.* 2008. Vol. 108, No 1. P. 238–263. DOI: 10.1021/cr0682195.
135. Dressen D., Garofalo A. W., Hawkinson J. et al. Preparation and Optimization of a Series of 3-Carboxamido-5-phenacylamino-pyrazole Bradykinin B1 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* 2007. Vol. 50, No 21. P. 5161–5167. DOI: 10.1021/jm051292n.
136. <http://www.way2drug.com/> (Date of access: 22.01.21).
137. <https://www.rcsb.org/> (Date of access: 18.09.18).
138. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Date of access: 15.08.18).
139. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. М.: «Мир». 1983. 263 с.
140. ДФУ. X. 2001; ДФУ. Дополнения 1. X., 2004; ДФУ. Дополнения 2. X., 2008; ДФУ. Дополнения 3. X., 2010; ГФУ.
141. Иващенко А. В., Головина Е. С., Кадиева М. Г. и др. Антагонисты 5-НТ₆-рецепторов. I. Скрининг выборки структурно-разнородных гетероциклических соединений, содержащих сульфонильный фрагмент. *Химико-фармац. Журнал.* 2012. Т. 46, № 5. С. 14–24.
142. Parasuraman S. Prediction of activity spectra for substances. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011. Vol. 2, No 1. P. 52–53. DOI: 10.4103/0976-500X.77119.
143. Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V. PASS: Prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics.* 2000. Vol. 16. P. 747–748. DOI:

- 10.1093/bioinformatics/16.8.747.
144. Rudik A.V., Dmitriev A.V., Lagunin A. et al. PASS-based prediction of metabolites detection in biological systems. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2019. Vol. 30. P. 1–8. DOI:10.1080/1062936X.2019.1665099.
145. Poroikov V., Glorizova T., Lagunin A. et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: the possibilities and limitations. *Russian Chemical Bulletin*. 2019. Vol. 68. P. 2143–2154. DOI: 10.1007/s11172-019-2683-0.
146. <https://www.science.gov/topicpages/i/indolenyl+sulfonamide+derivatives> (Date of access: 05.03.19).
147. Yun Mi-K., Wu Y., Li Z. et al. Catalysis and Sulfa Drug Resistance in Dihydropteroate Synthase. *Science*. 2012. Vol. 335, No 6072. P. 1110–1114. DOI: 10.1126/science.1214641.
148. Ansari A., Ali A., Asifa M., Shamsuzzaman. Review: biologically active pyrazole derivatives. *New J. Chem*. 2017. Vol. 41, No 1. P. 16–41. DOI: 10.1039/C6NJ03181A.
149. Patil A., Jadhav R., Raundal H. et al. Synthesis and antifungal activities of diaryl pyrazoles carboxamide derivatives. *J. Chem. Pharm. Res*. 2014. Vol. 6, No 8. P. 218–223.
150. Li Y.–R., Li Ch., Liu J.–Ch. et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3–diaryl pyrazole derivatives as potential antibacterial and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2015. Vol. 25, No 22. P. 5052–5057. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.10.028.
151. Bekhit A. A., Ashour H. M. A., Abdel Ghany Y. S. et al. Synthesis and biological evaluation of some thiazolyl and thiadiazolyl derivatives of 1H-pyrazole as anti-inflammatory antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem*. 2008. Vol. 43, No 3. P. 456–463. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.03.030.
152. Weston C. E., Krämer A., Colin F. et al. Toward Photopharma-

- cological Antimicrobial Chemotherapy Using Photoswitchable Amido-hydrolase Inhibitors. *ACS Infect. Dis.* 2017. Vol. 3, No 2. P. 152–161. DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00148.
153. Li T., Willett R., Williams J. et al. N-(1-Benzyl-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)benzamides : Antiproliferative Activity and Effects on mTORC1 and Autophagy. *ACS Med. Chem. Lett.* 2017. Vol. 8, No 1. P. 90–95. DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00392.
154. Khalafy J., Marjani A. P., Salami F. A novel synthesis of new 2-aryl-6-(arylamino)-1H-imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carbonitrile derivatives. *Tetrahedron Letters.* 2014. Vol. 55, No 49. P. 6671–6674. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.10.061.
155. Regan A. C. Bicyclic 5-6 systems with one bridgehead Nitrogen atom: two extra heteroatoms 1:1. Ed. 11.12. Elsevier: Oxford. 2008. Vol. 11.
156. Anwar H.F, Elnagdi M. H. Recent development in aminopyrazole chemistry. *ARKIVOC.* 2009. P. 198–250.
157. Al-Sehemi A. G., Irfan A., Fouda A. M. Synthesis, characterization and density functional theory investigations of the electronic, photophysical and charge transfer properties of donor–bridge–acceptor triaminopyrazolo[1,5-a]pyrimidine dyes. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. Vol. 111. P. 223–229.
158. Zeng L.-Y., Cai C. Iodine Catalyzed One-Pot Multicomponent Synthesis of a Library of Compounds Containing Tetrazolo[1,5-a]pyrimidine Core. *J. Comb. Chem.* 2009. Vol. 12. P. 35–40.
159. Elnagdi M. H., Erian A. W. Synthesis of Substituted Azaindenes: Synthesis of New Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 990. Vol. 63. P. 1854–1856.
160. Wang H.-Q., Ding M., Liu Z. Synthesis and Properties of Novel Pyrazolopyrimidine Derivatives Containing Sulfur Atom. *Heteroatom Chemistry.* 2004. Vol. 15, No 4. P. 333–337.

161. Lipson V. V., Desenko S. M., Borodina V. V., Shirobokova M. G. Synthesis and tautomerism of 5,7-diaryl-3-cyano-and 5,7-diaryl-3-ethoxycarbonyl-4,7(6,7)-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2007. Vol 43. P. 1544–1550.
162. Kaswan P., Pericherla K., Purohit D., Kumar A. Synthesis of 5, 7-diarylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines via KOH mediated tandem reaction of 1H-pyrazol-3-amines and chalcones. *Tetrahedron Letters.* 2015. Vol. 56. P. 549–553.
163. Ivachtchenko A. V., Golovina E. S., Kadieva M. G. et al. 2-Substituted 5,6-dimethyl-3-phenylsulfonyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines: New series of highly potent and specific serotonin 5-HT₆ receptor antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* 2011. Vol. 46. P. 1189–1197.
164. Borisov A. V., Detistov O. S., Pukhovaya V. I. et al. Parallel liquid-phase synthesis of 5-(1H-4-pyrazolyl)-[1,2,4]oxadiazole libraries. *J. Comb. Chem.* 2009. Vol. 11. P. 1023–1029.
165. <https://www.who.int/csr/disease/ru/> (Date of access: 02.05.20).
166. https://www.nbt.nhs.uk/sites/default/files/attachments/Antibiotic%20Guidelines%20%282020%29_0.pdf (Date of access: 08.05.20).
167. <https://www.nice.org.uk> (Date of access: 08.05.20).
168. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Date of access: 12.07.20).
169. Mohr K.I. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016. Vol. 398. P. 237-272. DOI: 10.1007/82_2016_499.
170. Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.* 2003. Vol. 1, No 1. P. 65-70. DOI: 10.1038/nrmicro727.
171. <https://ncdc.gov.in/WriteReadData/1892s/File622.pdf> (Date of access: 21.05.20).
172. https://www.vitalitenb.ca/sites/default/files/documents/medecins/anti_microbial_treatment_guidelines_for_common_infections_-_jun2016.pdf (Date of access: 14.10.20).

173. Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 3D-QSAR in drug design--a review. *Curr. Top Med Chem.* 2010. Vol. 10, No 1. P 95–115. DOI: 10.2174/156802610790232260.
174. Duda-Seiman C., Duda-Seiman D., Ciubotariu D., Putz M.V. QSAR by Minimal Topological Difference[s]: Post-Modern Perspectives. *Curr Med Chem.* 2020. Vol. 27, No 1. P. 42-53. DOI: 10.2174/0929867326666190704124857.
175. Gini G. QSAR: What Else? *Methods Mol Biol.* 2018. Vol. 1800. P. 79-105. DOI: 10.1007/978-1-4939-7899-1_3.
176. Lozano C., Torres C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017. Vol. 35. Suppl 1. P. 2-8. DOI: 10.1016/S0213-005X(17)30028-9.
177. Nolte O. Antimicrobial resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. *Protein Pept Lett.* 2014. Vol. 21, No 4. P. 330–3355. DOI: 10.2174/09298665113206660106.
178. Pontes D.S., de Araujo R.S.A., Dantas N et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Curr Top Med Chem.* 2018. Vol 18, No 1. P. 42-74. DOI: 10.2174/1568026618666180206095224.
179. Roth N., Käsbohrer A., Mayrhofer S. et al. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult Sci.* 2019. Vol. 98, No 4. P. 1791-1804. DOI: 10.3382/ps/pey539.
180. Reygaert W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018. Vol. 4, No 3. P. 482-501. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482. eCollection 2018.
181. Friedrich A.W. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. *Wien Med Wochenschr.* 2019. Vol. 169, Suppl. 1. P 25-30. DOI: 10.1007/s10354-018-0676-5.

182. La Fauci V., Alessi V. Antibiotic resistance: where are we going? *Ann Ig.* 2018. Vol. 30, Supple 1. P. 52-57. DOI: 10.7416/ai.2018.2235.
183. Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G. Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms.* 2020. Vol. 8, No 2. P.154. DOI: 10.3390/microorganisms8020154.
184. Gentry L.O. Bacterial resistance. *Orthop Clin North Am.* 1991. Vol. 22, No 3. P. 379-88.
185. Kahlmeter G. Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Ups J Med Sci.* 2014. Vol. 119, No 2. P. 78-86. DOI: 10.3109/03009734.2014.901446.

ДОДАТОК

Список публікацій здобувача:

1. Ткаченко П. В., Ткаченко Е. В., Журавель И. А., Казмирчук В. В., Дербисбекова У. Б. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонил-производных 5-аминопиразолов. *Вестник КазНМУ*. 2017. № 2. С. 317–321. (Особистий внесок – синтез цільових сполук, узагальнення результатів мікробіологічних досліджень, підготовка статті до друку).
2. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkyl-thiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action. *Вісник фармації*. 2017. № 2. С. 25–30. (Особистий внесок – проведення аналізу літературних джерел, виконання експериментальної частини дослідження, систематизація результатів).
3. Tkachenko P. V., Tkachenko O. V., Netosova K. Yu., Borisov O. V., Zhuravel I. O., Kazmirchuk V. V. The synthesis and the antimicrobial activity of N^1 -substituted 5-amino-4-arylsulfonyl-3-*N*-phenylamanopyrazoles. *Вісник фармації*. 2017. № 3. С. 3–9. (Особистий внесок – проведення синтезу цільових сполук, аналіз результатів мікробіологічного скринінгу, підготовка статті до друку).
4. Ткаченко П. В., Колесник С. В., Журавель И. А., Завада О. А., Дербисбекова У. Б. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола. *Фармация Казахстана*. 2017. № 8. С. 13–16. (Особистий внесок – самостійно проведено розробку методики та здійснено валідаційні процедури).

5. Tkachenko P., Tkachenko O., Netosova K., Borisov O., Zhuravel I. Products of interaction of substituted 5-aminopyrazoles with α -haloketones as potential pharmaceutical agents. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 5 (9). P. 25–28. (Особистий внесок – проведення синтезу сполук, участь в інтерпретації спектральних даних, підготовка статті до друку).

6. Ткаченко П. В., Ткаченко О. В., Журавель І. О., Казмірчук В. В. 4-(4'-Хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразол, який проявляє протигрибкову активність. *Патент на корисну модель UA 124716*, МПК А61К 31/505, С07D 239/69; Заявл. и 2017 09272 від 21.09.2017; Опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8. 4 с. (Особистий внесок – проведення патентного пошуку за напрямом, виконання синтетичної частини роботи, підготовка матеріалу для подачі в Укрпатент).

Продовження додатку

Апробація результатів дисертаційного дослідження

Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 23 квітня 2015 р., форма участі – публікація тез доповіді).
2. III Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 25-летию независимости Республики Казахстан (Алматы, Республика Казахстан, 21–22 апреля 2016 г., форма участі – публікація тез доповіді).
3. VI науково-практичній конференції з міжнародною участю (Харків, 13 жовтня 2017 р., форма участі – публікація тез доповіді).
4. XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 18-20 квітня 2018 р., форма участі – публікація тез доповіді).



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор з науково-педагогічної роботи

ЛНМУ ім. Данила Галицького

член-кор. НАМН України,

проф. Гжегоцький М.Р.

[Signature] 16 12 20 17 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Пошук сполук з протигрибковою дією в ряду 4-арилсульфонілпохідних 5-амінопіразолів

2. Ким запропоновано: Національний фармацевтичний університет, кафедра лікарської та аналітичної токсикології.

3. Автори: асп. П.В. Ткаченко, проф. І.О. Журавель

4. Джерело інформації:

1. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkylthiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action / P.V.Tkachenko, O.V.Tkachenko, K.Yu.Netosova, O.V.Borisov, I.O.Zhuravel // Вісник фармації.– 2017.– № 2.– С. 25–30.

2. Products of interaction of substituted 5-aminopyrazoles with α -haloketones as potential pharmaceutical agents / P.Tkachenko, O.Tkachenko, K.Netosova, O.Borisov, I.Zhuravel // ScienceRise: Pharmaceutical Science.– 2017.– № 5 (9).– P. 25–28.

3. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопирозола / П.В.Ткаченко, С.В.Колесник, И.А.Журавель, О.А.Завада, У.Б.Дербисбекова // Фармация Казахстана.– 2017.– № 8.– С. 13–16.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий та навчальний процес кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; листопад 2017 р.

Протокол № 6 від 13. 12. 2017 р.

6. Зауваження та пропозиції: продовжувати роботу з розробки методів синтезу і аналізу похідних 4-арилсульфонілпохідних 5-амінопіразолів.

Відповідальна за впровадження

Завідувач кафедри токсикологічної та аналітичної хімії

к. фарм. н., доцент

[Signature]

Галькевич І. Й.

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о.ректора Харківської медичної академії післядипломної освіти
проф. Сердюк О. І.

" 24 " _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Розробка і валідація методики кількісного визначення субстанції 4-(4-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу (протигрибкової дії).

2. Установа, її адреса, виконавці:

м. Харків, 61002, вул. Пушкінська, 53,
Національний фармацевтичний університет
Виконавець: Ткаченко Павло Володимирович

3. Джерела інформації:

Ткаченко П. В. Разработка и валідація методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопирозола / П. В. Ткаченко, С. В. Колесник, И. А. Журавель, О. А. Завада, У. Б. Дербисбекова. *Фармація Казахстана*. 2017. № 8. С. 13–16.

4. Ким і коли впроваджено:

Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків,
з грудня 2020.

5. Ефективність впровадження:

Метою роботи є розробка і валідація методики кількісного визначення субстанції 4-(4-хлорофеніл)сульфо-3-етилтіо-5-амінопіразолу з використанням методу неводного титрування. Автором розроблено методику, визначено параметри придатності.

Результати досліджень впроваджено в освітній процес Харківської медичної академії післядипломної освіти з метою застосування при викладенні профільних дисциплін циклу інтернатури «Загальна фармація».

6. Відповідальна за впровадження особа:

Доцент кафедри клінічної біохімії,
судово-медичної токсикології та фармації
к.ф.н.

Гузенко Н. В.

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Запорізького державного
медичного університету
професор Туманський В.О.



20 17 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Спрямований пошук сполук з протимікробною активністю в ряду 4-арилсульфонілпохідних 5-амінопіразолів

2. Ким запропоновано: Національний фармацевтичний університет, кафедра лікарської та аналітичної токсикології.

3. Автори: П. В. Ткаченко, О. В. Ткаченко, І. О. Журавель

4. Джерело інформації:

1. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонилпроизводных 5-аминопіразолов / П.В.Ткаченко, Е.В.Ткаченко, И.А.Журавель, В.В.Казмирчук, У.Б.Дербисбекова // Вестник КазНМУ.– 2017.– № 2.– С. 317–321.

2. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkylthiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action / P.V.Tkachenko, O.V.Tkachenko, K.Yu.Netosova, O.V.Borisov, I.O.Zhuravel // Вісник фармації.– 2017.– № 2.– С. 25–30.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий та навчальний процес кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету; листопад 2017 р.

Протокол № 3 від 10.10. 2017 р.

6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботи з синтезу похідних 4-арилсульфонілпохідних 5-амінопіразолів та вивченню їх фізико-хімічних і біологічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри
д.фарм.н., професор

О. І. Панасенко

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
Таджикского государственного
медицинского университета
им. Абуали ибни Сино,
д.м.н., профессор Солихов Д.Н.



« 02 » 05 2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Название предложений для внедрения: современные методологические подходы к изучению синтеза, физико-химических свойств и биологической активности производных тиенопиримидина.

Учреждение, адрес, исполнители: Национальный фармацевтический университет, 61168, г. Харьков, ул. Валентиновская, 4, Ткаченко П.В., Журавель И.А., Ткаченко Е.В.

Источники информации:

One-pot synthesis of 3-alkylthio and 3-amino-substituted 5-amino-4-r-sulfonyl-1H-pyrazoles / Tkachenko P.V., Zhuravel I.O., Borisov O.V.*, Tkachenko O.V. // XX Int. Sc. Pract. Conf of young scientists and students Actual questions of development of new drugs : Kharkiv, 23 Apr., 2015. — Kharkiv : NUPh, 2015. — С. 49.

Синтез и биологическая активность 1-R-бензил-3-фенилтиено[3,2-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дионов / Ткаченко П.В., Ткаченко Е.В., Журавель И.А. // Сборник тезисов III межд. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», посвященной 25-летию независимости Республики Казахстан : Алматы, 21-22 апр. 2016. — Алматы : КазНМУ, 2016. — С. 207-208.

Где и когда внедрено: в учебный и научно-исследовательский процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино с 2016 г.

Результат внедрения:

Представленные материалы исследований внедрены в научно-практическую деятельность кафедры. Эффективность внедрения отвечает критериям, которые приведены в источниках информации.

Замечания и предложения: не вносились.

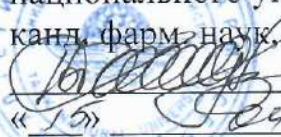
Ответственный за внедрение:

И.о. зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии,

Таджикского государственного медицинского университета им. Абуали ибни Сино,
к.б.н., доцент

Козихонов А.У.

УТВЕРЖДАЮ

Декан фармацевтического
факультета Таджикского
национального университета
канд. фарм. наук, доцент

Н. Б. Саидов
« 15 » Фев 2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

- 1. Название предложений для внедрения:** современные методологические подходы к изучению синтеза, физико-химических свойств и биологической активности производных тиенопиримидина.
- 2. Учреждение, адрес, исполнители:** Национальный фармацевтический университет, 61168, г. Харьков, ул. Валентиновская, 4, Ткаченко П.В., Журавель И.А., Ткаченко Е.В.
- 3. Источники информации:**
 1. One-pot synthesis of 3-alkylthio and 3-amino-substituted 5-amino-4-r-sulfonyl-1h-pyrazoles / Tkachenko P.V., Zhuravel I.O., Borisov O.V.*, Tkachenko O.V. // XX Int. Sc. Pract. Conf of young scientists and students Actual questions of development of new drugs : Kharkiv, 23 Apr., 2015. — Kharkiv : NUPh, 2015. — С. 49.
 1. Синтез и биологическая активность 1-R-бензил-3-фенилтиено[3,2-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дионов / Ткаченко П.В., Ткаченко Е.В., Журавель И.А. // Сборник тезисов III межд. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», посвященной 25-летию независимости Республики Казахстан : Алматы, 21-22 апр. 2016. — Алматы : КазНМУ, 2016. — С. 207-208.
- 4. Где и куда внедрено:** в учебный процесс, научно-исследовательскую работу, в лекционный курс кафедры фармации Таджикского национального университета (г. Душанбе) с 2016 г.
- 5. Результат внедрения:**

Представленные материалы исследований внедрены в научно-практическую деятельность кафедры. Эффективность внедрения отвечает критериям, которые приведены в источниках информации.
- 6. Замечания и предложения:** не вносились.

Ответственный за внедрение:
доцент кафедры фармации, к.ф.н.



Саидов Н.Б.