

КРИЩИШИН-ДИЛЕВИЧ АННА ПЕТРІВНА

УДК 615.283.+615.277.3):547.789.1].012.1

**4-ТІАЗОЛІДИНОНИ ТА СПОРІДЕНІ ГЕТЕРОЦИКЛИ В ДИЗАЙНІ
ПРОТИПАРАЗИТАРНИХ ТА ПРОТИПУХЛИННИХ АГЕНТІВ ЯК
ПОЛІФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЛІКОПОДІБНИХ МОЛЕКУЛ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фармацевтичних наук

Львів - 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий консультант: доктор фармацевтичних наук, професор
Лесик Роман Богданович
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії.

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
Георгіяну Вікторія Акопівна
Національний фармацевтичний університет,
завідувач кафедри фармацевтичної хімії;

доктор фармацевтичних наук
Воскобойнік Олексій Юрійович
Запорізький державний медичний університет,
доцент кафедри органічної і біоорганічної хімії;

доктор хімічних наук,
Походило Назарій Тарасович
Львівський національний університет імені Івана Франка, провідний науковий співробітник кафедри органічної хімії.

Захист відбудеться «9» квітня 2021 року о 10⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Автореферат розісланий «9» березня 2021 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



І.В. Драпак

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протягом останніх десятиріч, процес розробки нових лікарських засобів суттєво трансформувався від *in vivo* моделей до таргетних досліджень, які, в основному, представлені спрямованим дизайном високоафінних лігандів до валідних біо-мішеней, що беруть участь у ключових ланках патогенезу захворювань. Таким чином, береться до уваги тільки один механізм дії біологічно активної молекули. Дана редуccionістська стратегія лежить в основі високоефективного біологічного скринінгу і дозволяє вивчення афінності тисяч сполук до визначеної біо-мішені. Незважаючи на суттєві успіхи, часто ідентифіковані сполуки-хіти виявляються неефективними в *in vivo* дослідженнях та/або не враховують всі біохімічні процеси складних біологічних систем. Альтернативним підходом є пошук активних молекул, які б впливали на різнопланові біо-мішені. Таким чином, виправданою є концепція «привілейгованих структур», що характеризуються широким спектром біологічної активності. До таких структур належать похідні 4-тіазолідинону, які виявляють широкий спектр біологічної активності, що в поєднанні із різносторонніми можливостями структурної модифікації свідчить про їх перспективу для сучасного процесу створення ліків. Важливим підґрунтям для розробки нових БАР на основі 4-тіазолідинонів та споріднених гетероциклів є численні роботи науковців щодо мультитаргетності та поліфармакологічних властивостей цього класу сполук (Б.С. Зіменковський, Р.Б. Лесик, 2004-2020; Й.Д. Комариця, 1988-1993; R. Ottanà, R. Maccari, 2005, 2009-2020; S.K. Saraf, 2008, 2014; T. Tomasic, L.P. Mašić, 2009-2020).

Сучасні підходи медичної хімії часто передбачають поєднання в одній молекулі різних гетероциклічних фрагментів, тобто використання «гібрид-фармакофорного» підходу (S. Fortin, G. Verube, 2013), що дозволяє потенціювати бажану дію чи зумовлює появу нових ефектів. Ця стратегія є актуальною й для пошуку нових протипаразитарних агентів, зокрема сполук із протитрипаносомною та протилейшманіозною активностями. У цьому напрямку обґрунтованим є вибір гетероциклів, таких як індольний, бензоксазольний, піразоліновий, що в поєднанні з тіазолідином утворюватимуть «гібридні сполуки» (K.L. Dhar, 2014). Одним з ключових фармакологічних векторів є пошук потенційних протипухлинних та протипаразитарних агентів, а також сполук із кількома видами активності. У контексті розробки молекул з поліфармакологічним профілем, актуальним є дизайн «малих молекул» із протипухлинною та протипаразитарною активностями, враховуючи подібність метаболічних процесів (генетична спорідненість ряду кіназ), в тому числі швидка проліферація клітин найпростіших та пухлинних клітин.

Проблемою 4-тіазолідинонів та споріднених гетероциклічних сполук, в тому числі як протипаразитарних засобів, на світовому рівні займається BOOЗ (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases of WHO). Результати розробки таких агентів представлено у роботах науковців Бразилії, Франції, Великобританії, Чилі, США (A.C. Lima Leite, M.Z. Hernandez, 2009, 2012, 2014-2019; P. Grellier, 2012-2020; A.H. Fairlam, 2005-2017; M.Z. Wang, 2010-2019; R.T. Jacobs, 2011-2019 та багато інших).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (державна реєстрація 0116U004500, шифр теми ІН 10.06.0001.16).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є спрямований дизайн та синтез нових похідних 5-ен-4-тіазолідинонів, тіазолідинон/тіазоліндол/імідазотіадіазольних гібридних молекул, а також тіазолвмісних поліциклічних сполук та їх біоізомерних кон'югатів як потенційних «лікоподібних молекул» із поліфармакологічним профілем, що включає протипухлинну, протипаразитарну та антимікробну активність. Застосування методів комп'ютерної хімії та експериментальних досліджень механізмів реалізації нових ефективних та низькотоксичних сполук спрямовані на створення нових прототипів протипухлинних та протипаразитарних ЛЗ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- Провести огляд літературних даних та узагальнити сучасні підходи у терапії трипаносомозів, лейшманіозів та малярії, застосування стратегії перепрофілювання в розробці лікоподібних молекул як антипроліферативних агентів із подвійною протипаразитарною та/чи протипухлинною активностями;
- Розробити математичні моделі та провести QSAR-аналіз для різноманітних груп тіазолідинонів та споріднених гетероциклів, включно із такими, що володіють подвійною протитрипаносомною/протипухлинною активністю з метою формування сфокусованих бібліотеки сполук для подальших досліджень;
- Розробити методи синтезу 5-єнамін-4-тіазолідинонів на основі роданін-3-карбонових кислот та 2-ціано-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідин-2-іліден)-*N*-фенілацетамідів як потенційних протипухлинних та протипаразитарних агентів;
- На основі гібрид-фармакофорного і комбінаторного підходів та методу молекулярної гібридизації отримати ряд нових похідних тіазолідинон/тіазоліндол/імідазотіадіазолів, тіопіранотіазолів та тіазолідинон/тіогідантоїн-індольних гібридних молекул і їх поліциклічних похідних. Дослідити їх протипухлинну, протипаразитарну та протимікробну активності для встановлення кореляції структура-активність;
- На основі SAR-аналізу виділити фрагменти високоактивних сполук та здійснити дизайн спрямованих суб-бібліотек молекул;
- Синтезувати низку 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів для вивчення їх протилейкемічної активності;
- Отримати гібридні 3-[(4-оксо-3-карбокси-2-тіоксотіазолідин-5-іл)]-1*H*-індол-2- та 3-[(2-аміно-4-оксотіазол-5-іліден)метил]-1*H*-індол-2-карбонові кислоти та карбоксилати для дослідження їх як потенційних протипухлинних агентів;
- Застосувати гібрид-фармакофорний підхід для отримання молекул, що вміщують фрагменти тіазолідину, 4-тіазолідинон-3-карбонових кислот, тіопіранотіазолу та 3,5-діарил-3,4-дигідропіразолу;
- Встановити основні взаємозв'язки структура-активність синтезованих похідних із протитрипаносомною дією із застосуванням *in silico* методів;
- Дослідити гостру токсичність сполук-лідерів в *in vivo* експериментах.

- З метою встановлення клітинних та молекулярних механізмів біологічної дії сполук-лідерів провести їх поглиблене *in vitro* дослідження цитотоксичності щодо псевдонормальних та ряду пухлинних клітин, вивчити їх вплив на ДНК пухлинних клітин, полімеризацію тубуліну. Для дослідження ймовірних шляхів метаболізму, дослідити вплив сполук-лідерів на експресію генів, що кодують синтез білків із родини CYP450.

Об'єкт дослідження – прогнозування поліфармакологічних властивостей; дизайн структури, методи синтезу, хімічні, фізико-хімічні та біологічні властивості, залежність структура-активність; механізми реалізації біологічних ефектів 5-ен-4-тіазолідинонів та споріднених гетероциклічних систем.

Предмет дослідження – 5-ен-4-тіазолідинони, тіопіранотіазоли та споріднені гетероциклічні системи як біологічно активні сполуки.

Методи дослідження: статистичні обрахунки проводилися із використанням програмного забезпечення RStudio v. 1.1.442, R Commander v.2.4-4, Microsoft Excel, ANOVA, Multi-Mode Analysis. Для проведення *in silico* досліджень використовували програми Accelrys Draw 4.1, ISIS Base, AutoDock Vina, Biovia Discovery Studio, HyperChem 7.5, Dragon, OpenBabel, MOPAC, RStudio, ACDLabs, Online Chemical Database, GLORY, GLORYx. Для синтезу речовин використовувались загальні методи класичного органічного синтезу та синтезу із застосуванням мікрохвильового опромінення; для доведення хімічної структури, індивідуальності та ступеня чистоти синтезованих сполук застосовані сучасні фізико-хімічні методи (елементний аналіз, ^1H -, ^{13}C ЯМР-спектроскопія, мас-, хромато-мас-спектрометрія, рентгеноструктурний аналіз). Фармакологічні дослідження *in vitro* та *in vivo*: визначення протитрипаносомної, протилейшманіозної, протималарійної, протипухлинної, протимікробної активності, цитотоксичності, впливу на ДНК пухлинних клітин (програмне забезпечення Casplab-1.2.3b2), гострої токсичності, дослідження експресії генів методом ПЛР в реальному часі, впливу на полімеризацію тубуліну.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено комплексне дослідження присвячене спрямованому дизайну похідних 4-тіазолідинонів із поліфармакологічним профілем, вивчено прикладне значення стратегії перепрофілювання в розробці лікоподібних молекул як антипроліферативних агентів із подвійною протипаразитарною та/чи протипухлинною активностями.

Методом множинної регресії вперше розроблено математичну модель для прогнозування протипухлинної дії тіазолідинонів щодо різних ліній раку на основі встановленої їх протитрипаносомної активності та ряду запропонованих і обчислених дескрипторів; виділено 8 ліній ракових клітин, показники інгібування росту яких найкраще корелюють із значеннями IC_{50} щодо *Trypanosoma brucei brucei* та розроблено відповідні рівняння регресії.

Розроблено ефективні методи синтезу і одержано 333 нових похідних 4-тіазолідинонів та гетероциклічних систем на їх основі, встановлена будова, вивчено фізико-хімічні параметри та біологічна активність. Розроблено методики отримання та структурної функціоналізації похідних 2-тіоксо-4-тіазолідинон-3-карбонових кислот, що дозволило одержати серії неописаних в науковій літературі різноманітних 5-арил(гетерил)амінометилених похідних, 5-арил(гетерил)ілідених та

5-єнамін-3-(1-арилпіролідін-2,5-діон)-роданінів, які проявляють суттєву протитрипаносомну, антилейшманіозну і протипухлинну активність з високою селективністю щодо ліній лейкемії *DAMI* та *HL-60*. Синтезовано 2-ціано-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідін-2-іліден)-*N*-арил-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідін-2-іліден)ацетаміди та їх 5-іліденпохідні, для яких встановлено певний рівень протипухлинної дії. У рамках гібрид-фармакофорного підходу одержано групи 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилен)-гідразино]- та 2-[(6-феніл)-імідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилен]-гідразино}-тіазолідін-4-онів, 2-{*N'*-[2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилен]-гідразино}-, 2-[6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилен)-гідразино]-тіазолів та 2-[6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилен)-гідразино]-тіазолів, для яких встановлено високу протипаразитарну активність на субмікромолярному рівні щодо *Trypanosoma brucei brucei* та *Trypanosoma brucei gambiense* на фоні несуттєвої цитотоксичності щодо людських первинних фібробластів (клітинна лінія *AB943*) *in vitro* та гострої токсичності *in vivo*. Отримано нові *N*-заміщені похідні ізотіохроменотіазолів, опрацьовано методи синтезу нових 9-арил(гетерил)-3,7-дитіа-5-азатетрацикло[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]тетрадецен-4(8)-онів-6 та їх *N*-заміщених похідних. Вперше одержано 1-оксо-1,9-дигідро-2-тіа-9-азафлуорен-3-карбонові кислоти на основі гідролізу та рециклізації 3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідін-5-іліденметилен)-1*H*-індол-карбонових кислот, тетрациклічні 1-тіоксо-9,10а-дигідропіроло[3,4-*b*]карбазол-3,10-діони, 5-[(1*H*-індол-3-іл)метилен]-2-тіоксотіа(іміда)золідін-4-они та 2-[1-карбокси-2-(4-карбокси-1*H*-3-індоліл)-1-етенілдісульфаніл]-3-(4-карбокси-1*H*-3-індоліл)-2-пропанові кислоти.

Проведено спрямований синтез та поглиблене вивчення протиракового потенціалу 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів, що дозволило достовірно встановити їх селективну протилейкемічну активність. Запропоновано напрямки дизайну тіазолідинон- і тіопіранотіазол-піразолінових гібридних молекул, що дозволило одержати 4-[3-(5-бromo-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5*H*-тіазол-2-он та його 5-іліденпохідні, 5-[(3,5-діарил-3,4-дигідропіразол-2-іл)метилен]-2-тіоксотіазолідін-4-они, 2-{5-[(3,4-дигідропіразол-2-іл)метилен]-4-оксо-3-фенілтіазолідін-2-іліден}-2-ціаноацетаміди, 3-піразолілзаміщені хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазоли, ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-они та 3,7-дитіа-5-азатетрацикло-[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]тетрадецен-4(8)-они.

На основі комплексу досліджень кореляції «структура – біологічна дія», який включав віртуальний, традиційний та високоефективний фармакологічний скринінг, QSAR-аналіз, молекулярне та математичне моделювання, виділено 100 «лікоподібних» молекул з високою протираковою, протитрипаносомною, антилейшманіозною та антимікробною активностями для поглиблених досліджень та дизайну нових біологічно активних сульфур- та нітрогенвмісних гетероциклів.

На основі системного опрацювання експериментальних даних протитрипаносомної активності більше ніж 200 сполук алгоритмами машинного навчання розроблено дві нові QSAR-моделі, що описують антитрипаносомну активність та володіють хорошою прогностичною здатністю. Поглиблене *in vitro* вивчення цитотоксичності сполук-хітів 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилен)-гідразино]-тіазолідін-4-ону та його 5-метилпохідного, метилового естеру 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідін-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти, метил

5-флюоро-3-[(2-(4-гідроксіаніліно)-4-оксотіазол-5-іліден)метил]-1*H*-індол-2-карбоксилату та 4-[3-(5-бромо-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5*H*-тіазол-2-ону на клітинах гепатоцелюлярної карциноми *HepG2* та нормальних фібробластах *Balb/c3T3* у МТТ тесті довело високу селективність їх дії на пухлинні клітини у субмікромольних концентраціях та дозволило встановити, що дезінтеграція клітинної мембрани ракових клітин є одним із етапів їх цитотоксичної дії. Проведений вестерн-блот аналіз білків, що беруть участь у регуляції процесів ініціювання, здійснення апоптозу та у стадіях клітинного циклу, для метилового естеру 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти свідчить, що у клітинах *HepG2* сполука індукує апоптоз через каспаз 3-, PARP1- та Вах-протеїн-залежні шляхи, при цьому не впливаючи на проходження G1/S фази та ймовірно викликаючи зупинку фази G2/M. Ще одним ймовірним механізмом реалізації антипроліферативного ефекту сполуки-лідера є пошкодження ДНК у клітинах *HepG2* на рівні із препаратом порівняння Доксوروبіцином, встановлене методом ДНК-комет. Метил 5-флюоро-3-[(2-(4-гідроксіаніліно)-4-оксотіазол-5-іліден)метил]-1*H*-індол-2-карбоксилат знижує експресію гену *Cyp1b1* мРНК (лінія клітин 3T3-L1), впливаючи на активність протеїнів родини CYP450 та ендогенні метаболічні шляхи, екстрагепатичний метаболізм ксенобіотиків та опосередковано на канцерогенез.

Ідентифіковано похідні 5-амінометиліден-роданін-3-пропанової кислоти, 2-(5-іліден-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-сукцинімідів та 5-амінометиліден-2-іліден-3-феніл-4-тіазолідинону як високоактивні протигрибкові (*Candida albicans*) та протимікробні (*Staphylococcus aureus*) агенти, що обґрунтовує продовження системних досліджень у наведеному напрямку.

Наукова новизна проведених досліджень підтверджується патентами України корисну модель (№ 98069, 2015; № 98037, 2015; № 142117, 2020).

Практичне значення отриманих результатів. Встановлена подвійна протипаразитарна та протипухлинна активності синтезованих сполук є фундаментальною основою для дизайну нових поліфармакологічних молекул або високоселективних агентів на основі біфармакофорних тіазолідинонів. Отримані результати є основою для розробки нових БАР із протипаразитарними, протипухлинними та протимікробними властивостями.

Виконання синтетичної частини дисертаційної роботи забезпечило одержання нових суб-бібліотек 5-ен-4-тіазолідинонів та гетероциклів на їх основі, у тому числі гібридних молекул з тіопіранотіазольним, піразоліновим, індольним, імідазотіазольним та спорідненими структурними фрагментами.

Вперше встановлено, що результати протилейшманіозної дії тіазолідинон/тіазол-індол/імідазотіадіазольних гібридних молекул щодо *Leishmania major* (штам Friedlin V1) корелюють із їх протитрипаносомною та протималярійною активностями. Доведено подвійну протипаразитарну та протипухлинну активності тіазолідинон-піразолінових гібридних молекул. Для ряду тіопіранотіазолів вперше встановлено протитрипаносомну та протилейшманіозну активність. Встановлено, що наявність 2-хлоро-3-(4-нітрофеніл)проп-2-еніліденового залишку в положенні C5 4-тіазолідинового кільця є важливим фактором досягнення суттєвого рівня протиракового ефекту. Системне вивчення

протипухлинної дії синтезованих тіа(іміда)золідинон-індольних гібридних молекул дозволило встановити ряд нових особливостей кореляції «структура-дія» та виділити високоактивний метиловий естер 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти, для якого проведені поглиблені дослідження механізмів реалізації антипроліферативної дії.

Шляхом системної реалізації гібрид-фармакофорного підходу запропоновано нові напрямки дизайну «лікоподібних молекул» із поліфармакологічним профілем. Розроблені QSAR-моделі та виділені прогностичні характеристики активних молекул є підґрунтям для *in silico* прогнозування протитрипаносомної дії та молекулярної оптимізації похідних тіазолу/тіазолідинону.

Фрагменти роботи впроваджено в науковий та навчальний процеси НФаУ, ЗДМУ, НУ «Львівська політехніка» (акти впровадження від 14.01.2020 р., 12.02.2020 р., 25.02.2020 р.).

Особистий внесок здобувача. У ході виконання дисертаційної роботи автором разом із науковим консультантом зроблено дизайн дослідження, обрано основні напрямки проведення синтетичних та біологічних досліджень. Дисертантом самостійно здійснено огляд сучасної наукової літератури, окреслено стратегії пошуку нових протипаразитарних та/або протипухлинних агентів на основі гетероциклічних сполук, обрано об'єкти досліджень та зроблено дизайн досліджень біологічної активності.

Дисертантом розроблено та реалізовано препаративні методики одержання цільових сполук, інтерпретовано спектральні характеристики, вивчено і узагальнено фізико-хімічні дані всіх синтезованих сполук. Дисертантом взято участь у фармакологічних дослідженнях, а також самостійно інтерпретовано, систематизовано і статистично оброблено отримані дані. Дисертантом проведено *in silico* дослідження (розрахунок молекулярних дескрипторів, розробка QSAR-моделей, молекулярний докінг) та здійснено моделювання фармакофорів.

Співавторами наукових праць є науковий консультант, а також науковці, з якими проводились спільні фізико-хімічні та біологічні дослідження. У ході виконання дисертаційної роботи спільно з Національним інститутом раку (міжнародна наукова програма Національного інституту здоров'я США *Developmental Therapeutic Program (DTP)*, Бетезда, Меріленд, США), лабораторією *UMR7245 CNRS «Molecules de Communication et Adaptation des Microorganismes»* Національного музею історії природи (керівник проф. Філіп Грельє, Париж, Франція), дослідницьким центром молекулярної медицини СеММ Австрійської академії наук (проф. Роберт Краловіч), Інститутом молекулярної та трансляційної медицини Університету Палацького (Оломоуц, Чехія, д-р Павло Поліщук, керівник Мар'ян Гайдук), кафедрою органічної хімії Познанського медичного університету імені Кароля Марцінковського (проф. Анджей Гзелля, зав. кафедри проф. Луціюш Запруго, Познань, Польща), кафедрою фармакології ЛНМУ імені Данила Галицького (н. сп. І.О. Нектегаєв, зав. кафедри проф. О.Р. Піняжко) та ТОВ «Укроргсинтез» (к. хім. н. О.В. Карпенко, м. Київ) проведено та узагальнено дані фізико-хімічних методів аналізу та методів дослідження біологічної дії. Співавторами наукових праць дисертанта є автори захищених дисертацій: Лелюх М.І, 2016, Деркач Г.О, 2020. Персональний внесок дисертанта в кожну з

опублікованих праць із співавторами вказано у дисертації та авторефераті у списку фахових публікацій. Усі наукові узагальнення, результати, висновки та рекомендації, наведені у дисертації, опрацьовані та виконані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях: Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference RECOOP HST (Прага, 2013), X Ювілейна Всеукраїнська навчально-наукова конференція з міжнародною участю (Тернопіль, 2013), «Ліки людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2013), “XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego” (Białystok, 2013), Bridges in Life Science 10th Annual Scientific Conference (Вроцлав, 2015), Scientific Congress of the Austrian Pharmaceutical Society (OPhG) (Vienna, 2015), Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles, CNCH-2015 (Харків, 2015), The 6th International Pharmaceutical conference Science and Practice (Kaunas, 2015), Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Meeting RECOOP HST (Прага, 2016), “From molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Львів, 2016), XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (Kraków, 2017), International Weigl Conference (Львів, 2017), 8th RECOOP Annual Project Review Meeting (Zagreb, 2017), XIII Diagnostic, predictive and experimental oncology days (Olomouc, Czech Republic, 2017), 25th Wilhelm Bernard Workshop on the cell Nucleus (Nizhny Novgorod, 2017), 2-й міжнародний симпозіум Innovation in Medicine Smart Lion (Львів, 2018), 14th RECOOP Bridges in Life Sciences (Bratislava, 2019), «Львівські хімічні читання» (Львів, 2019), «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 2019), Bridges in Life Sciences 10th RECOOP Annual Review Meeting (Wroclaw, 2019).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 54 наукових роботах (6 одноосібних), серед яких 29 статей у наукових фахових виданнях України та інших країн (18 індексуються БД *Scopus*), в тому числі 3 розділи монографій (1 розділ індексується у БД *Web of Science*), отримано 3 патенти України, 22 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 650 сторінках тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, восьми розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 479 найменувань, з них 455 іноземних та 5 додатків (окремою частиною). Обсяг основного тексту становить 290 сторінок. Робота проілюстрована 49 схемами, 69 рисунками та 74 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Сучасні напрямки пошуку нових малих молекул серед похідних тіазолідинону із протипаразитарною дією. Можливості застосування «стратегії перепрофілювання» в пошуку активних протипаразитарних та протипухлинних агентів (огляд літератури)

Проведено огляд літературних даних, що узагальнює сучасні підходи у дизайні лікарських засобів та особливості терапії трипаносомозів, лейшманіозів та малярії. Розглянуто стратегію перепрофілювання в розробці лікоподібних молекул

як антипроліферативних агентів із подвійною протипаразитарною та/чи протипухлинною активностями.

Характеристика матеріалів і методів дослідження

Наведено фізико-хімічні методи, використані для доведення структури, індивідуальності та чистоти синтезованих сполук; програмне забезпечення *in silico* досліджень – статистичних обрахунків, розрахунку молекулярних дескрипторів, QSAR-аналізу, молекулярного докінгу, фармакофорного моделювання та прогнозування метаболітів. Описано методологічні підходи до біологічних досліджень та вивчення механізмів дії найактивніших сполук.

Формування сфокусованих бібліотек сполук для синтетичних і біологічних досліджень

Розроблено дизайн дослідження (рис. 1), що включає: встановлення кореляції протипаразитарна-протипухлинна активність тiazолідинонів із подвійною дією, формування сфокусованих бібліотек, застосування гібрид-фармакофорного підходу, дизайн гібридних молекул на основі фармакофорних елементів та груп, виділених в результаті біологічних досліджень, проведення поглиблених біологічних досліджень, встановлення механізмів дії сполук-лідерів.

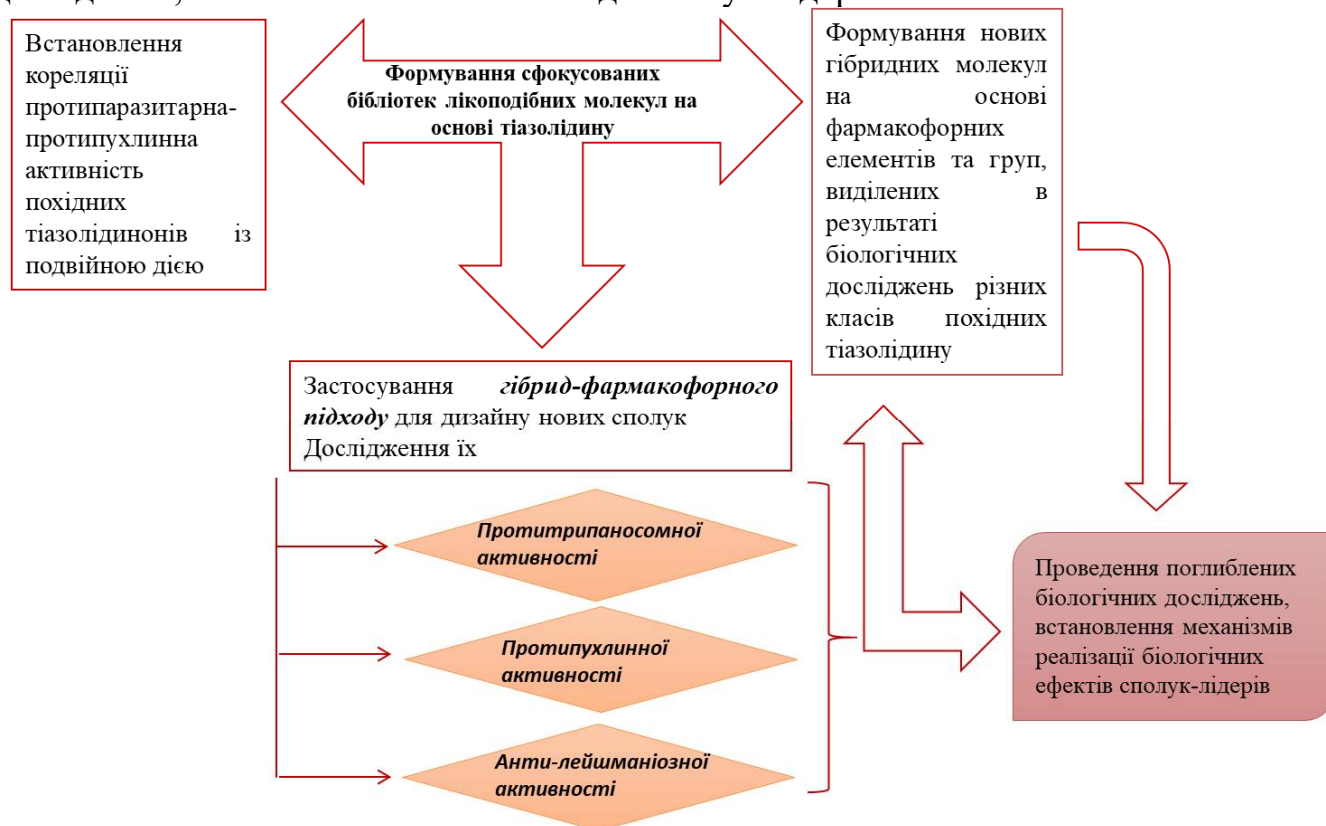


Рис.1. Дизайн дисертаційного дослідження.

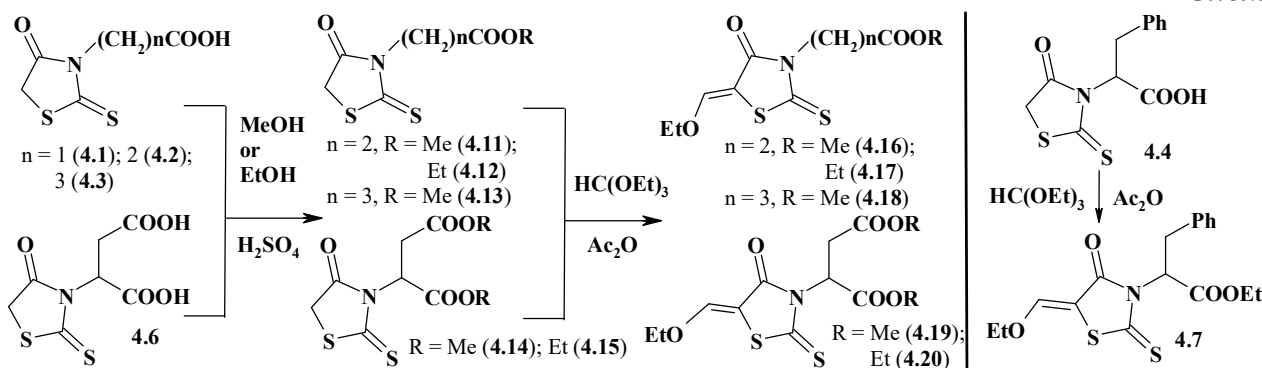
У результаті аналізу *in-house* бібліотеки різноманітних тiazолідинонів виділено 11 сполук із подвійною протипаразитарною та протипухлинною дією.

Побудова математичної моделі прогнозування протипухлинного ефекту сполук на основі протипаразитарної дії здійснена методом множинної регресії. Залежними параметрами дії обрано концентрації IC_{50} для *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*) та GI_{50} для ракових клітин. Показники відібрані на основі розрахунку парних коефіцієнтів кореляції за методом Пірсона. Для 8 ліній ракових клітин, показники інгібування росту яких найкраще корелюють із IC_{50} на *Tbb*, розроблено рівняння регресії. На основі даних літератури та статистичної оцінки подвійної протипухлинної та протипаразитарної діє, окреслено оптимальні напрямки досліджень.

Дизайн та синтез протипаразитарних і протипухлинних агентів на основі 5-єнамін-4-тіазолідинонів та 5-іліден-4-тіазолідинон-3-алканкарбонових кислот

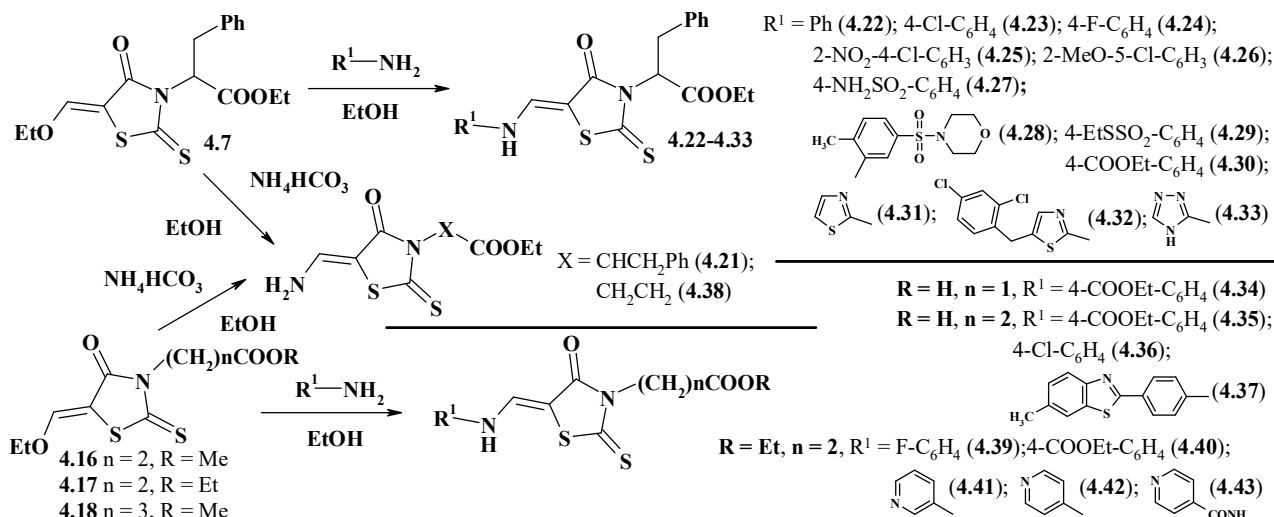
На першому етапі синтетичної частини роботи для введення єнамінової групи у C5 положення 2-тіоксо-4-тіазолідинонового (роданінового) циклу взаємодією з триетилортоформіатом в ацетангідриді одержано 5-етоксиметилєнаміди. Для роданін-3-фенілпропанової кислоти **4.4** паралельно спостерігали утворення естеру **4.7**, у інших випадках утворюється суміш 5-етоксиметилєнаміди роданін-3-карбонових кислот та їх естерів, що підтверджено хромато-мас-спектрами (схема 1).

Схема 1



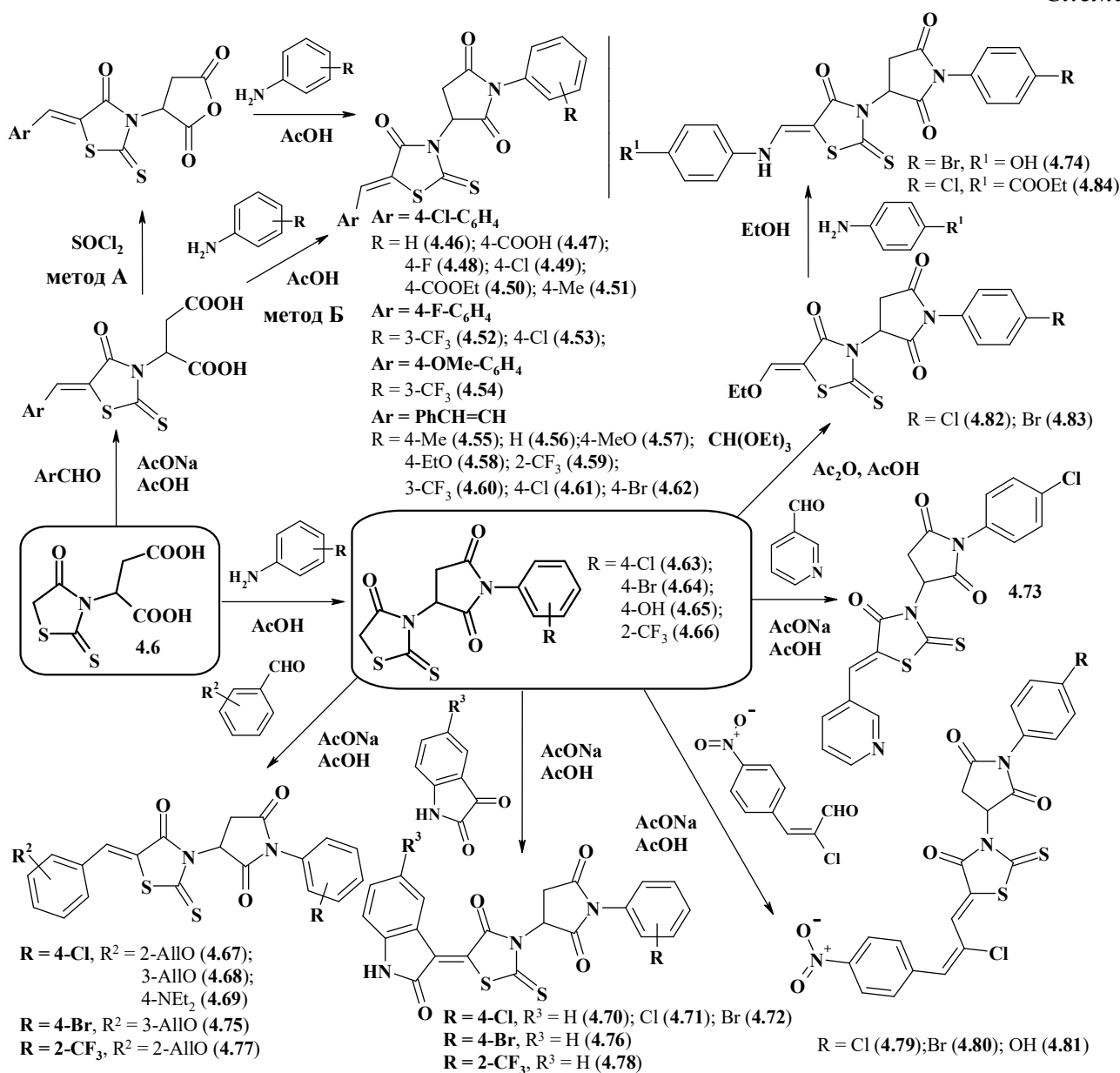
Взаємодією етилового естеру 5-етоксиметилєнаміди роданін-3-фенілпропанової кислоти **4.7** та кислот **4.16-4.18** із амонію гідрокарбонатом, первинними ароматичними та гетероциклічними амінами в середовищі етанолу синтезовано відповідні єнаміни **4.21-4.33** та **4.34-4.43** (схема 2).

Схема 2



Для синтезу цільових 5-іліден-3-(1-арилпіролідін-2,5-діон)-роданінів **4.46-4.62** розроблено альтернативний підхід (Схема 3).

Схема 3

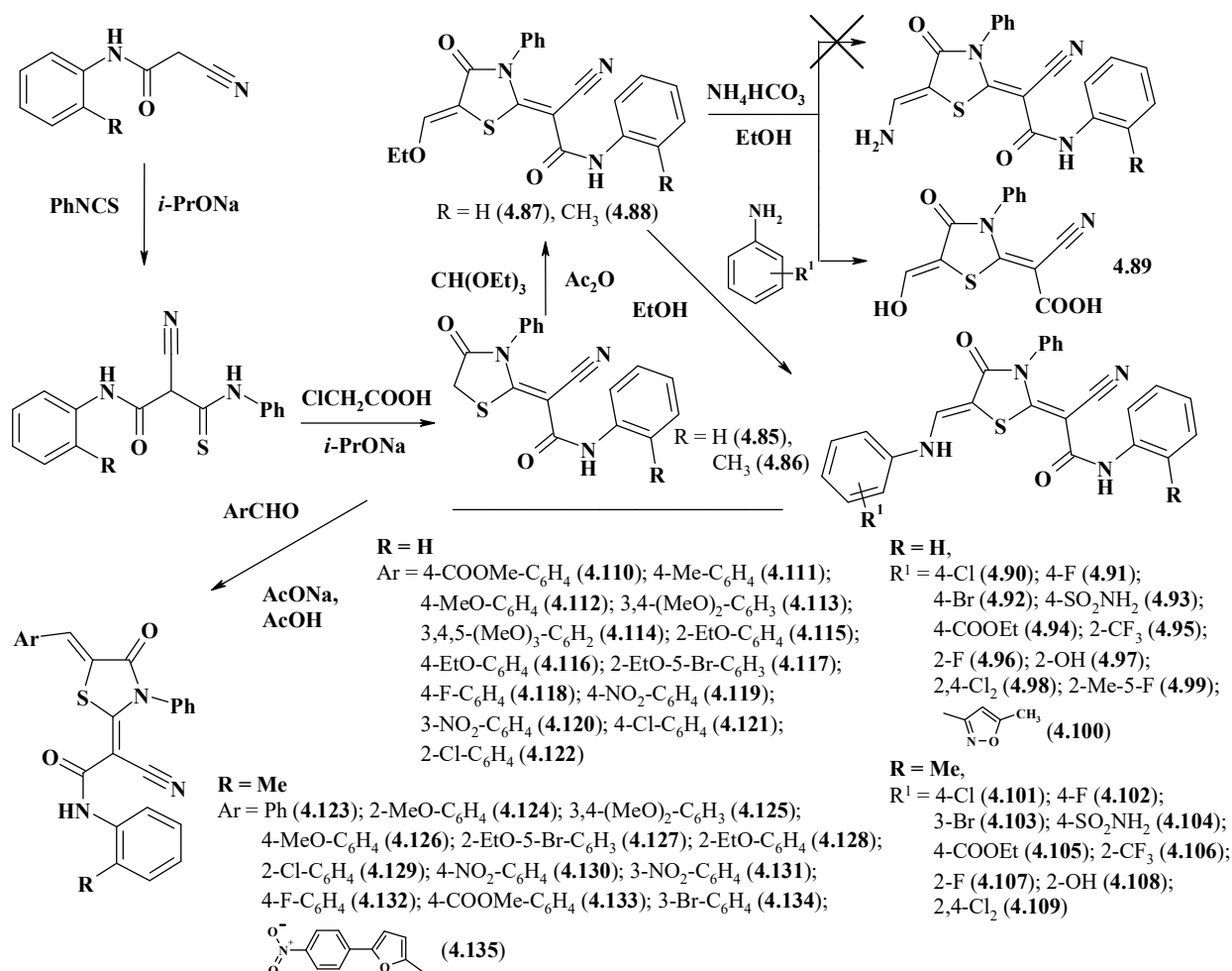


Так, цільові сполуки одержано довготривалим кип'ятінням (18-22 год) 5-іліденроданін-3-сукцинатних кислот з ароматичними амінами (1:1) в ацетатній кислоті, що дозволяє оминати стадію синтезу ангідридів. Ряд 2-(5-іліденроданін-3-іл)-сукцинімідів **4.67-4.81** отримано у реакціях Кньюенагеля із відповідних 3-(1-арилпіролідін-2,5-діон)-роданінів **4.63-4.66**, синтезованих вищеописаним методом. Як оксосполуки використано ароматичні альдегіди, ізатини та циміналь. 5-Єнамінопохідні **4.74** та **4.84** отримано на основі похідних **4.63**, **4.64** через стадію утворення 5-етоксиметиліденроданін-3-піролідін-2,5-діонів **4.82**, **4.83** (схема 3).

Ще одними об'єктами дослідження стали 2-ціано-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідін-2-іліден)-*N*-феніл- та (*o*-толіл)-ацетаміди **4.85** та **4.86**, на основі яких синтезовано ряд 5-амінометилєнпохідних **4.90-4.109** через стадію утворення відповідних 5-етоксиметилєн-похідних **4.87** та **4.88**. Крім того, в умовах реакції Кньюенагеля синтезовано ряд 5-бензилідєн- та 5-гетерилідєнпохідних **4.110-4.135** (схема 4).

Вихідні сполуки **4.85** та **4.86** одержані [2+3]-циклоконденсацією монохлороцотової кислоти з 3-аніліно-2-ціано-*N*-феніл-3-тіоксопропанамідами, як *in situ* інтермедіатами реакції ізотіоціанатів з амідами ціаноацетатної кислоти.

Схема 4



Протитрипаносомну дію сполук **4.21-4.33** та **4.41-4.43** вивчали щодо *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb) та *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg); обчислено індекси селективності як відношення величин цитотоксичності CC₅₀ (лінії міобластів L-6) до IC₅₀. Етилові естери 2-(5-амінометилен-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропанової кислоти **4.21-4.33** інгібували ріст паразитів у мікро- та субмікромолярних концентраціях. Для сполук-хітів **4.26**, **4.28** та **4.30** встановлено індекси селективності на рівні 158-1396,2, що є співмірними із такими для Пентамідину (5396,9) та суттєво перевищують Ніфуртимоксу (27,2).

У рамках концепції «мультифункціональних лікарських засобів» для 5-енамінороданін-3-карбонових кислот досліджувалася протипухлинна активність відповідно до протоколу NCI. Найвищий рівень інгібування росту ракових клітин спостерігався для етилового естеру 2-(5-{[5-(2,4-дихлоробензил)-тіазол-2-іламіно]-метиле}-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-3-фенілпропанової кислоти **4.32**, причому рівень GI₅₀ був нижчим 10 мкМ для всієї досліджуваної панелі 59 пухлинних ліній. Так, середнє значення (MG-MID) для параметру GI₅₀ становило 2,57 мкМ, а для TGI – 47,27 мкМ.

Ряд 5-іліденроданін-3-сукцинімідів **4.46-4.60** вивчався на 4 лініях лейкемічних клітин *Dami*, *HL-60*, *Jurkat* та *K562* у концентрації 10 мкМ. Найчутливішою лінією була лінія *DAMI* – 4 сполуки інгібували її ріст більше, ніж на 50%. Серед тестованих речовин можна виділити сполуку-хіт **4.46**, що була активною на лініях *DAMI* та *HL-60* (44,75 та 40,30%, відповідно). Гостра токсичність *in vivo* для тестованих сполук становила 260-460 мг/кг.

Сполуки **4.63**, **4.65**, **4.67**, **4.68**, **4.70**, **4.71**, **4.76**, **4.79** та **4.81** тестувалися на лініях карциноми легень, раку яйників, раку товстої кишки, раку молочної залози, гліобластоми, раку шийки матки та лінії нормальних кератиноцитів людини *HaCaT*. Найактивнішими виявилися 2-(5-іліденроданін-3-іл)-сукциніміди із 2-хлоро-3-(4-нітрофеніл)проп-2-еніліденовим залишком **4.79**, **4.81** (рис. 2), для яких встановлено невисоку цитотоксичність щодо нормальних кератиноцитів людини і, відповідно, перспективні індекси селективності дії (SI).

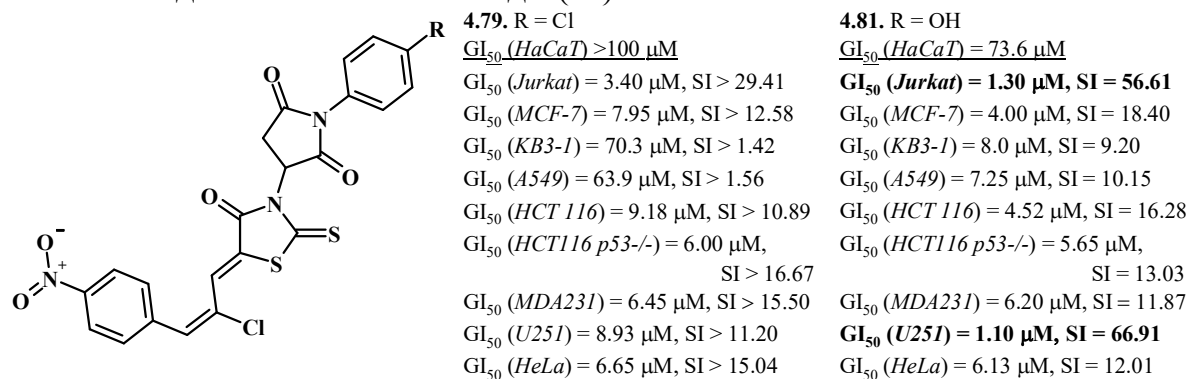
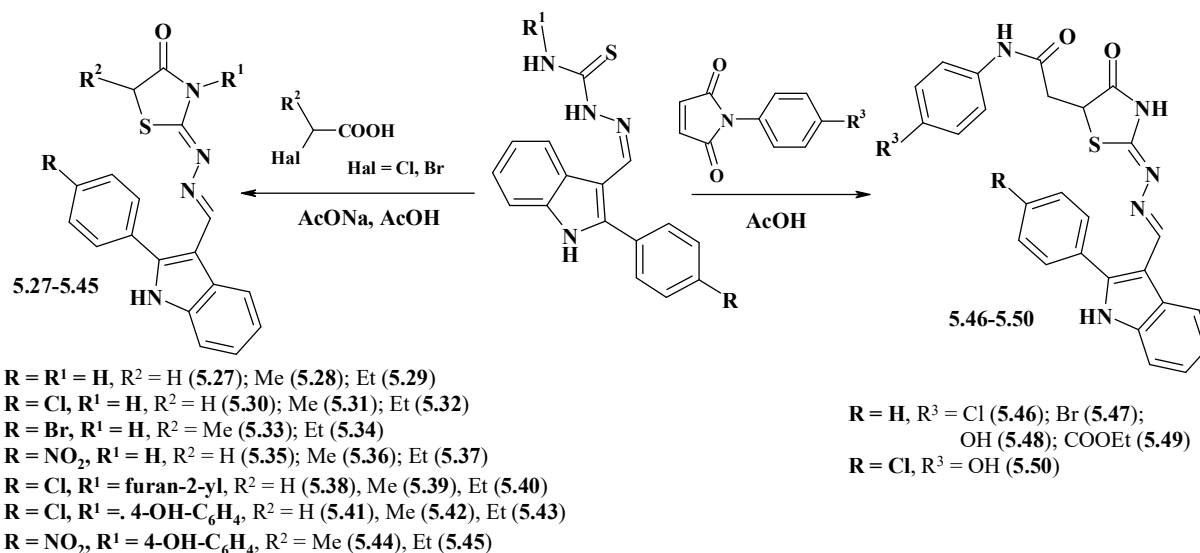
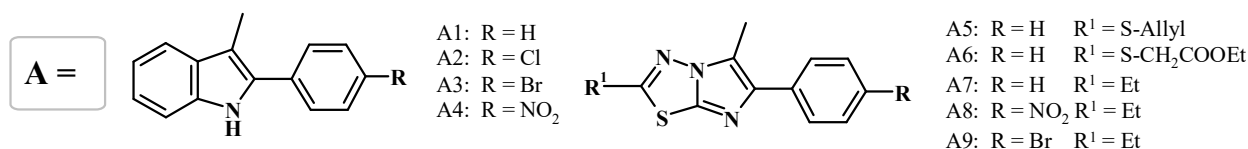
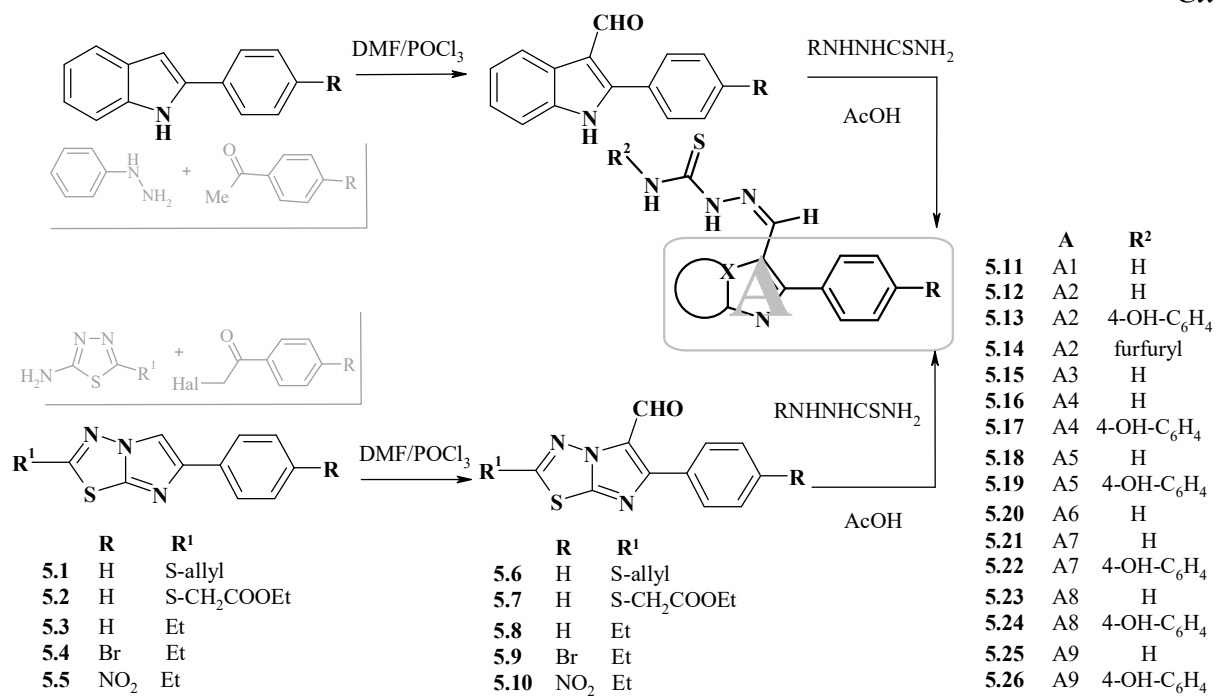


Рис. 2. Сполуки-хіти **4.79** та **4.81** як перспективні протиракові агенти.

Синтез і дослідження біологічної активності тіазолідинон/тіазол-індольних гібридних молекул

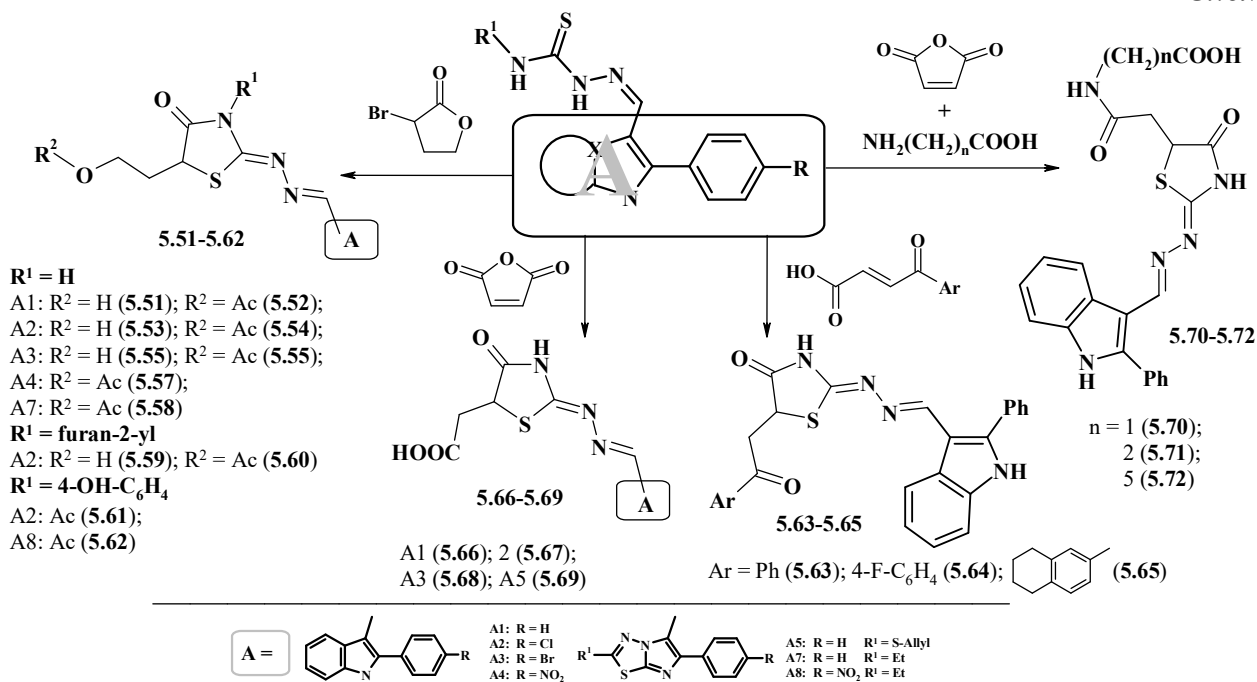
Дизайн потенційних протитрипаносомних гібридних молекул полягав у спрямованому синтезі сполук, що вміщують цикли 4-тіазолідинону/тіазолу та феніл-індольний чи імідазотіадіазольний фрагменти, зв'язані між собою гіdraзинним містком. Ключовою реакцією для одержання цільових сполук була [2+3]-циклоконденсація тіосемікарбазонів 2-арил-1*H*-індол-3- та 6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-карбальдегідів як *S,N*-бінуклеофілів з різноманітними еквівалентами діелектрофільного синтону [C₂]²⁺. Вихідні гетероциклічні альдегіди одержані у реакції Вільсмаєра-Хаака (схема 5).

При взаємодії 2-арил-1*H*-індол-3-карбальдегід-тіосемікарбазонів із галогенокарбоновими кислотами та арилмалеїнамидами в середовищі ацетатної кислоти одержано 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилден)-гідразоно]-тіазолідин-4-они **5.27-5.45** та відповідні *N*-арилацетаміди **5.46-5.50** (схема 6).



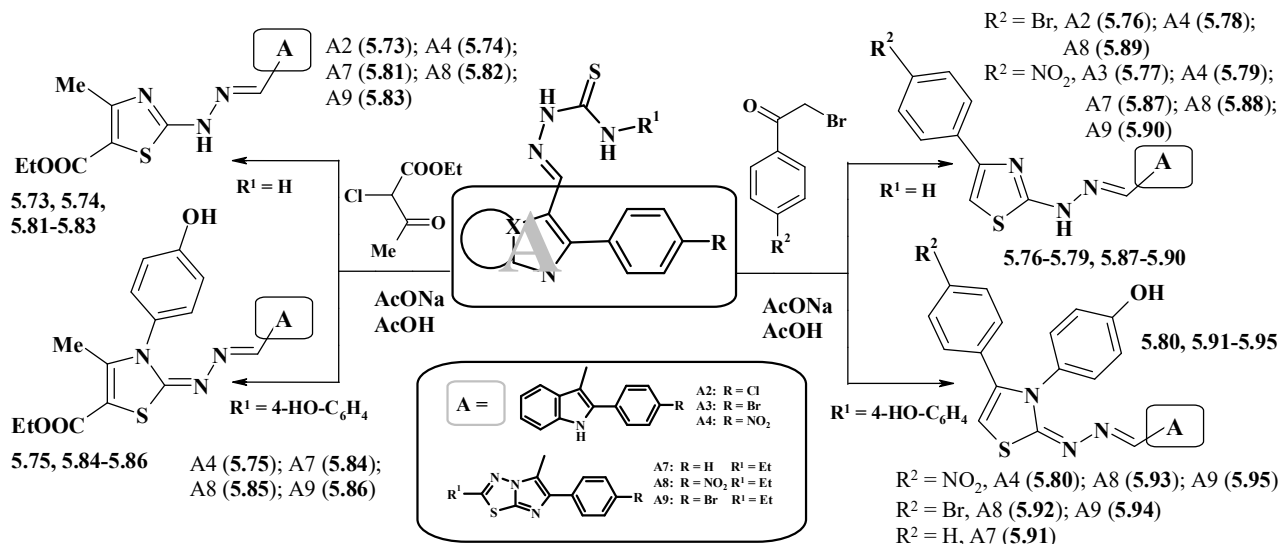
При використанні 2-бромобутиролактону, залежно від середовища реакції, отримано сполуки з вільною (етанол / триетиламін) або ацетильованою (ацетатна кислота / ацетат натрію) гідроксильною групою OH **5.51-5.62**. При взаємодії тіосемікарбазонів із β-ароїлакриловими кислотами та малеїновим ангідридом отримано сполуки **5.63-5.69**. Амінокислотні похідні 5-карбоксиметил-4-тіазолідинону **5.70-5.72** синтезовано в однокомпонентній *in situ* реакції малеїнового ангідриду, відповідної амінокислоти та тіосемікарбазону (схема 7).

Схема 7



Зважаючи на структурну подібність 4-тіазолідинового та тіазольного циклів, в межах субструктурно-орієнтованого диверсифікованого синтетичного підходу, синтезовано ряд етилових естерів 2-{*N'*-[2-(4-феніл)-1*H*-індол-3-ілметилден]-гідразино}-4-метилтіазол-5-карбонових кислот **5.73-5.75** та *N*-(4-фенілтіазол-2-іл)-*N'*-(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилден)-гідразинів **5.76-5.80** при взаємодії тіосемікарбазонів із α -галогенкетонами (схема 8).

Схема 8



З метою дослідження залежності структура-активність у ряді імідазотіадіазольних похідних, в умовах вищенаведеної реакції синтезовано етилові естери 2-[(2-етил-6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилден)-гідразино]-4-метил-2,3-дигідротіазол-5-карбонових кислот **5.81-5.86** та *N*-(2-етил-6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилден)-*N'*-(4-феніл-3*H*-тіазол-2-ілден)-гідразини **5.87-5.95** (схема 8).

Структура **5.29** підтверджена рентгеноструктурним аналізом (рис. 2).

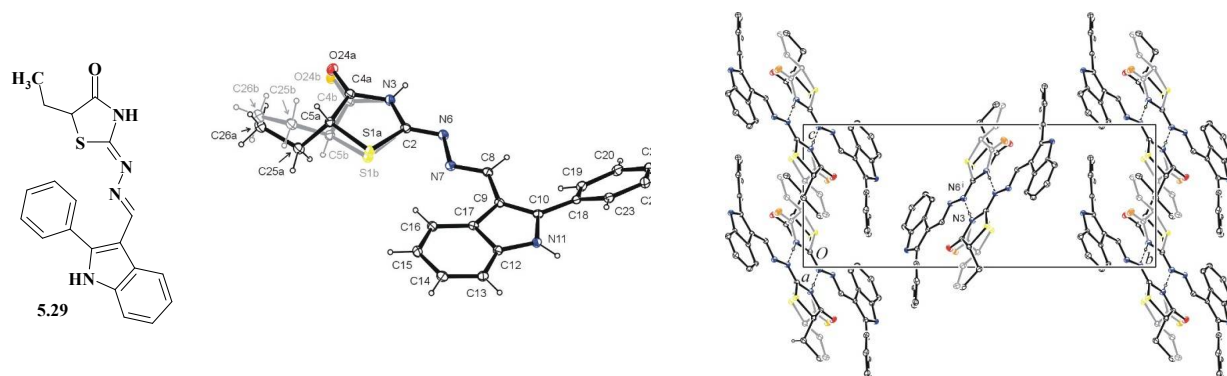
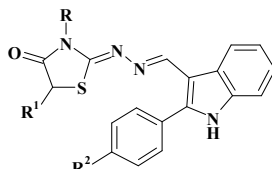


Рис. 2. ORTEP вигляд сполуки **5.29** та її кристалічна ґратка.

Синтезовані тiazолідинон/тiazол-феніліндол/імідазотіадіазольні гібриди досліджувалися на *Tb gambiense* та *Tb brucei*. Одними з найактивніших протитрипаносомних сполук були 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилден)-гідразоно]-тiazолідин-4-они **5.27-5.29**, 2-{[2-(4-хлорофеніл)-1*H*-індол-3-ілметилден]-гідразоно}-3-(4-гідроксифеніл)-тiazолідин-4-они **5.41** і **5.45**, та етиловий естер 2-[2-{[2-(4-хлорофеніл)-1*H*-індол-3-ілметилден]-гідразоно}-3-(4-гідроксифеніл)-4-оксотiazолідин-5-іл]-ацетатної кислоти **5.61**. Наведені гібридні молекули інгібували ріст збудників сонної хвороби у мікро- та субмікромольних концентраціях. Встановлено, що сполуки-хіти характеризувалися низькою цитотоксичністю щодо людських первинних фібробластів (клітинна лінія *AB943*) і, відповідно, високими індексами селективності ($SI > 100$), що є суттєвим аргументом для поглибленого вивчення тiazолідинон/тiazол-феніліндол/імідазотіадіазольних гібридів як потенційних трипаносомних агентів (рис. 3).

	<i>Tbg</i> ,	<i>AB943</i> ,	SI
	IC ₅₀ , μM	IC ₅₀ , μM	
5.28. R=R ² =H, R ¹ =Me	0,21±0,01	28,13	130,8
5.29. R=R ² =H, R ¹ =Et	0,11±0,04	24,83	219,7
5.41. R=4-OH-C ₆ H ₄ , R ¹ =H, R ² =Cl	0,82 ±0,11	>108,5	>131,7
5.61. R=4-OH-C ₆ H ₄ , R ¹ =AcO(CH ₂) ₂ , R ² =Cl	0,38±0,08	>91	>242

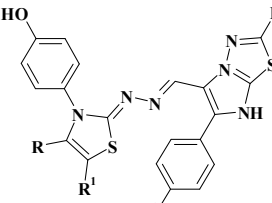
	5.85. R=Me, R ¹ =COOEt, R ³ =Et, R ⁴ =NO ₂	0,64±0,07	86,57	>135,5
5.94. R=4-Br-C ₆ H ₄ , R ¹ =H, R ³ =Et, R ⁴ =Br	0,48±0,07	>73,49	>154,4	
5.95. R=4-NO ₂ -C ₆ H ₄ , R ¹ =H, R ³ =Et, R ⁴ =Br	0,51±0,11	77,34	>151,6	

Рис. 3. Протитрипаносомні тiazолідинон/тiazол-феніліндол/імідазотіадіазоли.

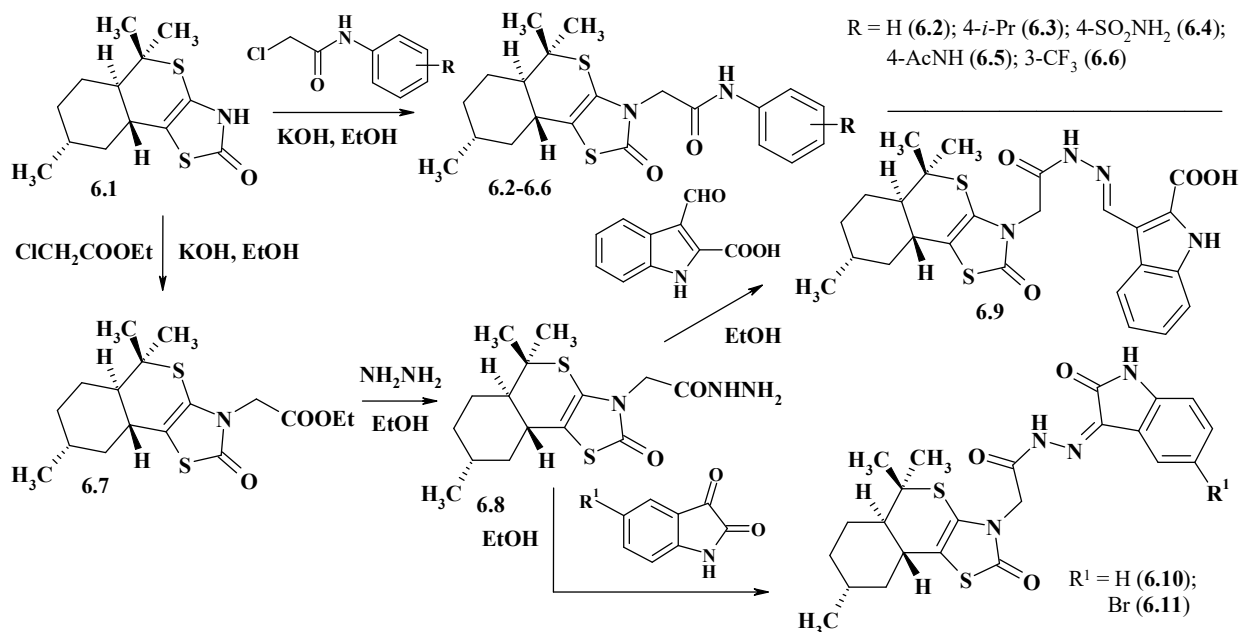
Аналіз взаємозв'язку структура-активність дозволив окреслити наступні закономірності: *i*) наявність фенільного кільця (зв'язаного із індольним) є есенціальною; *ii*) тiazолідин/тiazольні похідні є активнішими, ніж вихідні тіосемікарбазони; *iii*) «малі» замісники у С5 положенні тiazолідинонового циклу є важливими для появи протипаразитарних властивостей; *iv*) не спостерігалось особливих відмінностей активності між похідними тiazолу і 4-тiazолідинону.

Синтез та дослідження конденсованих похідних тіазолідинону та інших поліциклічних гетероциклів

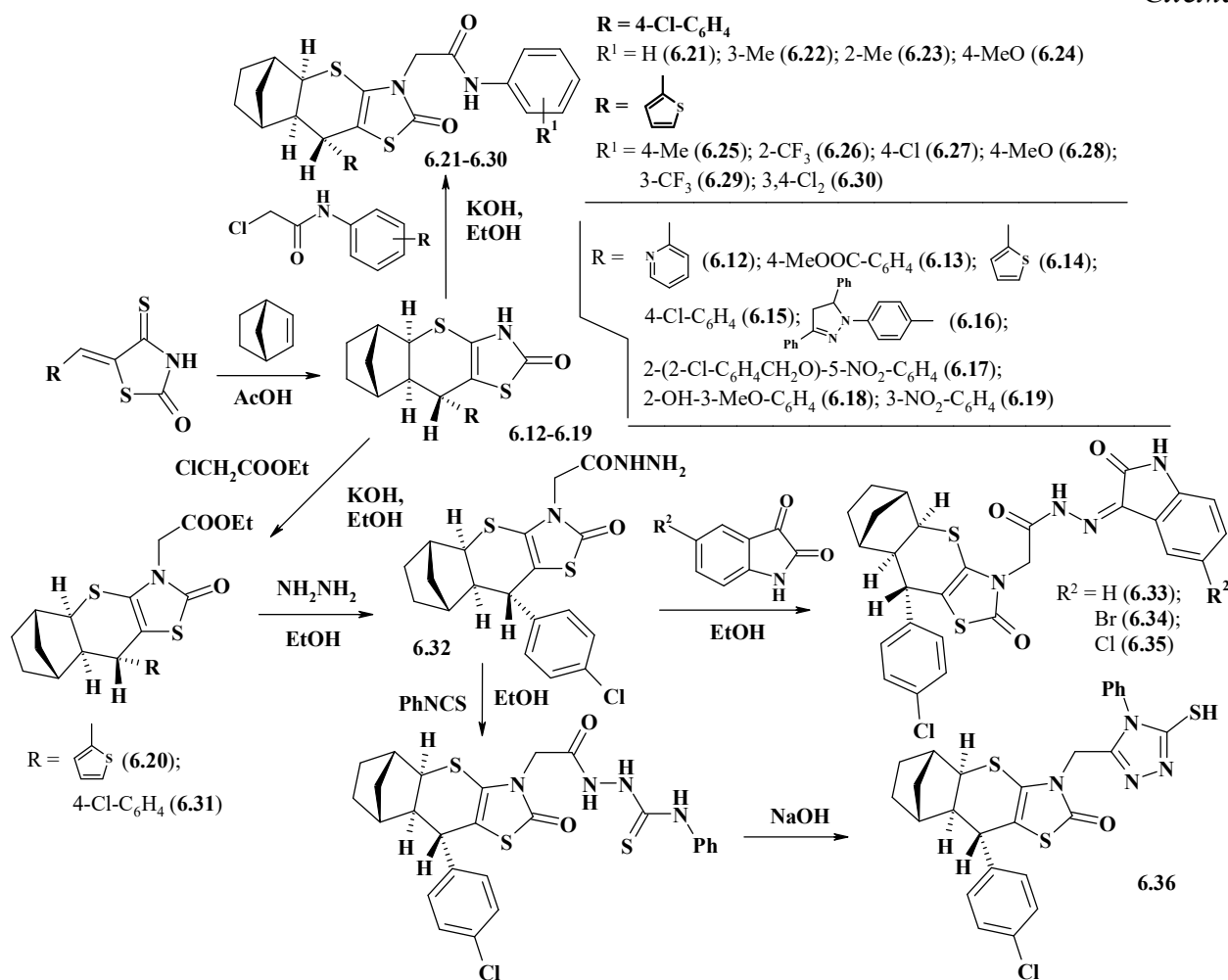
Зважаючи на різну інтерпретацію похідних 4- та 2-тіазолідинону у дизайні ліків, в тому числі як можливих акцепторів Міхаеля, одним із альтернативних напрямків їх розробки є дизайн конденсованих систем, в тому числі ізотіохромено[4a,4-d][1,3]тіазолу **6.1** та 9-R-3,7-дитіа-5-азатетрациклотетрадецен-4(8)-онів-6 **6.12-6.19** (схеми 9, 10), одержання яких запропоновано в нашій лабораторії на основі вивчення реакцій [4+2]-циклоприєднання відповідних похідних ізороданіну та різноманітних дієнофілів (Tetrahedron Lett., 2008, 49, 4648; Bioorg. Med. Chem., 2006, 14, 5230).

З метою диверсифікації бібліотеки ізотіохроменотіазолів алкілюванням одержаного в «доміно» реакції Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера ізотіохромено[4a,4-d][1,3]тіазолу **6.1** хлороацетамідами синтезовано *N*-заміщені похідні **6.2-6.6**. Гібридні молекули **6.9-6.11** з ізатиновим та індолкарбоксильним фрагментами в структурі одержано на основі етилового естеру **6.7** та гідразиду **6.8** (схема 9).

Схема 9

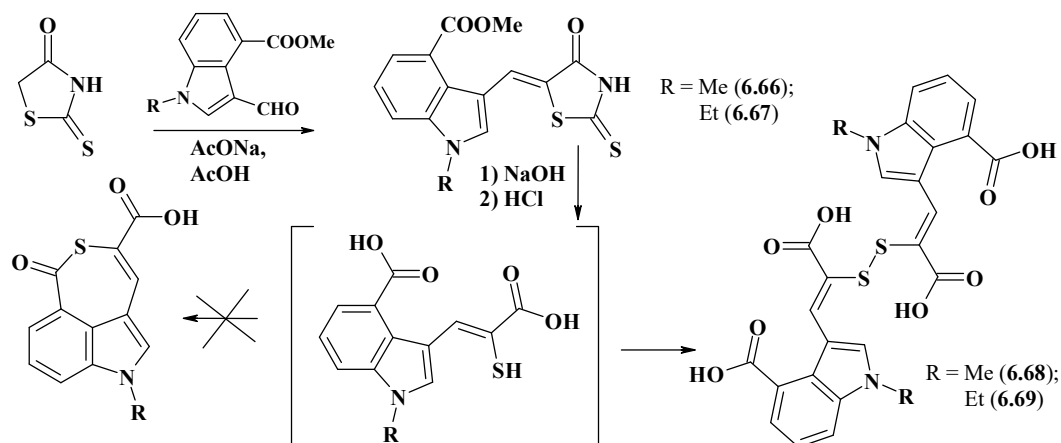
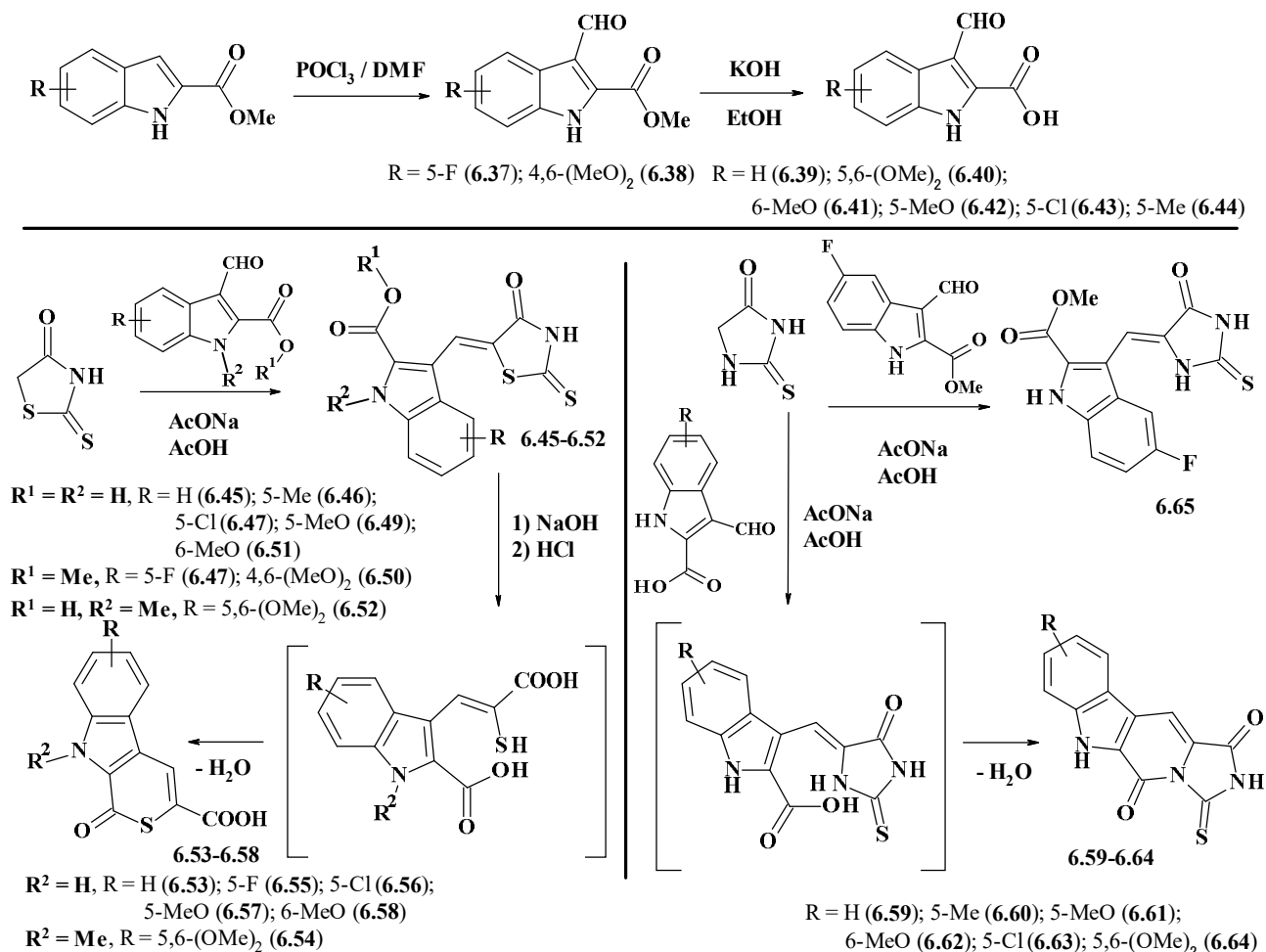


У реакціях алкілювання хлороацетамідами синтезованих 9-R-3,7-дитіа-5-азатетрациклотетрадецен-4(8)-онів-6 **6.14**, **6.15** отримано різноманітні *N*-заміщені похідні **6.21-6.30**. Цільові сполуки **6.33-6.35** синтезовано взаємодією гідразиду **6.32** із відповідним ізатином (середовище - етанол). Крім того, на основі гідразиду **6.32** класичним методом одержано гібридну молекулу з триазольним фрагментом **6.36** через стадію синтезу проміжного ацилтіосемікарбази, який піддавали гетероциклізації дією гідроксиду натрію (схема 10).



Цільові 3-(роданін-5-іл)-1*H*-індол-2-карбоксилати та карбонові кислоти **6.45-6.52** синтезовані в реакції конденсації Кньюенагеля вихідних 3-форміліндолін-2-карбонових кислот **6.39-6.44** та їх метилових естерів **6.37-6.38** із роданіном. В результаті гідролізу сполук **6.45-6.52** одержано 1-оксо-1,9-дигідро-2-тіа-9-аза-флуорен-3-карбонові кислоти **6.53-6.58**. Реакція проходить через стадію формування відповідних тіоакрилових кислот, які спонтанно гетероциклізують з утворенням цільових сполук. Реакція індол-альдегідів **6.38-6.43** з 2-тіоксо-4-імідазолідином (тіогідантоїном) проходить як двостадійний процес, що поєднує реакції Кньюенагеля та спонтанної гетероциклізації по NH групі у положенні 1 базового гетероциклу з утворенням тетрациклічних 1-тіоксодигідропіролокарбазол-3,10-діонів **6.59-6.64**. У той же час, при взаємодії метил-3-форміліндолін-2-карбоксилату **6.37** із тіогідантоїном проходить лише конденсація Кньюенагеля, ймовірно через наявність естерної групи, яка перешкоджає процесу гетероциклізації (схема 11).

Реакції гідролізу метилових естерів 3-(роданін-5-іліденметилен)-1*H*-індол-4-карбонових кислот **6.66** та **6.67** не призвели до утворення можливих сполук із семичленним циклом. Натомість, проходить конкурентна реакція оксидативної димеризації з утворенням енергетично вигідніших біс-аддуктів **6.68** та **6.69**, з'єднаних дисульфідним мостиком (схема 12).



Ізотіохроменотіазоли **6.1-6.6** та 3,7-дитіа-5-азатетрациклотетрадецен-6-они **6.14, 6.15, 6.17, 6.18, 6.24-6.30, 6.35** досліджувалися щодо *Tb brucei*. 3,7-Дитіа-5-азатетрациклотетрадецен-6-они виявили вищу трипаноцидну активність, ніж ізотіохроменотіазоли (за виключенням **6.6** із $\text{IC}_{50} = 2,98 \text{ мкМ}$). Введення *N*-арилацетамідних замісників для 9-*R*-3,7-дитіа-5-азатетрациклотетрадецен-4(8)-онів-6 сприяло їх трипаноцидній дії. У рамках «концепції перепрофілювання» ряд 5-азатетрациклотетрадецен-6-онів досліджувався на протилейкемічну активність (лінії *Dami*, *HL-60*, *Jurkat*, *K562*). Найчутливішою лінією виявилася *HL-60*, найактивнішою – сполука **6.27**. Згідно протоколу NCI лінії лейкемії були також

найчутливішими до дії сполук **6.24** та **6.31**. Загалом, похідні із *n*-хлорофенільним замісником у положенні C9 характеризуються вищим рівнем активності (рис. 5).

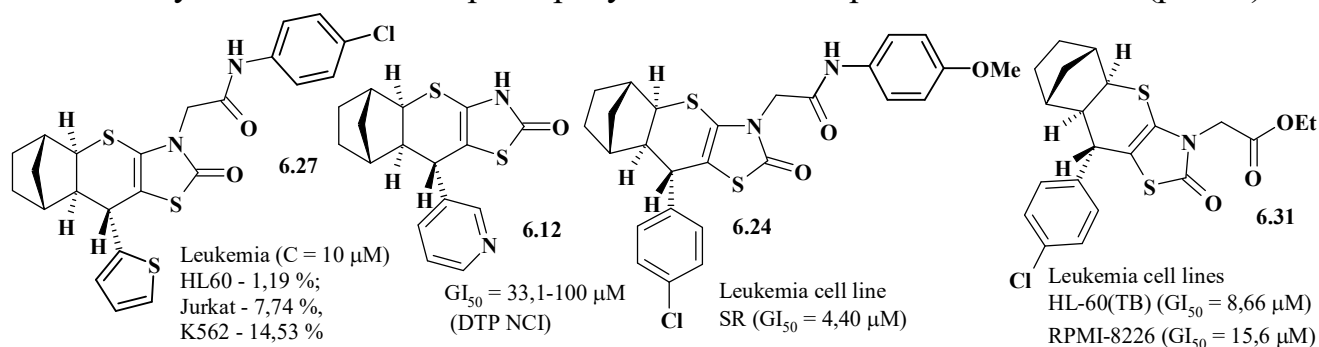


Рис. 5. Протипухлинна активність тіопіранотіазолів з норборнановим фрагментом.

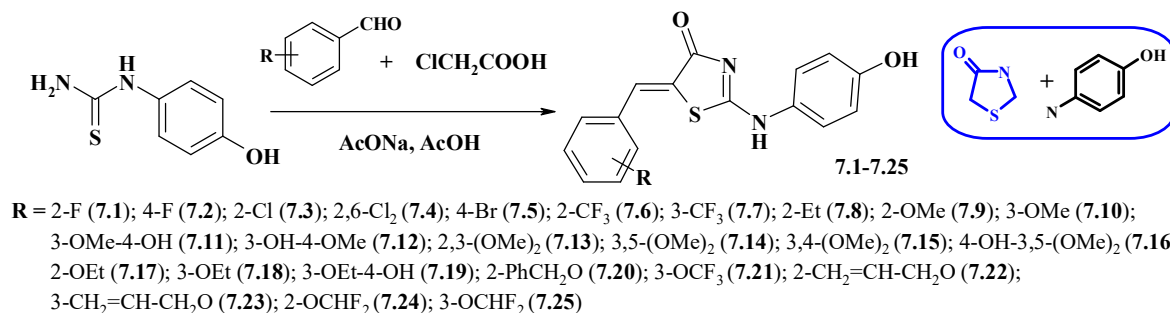
Найактивнішими сполуками в результаті скринінгу протипухлинної активності роданін-індолів та їх конденсованих похідних у концентрації 10^{-5} М були похідні **6.51** та **6.47** (GI% < 80%). Результати дослідження **6.47** у градієнті концентрацій довели її високу протипухлинну активність щодо більшості досліджуваних ракових ліній із середніми значенням інгібуючої концентрації GI₅₀ на рівні 0,649/0,452 мкМ (обчислена у двох експериментах), TGI та LC₅₀ - 42,088/36,471 мкМ та 93,66/91,82 мкМ відповідно. Цікаво, що заміна тіазольного гетероциклу на імідазольний (**6.65**) призвела майже до повної втрати активності, що є важливим фактом для спрямованого дизайну протипухлинних молекул.

Дизайн, синтез та дослідження гібридних молекул, що вміщують індольний цикл, 4-тіазолідинон, 3,5-діарилпіразол та тіопіранотіазольну систему

Для розробки мультитаргетних лікарських засобів, критично важливим є виділення високоефективних вихідних молекул та фрагментів. Метою даного фрагменту роботи був дизайн нових гібридних молекул шляхом поєднання структурних фрагментів 4-тіазолідинону та його конденсованих аналогів з *n*-амінофенольним, а також індольним, піразоліновими та різноманітними [6+5]-гетероциклами.

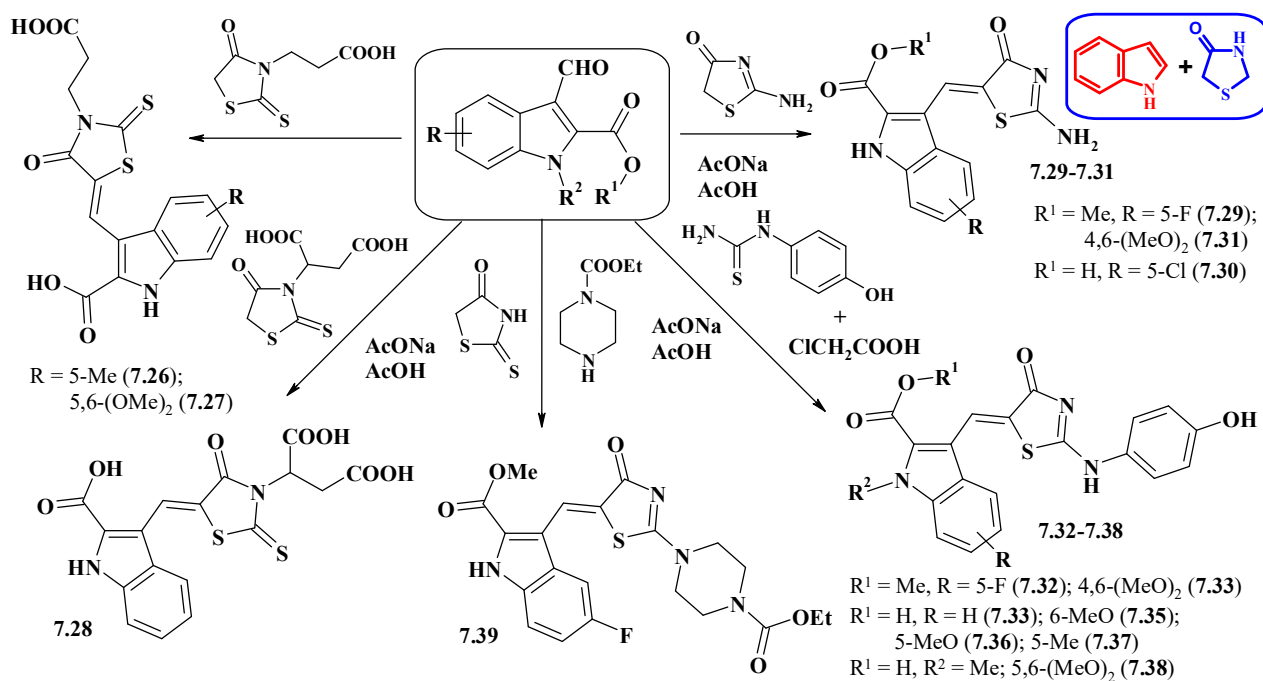
Першим етапом дизайну гібридних молекул став синтез 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів **7.1-7.25** в одnoreакторній реакції арилтіосечовини, хлороацетатної кислоти та відповідного ароматичного аміну в присутності натрію ацетату в середовищі ацетатної кислоти (схема 12).

Схема 12



Виходячи із попередніх результатів вивчення біологічної активності аналогів 3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іл)-1*H*-індол-карбонових кислот з одного боку та тіазолідинон/тіазол-феніліндол/імідазотіадіазольних гібридів з іншого, метою даної частини синтетичних досліджень став синтез гібридних молекул, що вміщують [6+5]-гетероциклічні фрагменти. Останні комбінувалися з фрагментами роданін-3-карбонових кислот, в результаті чого отримано сполуки **7.26-7.28**. Цільові 2-амінотіазол-4(5*H*)-они з фрагментами індол-карбонових кислот синтезовано з використанням трьох підходів: конденсації Кньюенагеля 2-амінотіазол-4(5*H*)-ону з індолкарбальдегідами (**7.29-7.31**), однореакторної трикомпонентною реакції (4-гідроксифеніл)тіосечовини, монохлороацетатної кислоти та відповідної оксосполуки в середовищі ацетатної кислоти (**7.32-7.38**), а також трикомпонентною взаємодією роданіну, *N*-етоксикарбонілпіперазину і відповідного індолкарбальдегіду в середовищі етанолу (**7.39**) (схема 13).

Схема 13



Піразолін-тіазолідинонові гібриди є перспективними протипаразитарними агентами, для яких встановлено мікромольні величини IC_{50} щодо *Tb gambiense*, тому ряд таких гібридних молекул ресинтезовано, зокрема 4-(3-арил-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл)-5*H*-тіазол-2-он **7.40** та його 5-іліден похідні **7.41-7.42**. З метою диверсифікації ряду тіазолідинон-піразолінів, синтезовано низку похідних **7.44-7.51** та **7.52-7.61** у реакції відповідних N3-заміщених 5-етоксиметиліден-роданінів із 3,5-діарил-2-піразолінами **7.44-7.51** (схема 14).

Для розширення ряду малих гібридних молекул на основі роданінового циклу, синтезовано 5-іліденроданін **7.64** та його *N*-похідні із залишками циміналю **7.65-7.69**. Поєднання 3,5-діарил-піразолінового фрагменту та тіопіранотіазольного гетероциклу є одним із шляхів молекулярної оптимізації похідних тіопіранотіазолу. В реакціях алкілювання вихідних тіопіранотіазолів 2-хлоро-1-(3,5-діарил-3,4-дигідропіразол-2-іл)етанонами отримано низку *N*-[2-[3,5-діарил-3,4-дигідропіразол-2-іл]-2-оксоетил]-тіопіранотіазолів **7.74-7.80** (схема 15).

Схема 14

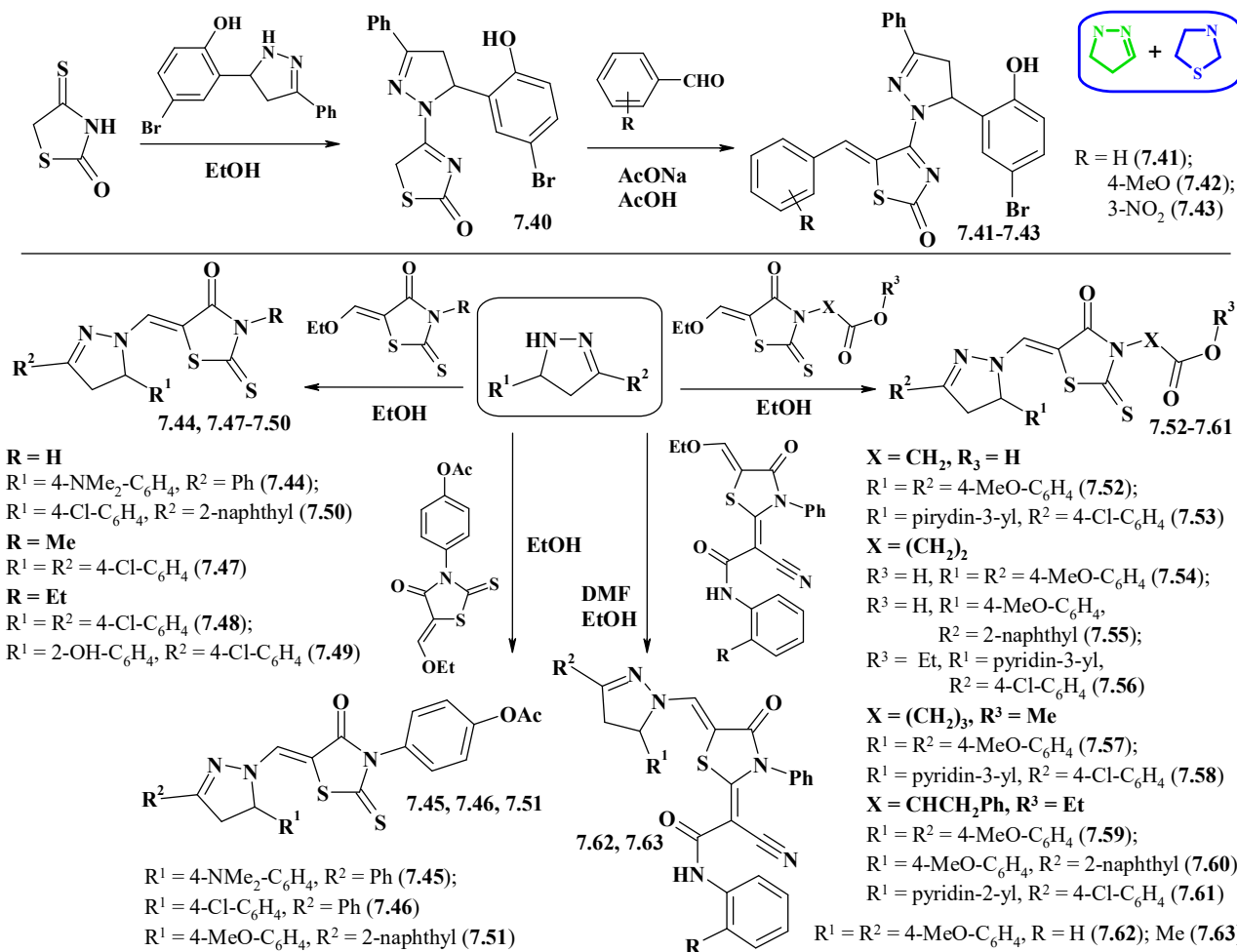
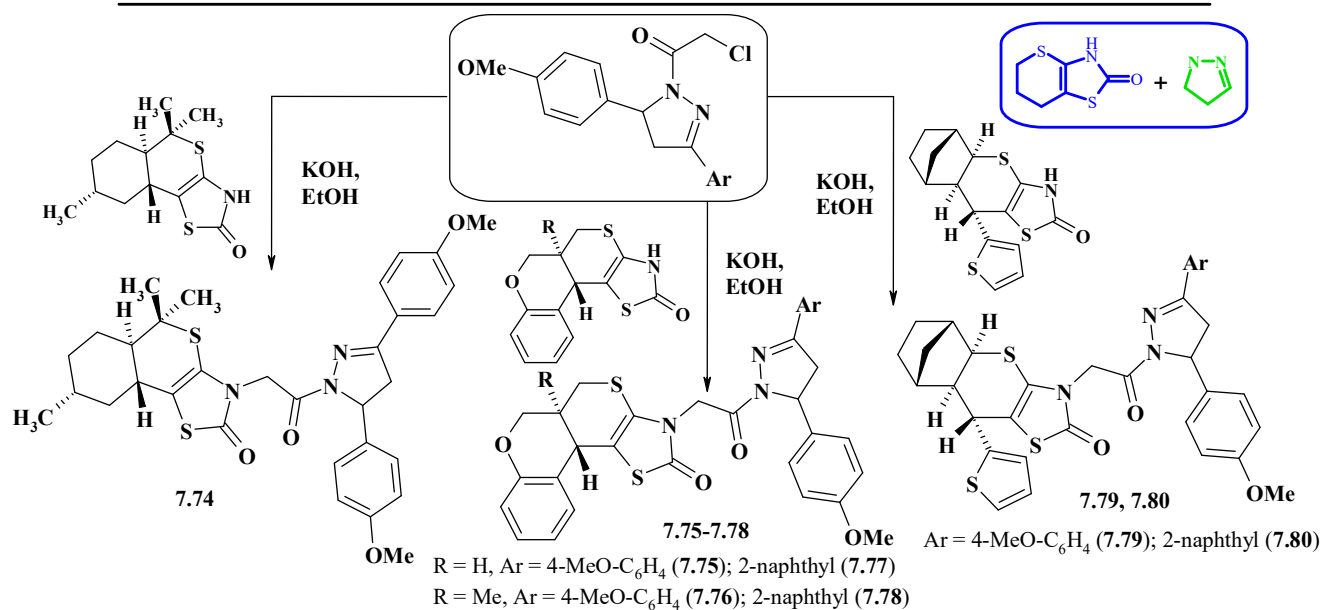
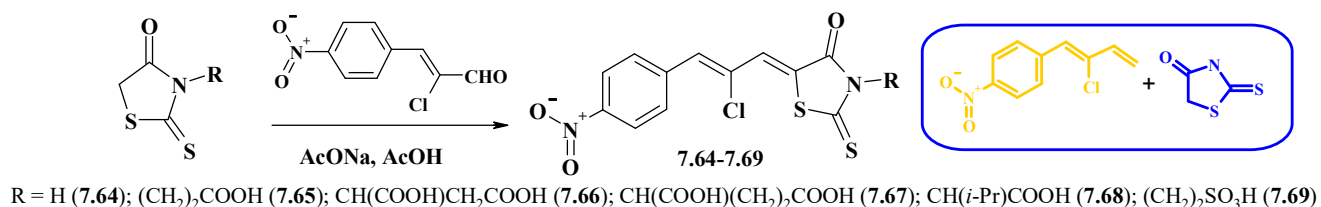
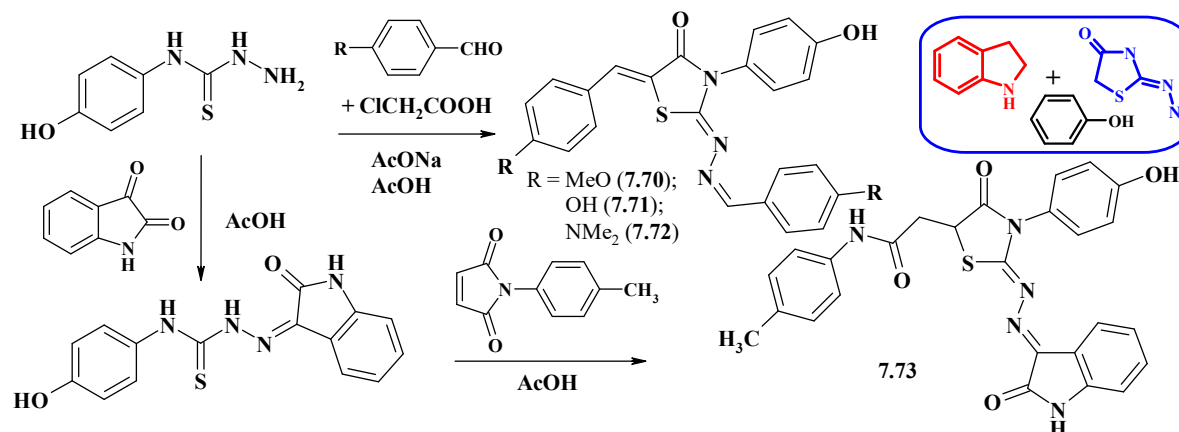


Схема 15



Наступним етапом дослідження була комбінація 2-гідразоно-4-тіазолідинонів із ариліденовими та ізатиновим фрагментами (схема 16). 4-Тіазолідинони **7.70-7.72** синтезовано у трикомпонентній реакції 4-(4-гідроксифеніл)тіосемікарбазиду із відповідними ароматичними альдегідами та хлороацетатною кислотою. Сполука **7.73** одержана [2+3]-циклоконденсацією (*n*-толіл)малеїніміду з 1-(2-оксоіндолін-3-ілден)-4-(4-гідроксифеніл)тіосемікарбазоном в середовищі ацетатної кислоти.

Схема 16



Антипроліферативна активність 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів **7.1-7.25** вивчалася на панелі лейкемічних ліній, в тому числі резистентних до дії таксолу. Ідентифіковано сполуки **7.8, 7.9, 7.17, 7.18, 7.20, 7.22** та **7.23**, що характерні активністю на субмікромольному рівні (рис. 6).

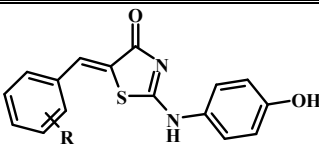
Лінії клітин								Хлорам- буцил
	R, GI ₅₀ , μM							
	7.8 2-Et	7.9 2-OMe	7.17 2-OEt	7.18 3-OEt	7.20 2-BzO	7.22 3-Allo	7.23 2-OCHF ₂	
<i>Ba/F3 parental</i>		0,24±0,14	0,43±0,35					25,6± 14,6
<i>Ba/F3-MPL</i>		0,12±0,04	0,81±0,77					25,6± 14,6
<i>CALR del52</i>								
<i>Ba/F3-MPL</i>		0,10±0,02	0,44±0,35					29,7±16,1
<i>CALR ins5</i>								
<i>Dami</i>	3,74±1,40	0,87±1,18	0,60±0,38		5,57±2,45	0,95±0,66	н/т	12,5± 25,3
<i>HL-60</i>	0,96±0,20				0,50±0,04	0,17±0,01	н/т	
<i>Jurkat</i>	0,44±0,18				0,45±0,12	0,10±0,07	н/т	
<i>K562</i>	0,57±0,08			0,58±0,02	0,40±0,03	0,11±0,01	0,60±0,16	
<i>CCRF-CEM</i>	0,59±0,10			0,36±1,04	0,37±0,02	0,10±0,01	0,36±0,01	
<i>CEM-DNR</i>	н/т			н/т	н/т	н/т	0,56±0,08	
<i>K562-TAX</i>	1,23±0,21			0,75±0,09	0,43±0,06	0,34±0,03	0,75±0,21	
<i>A549</i>							8,84±0,88	
<i>HCT116</i>	0,66±0,05			0,67±0,06	0,53±0,01	0,18±0,02	0,92±0,21	
<i>HCT116 p53-/-</i>	0,90±0,15			0,97±0,14	0,57±0,02	0,22±0,03	0,79±0,19	
<i>U2OS</i>	н/т			0,91±0,18	0,61±0,05	0,22±0,03	0,71±0,11	
<i>BJ</i>	>50			42,4±6,3	34,0±8,2	34,1±7,6	40,7±9,8	
<i>MRC5</i>	50,00						20,8±6,4	
Діапазон <i>SI</i>	13.4- 75.8	57.5- 500.0	61.7- 116.3	43.7- 117.8	6.10- 68.0	35.9- 341.0	2.35- 57.8	

Рис. 6. Антипроліферативна дія 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів.

Логічним продовженням досліджень стало вивчення протиракової активності гібридних молекул **7.27**, **7.29**, **7.30**, **7.32** та **7.33**, структура яких сформована 2-аміно-4-тіазолідиноновим і [6+5]-гетероциклічними фрагментами (фармакофор сполуки-лідера **6.47**). На загальному фоні низької чутливості ліній до вказаних сполук слід відмітити вплив 5-флюоро-3-[2-(4-гідроксіаніліно)-4-оксотіазол-5-іліден]метил-1*H*-індол-2-карбоксилату **7.32** на лінію промієлоцитарного лейкозу людини (*HL-60*) при $IC_{50} = 9,39$ мкМ. Цікаво, що найчутливішими до дії **7.32** у концентрації 10 мкМ (відповідно до протоколу NCI) були також клітинні лінії лейкемії.

Серед ідентифікованих сполук-хітів заслуговує на увагу піразолін-тіазолідинон **7.40**, для якого встановлено субмікромольний рівень GI_{50} до 47% тестованих ліній, серед яких найбільш чутливою виявилась лінія лейкемії *SR* ($GI_{50} = 0,0351$ мкМ). Гібридизація піразолінового та тіазолідинового циклів не тільки сприяє протираковому ефекту, а й підвищує протипаразитарну активність. Так, сполука **7.40** інгібувала ріст *Tb brucei* на 98,8 % у концентрації 10 мкг/мл.

Протиракову дію серії 5-(3,5-діарилпіразоліл)-роданінів **7.44-7.51** та роданін-3-карбонових кислот із 2-хлоро-3-(4-нітрофеніл)проп-2-еніліденовим (циміналевім) фрагментом **7.64-7.69** досліджено на лініях раку шлунку *AGS*, товстої кишки людини *DLD-1* та карциноми молочної залози *MCF-7*. Лінія колоректального раку *DLD-1* була найменш чутливою до дії даних сполук. Загалом, 2-хлоро-3-(4-нітрофеніл)проп-2-еніліденовий фрагмент у *C5* положенні тіазолідинону позитивно впливав на антипроліферативні властивості. Так, сполуки **7.64-7.69** характеризувалися нижчими значеннями GI_{50} , ніж піразолін-тіазолідиноні аналоги **7.44-7.51**.

Враховуючи подібність деяких біо-мішеней паразитів роду кінетопластид, сполуки із протитрипаносомною активністю можуть виявляти протилейшманіозну дію. Тому представники різних груп одержаних трипаноцидів досліджувалися на промастиготній формі *Leishmania major*. Цікаво, що найактивнішими виявились тіазолідинон/тіазол-феніліндольні гібридні молекули із естерною (**5.52**, **5.73**, **5.74**) чи гідроксиетильною групами (**5.53**) у *C5* положенні базового гетероциклу. Сполуки-хіти **5.27-5.29** характеризувалися найнижчими значеннями IC_{50} , що корелює із їх трипаноцидною дією і опосередковано свідчить про подібні механізми реалізації протипаразитарної активності щодо трипаносом та лейшманій (рис. 7).

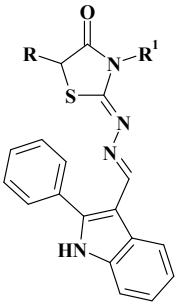
		GI_{50} , μM					TI <i>Tbg</i> / TI <i>L major</i>
		<i>Tbb</i>	<i>Tbg</i>	<i>L major</i>	<i>BJ</i>	<i>MRC5</i>	
	5.27 R = H		0,23±0,01	1,73±0,22	>50	>50	>217,39 / >29,07
	5.28 R = Me		0,21±0,01	1,01±0,13	>50	>50	>238.10 / >48,08
	5.29 R = Et	0,03±0,01	0,11±0,04	1,12±0,23	>50	>50	>454.54/ >44,64
	5.52 R = AcO(CH ₂) ₂	0,06±0,01	0,23±0,01	3,51±0,71	37,05± 5,45	42,76± 6,48	173,50 / 11,34

Рис. 7. Антилейшманіозна та протитрипаносомна активність сполук-хітів.

5-Ариліден-2-ариліденгідразоно-3-(4-гідроксифеніл)-4-тіазолідинони **7.70-7.73** інгібували ріст плазмодіїв *Plasmodium falciparum* (штам *FcB1/colombia*) у концентрації 10 мг/мл більше ніж на 80%, а значення концентрацій IC_{50} знаходилися в межах 2,32-7,01 мкМ. Отримані дані підтверджують факт різнопланової протипаразитарної активності похідних 2-гідразоно-4-тіазолідинону.

Розробка QSAR- та фармакофорних моделей для прогнозування протипаразитарної активності різноманітних тіазолідинонів. Поглиблене дослідження механізмів реалізації фармакологічних ефектів сполук-хітів

З метою встановлення об'єктивних закономірностей структура – протитрипаносомна активність похідних 5-єнаміно-роданін-3-карбонових кислот, тіопіранотіазолів та тіазол/тіазолідинон-феніліндол/імідазотіадіазольних гібридів проведено QSAR-аналіз. При цьому порівнювалася ефективність 4 сучасних алгоритмів машинного навчання, а саме методів *Random Forest*, *стохастичного підвищення градієнта* (Stochastic Gradient Boosting, SGB), *сплайнів багатовимірної адаптивної регресії* (Multivariate Adaptive Regression Splines, MARS) та *регресії Гаусівських процесів* (Gaussian Processes regression).

Для підвищення прогностичної здатності обчислюваних QSAR-моделей, до вибірки включено похідні піразоліну із протипаразитарною дією *in-house* бібліотеки (Eur. J. Med. Chem., 2013, 66, 228; Eur. J. Med. Chem., 2014, 85, 245). Для підвищення ефективності моделей, здійснено вибір дескрипторів на основі методу *Random Forest* за допомогою пакету «Boruta», що дозволило зменшити кількість дескрипторів із підтвердженим або орієнтовним впливом на протитрипаносомну дію з 774 до 32. Алгоритм *Random Forest* показав найкращу стабільність ($Q^2_{cv}=0,526$), тоді як *регресія Гаусівських процесів* перевищує інші методи у прогнозуючій здатності ($Q^2_{ext}=0,830$) (табл. 1). Аналіз впливу дескрипторів у QSAR-моделях дозволив виділити ряд взаємозв'язків структура-активність: i) наявність фенільних кілець з електроноакцепторними атомами або групами у *пара*-положенні, ii) збільшена кількість ароматичних кілець, iii) висока розгалуженість, але короткі ланцюги, iv) висока енергія НОМО та v) введення 1-заміщеного індолільного фрагменту у молекули є передумовами високої протитрипаносомної активності.

Таблиця 1

Параметри налаштування та прогнозуючої здатності QSAR-моделей на основі вибору дескрипторів методом «Boruta»

Параметри налаштування	<i>Random Forest</i>	<i>SGB</i> ntree = 90, глибина взаємодії = 2, стиснення=0,07	<i>MARS</i> nprune = 15, degree = 1	<i>Gaussian processes regression</i> lambda = 0,08
R^2	0,855	0,752	0,583	0,797
Q^2_{cv}	0,526	0,469	0,318	0,464
Q^2_{ext}	0,812	0,483	0,461	0,830

Наступним етапом оцінки біологічного потенціалу досліджуваних похідних стало вивчення цитотоксичності сполук-хітів **5.27**, **5.28**, **6.47**, **7.32** та **7.40** на мишачих фібробластах *Balb/c3T3* та клітинах гепатоцелюлярної карциноми *HepG2* людини (рис. 8). Дослідження проводилося у чотирьох біохімічних експериментах: мітохондріальної (MTT-тест) та лізосомальної (NRU-аналіз) активності клітин, дослідження загального вмісту білку (аналіз TPC) та цілісності клітинної мембрани (аналіз LDH) після 24, 48 та 72 год експозиції.

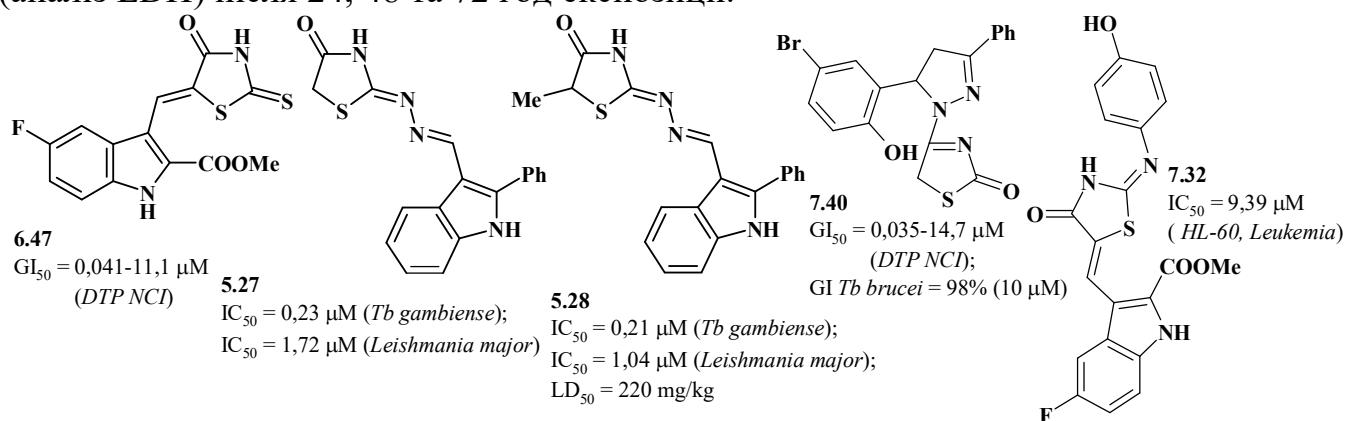


Рис. 8. Сполуки-хіти із високою протипухлинною та/або протипаразитарною активністю відібрані для поглибленого вивчення цитотоксичності.

У результаті досліджень встановлено, що псевдонормальні клітини менш чутливі до дії сполуки **6.47**, ніж пухлинні (рис. 9). Найвищі значення індексів селективності (SI) на лінії *HepG2* були отримані у LDG-тесті, причому цей ефект посилювався із часом експозиції і був вищим, ніж для цисплатину. Зважаючи на високу активність **6.47**, проведено додаткове вивчення її антипроліферативних властивостей у MTT тесті на клітинах карциноми різного тканинного генезу: молочної залози (*MCF-7*), прямої кишки (*HCT116*), шийки матки (*HeLa*) та легень (*A549*), а також лінії псевдонормальних клітин (кератиноцитів *HaCaT* людини). Найвищий ефект спостерігався щодо ліній раку молочної залози (CC₅₀ = 0,60±0,02 мкМ) та прямої кишки (CC₅₀ = 0,70±0,04 мкМ).

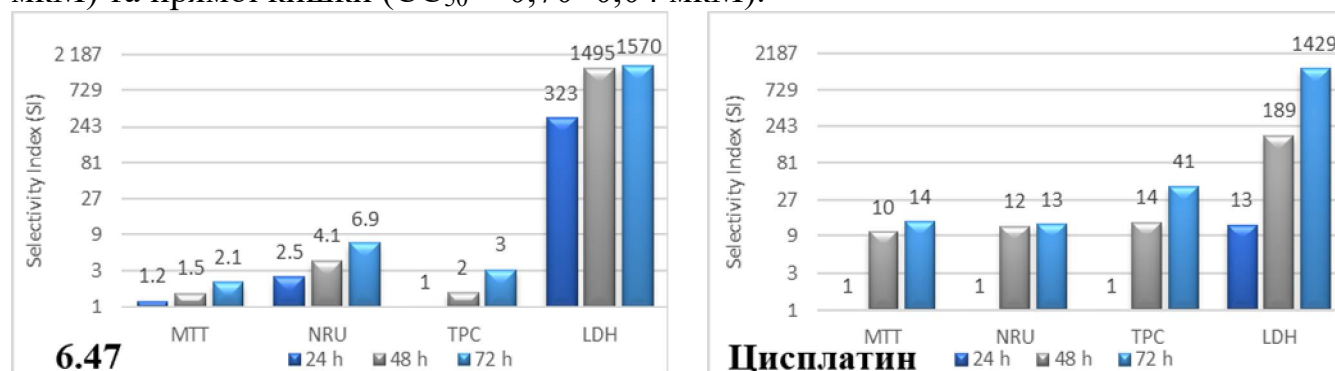


Рис. 9. Індеси селективності (SI) обчислені для сполуки **6.47** та препарату порівняння цисплатину щодо клітин *HepG2*.

З метою дослідження молекулярних механізмів протипухлинної дії сполуки **6.47** проведено вивчення її впливу на каспазу 3 та PARP1 протеїн. На фоні **6.47** у клітинах *HepG2* спостерігалася активація каспази 3 шляхом розщеплення неактивної

форми прокаспаси 3. Крім того, сполука подібно до доксорубіцину спричиняла розщеплення PARP1 (полі[АДФ-рибозо]полімерази 1), білка залученого у репарації ДНК. Каспаза 3 є одним із ключових регуляторів апоптичного шляху клітинної смерті, а також сигнальних шляхів запалення. Протеїн PARP1 бере участь у репарації ДНК і є субстратом для каспазного розщеплення. Таким чином, розщеплення каспази 3 та PARP1 пов'язане з пошкодженням ДНК клітин-мішеней.

Сполука **6.47** індукувала апоптоз у *HepG2* клітинах через каспаз 3-, полі[АДФ-рибозо]полімеразо 1 та Вах-протеїн-залежні шляхи. Рівень фосфорильованої p44/42 MAPK мітоген-активної протеїнкінази (Erk1/2) не відрізнявся від контрольної групи *HepG2* клітин. Під дією **6.47** спостерігалось підвищення рівня Вах протеїну та циклін-залежної кінрази Cdk2, проте сполука не індукувала зміни рівнів фосфорильованої чек-поінт кінрази Chk2 та фосфорильованих білків Rb (рис. 10).

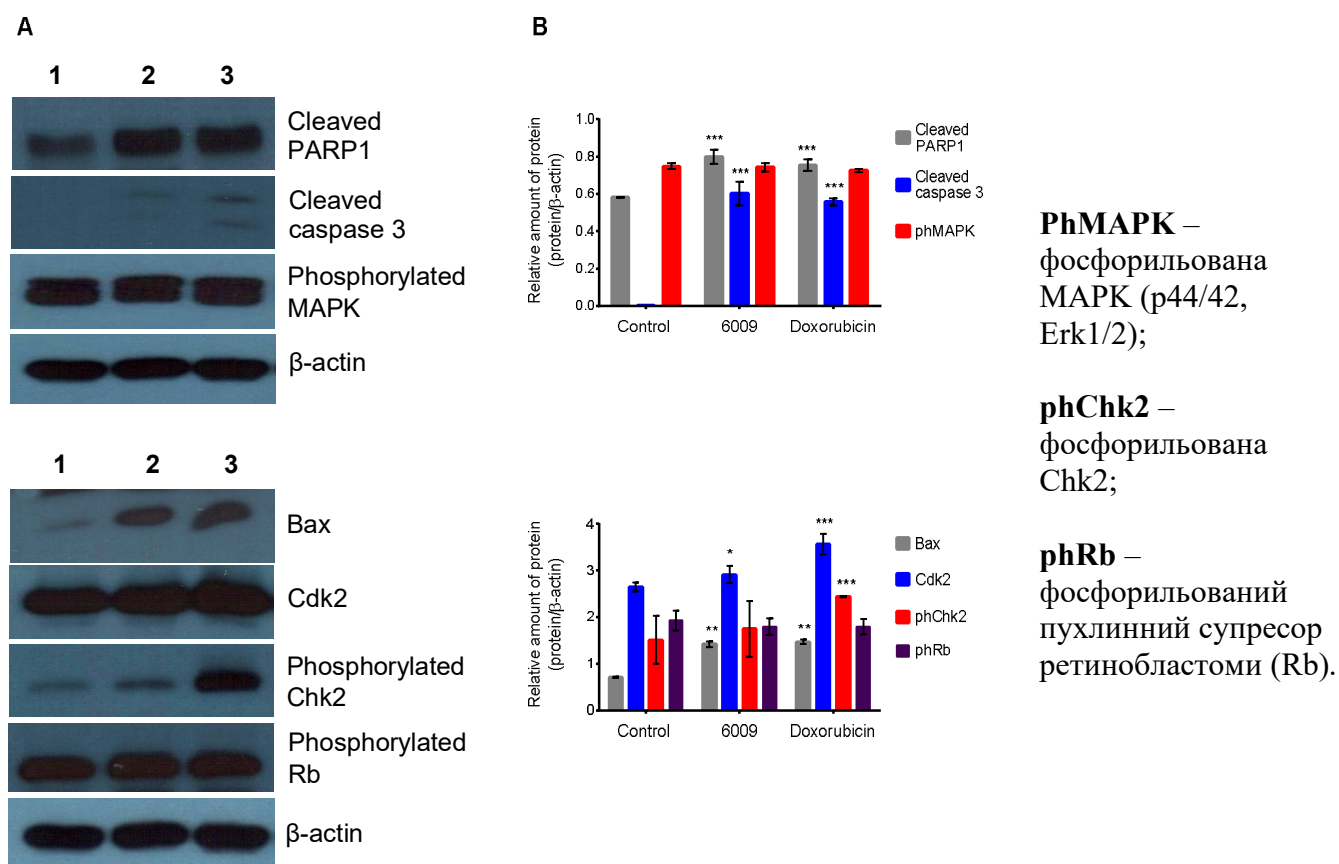


Рис. 10. Ефекти **6.47** та доксорубіцину на рівні проапоптичних білків та білків, що регулюють клітинний цикл у *HepG2*: Вестерн-блот аналіз протеїнів (А); денситометрія вмісту білків (В). Експозиція сполуки 24 год; 1 – контроль (клітини без **6.47**), 2 – клітини з **6.47** (45,0 мкМ), 3 – дія доксорубіцину (1,6 мкМ).

Методом ДНК-комет в лужному середовищі досліджено вплив сполуки **6.47** на пошкодження ДНК у клітинах *HepG2* (представлено як відсоток пошкодження ДНК у хвості комети та *olive tail moment* чи «момент оливкового хвоста» у клітинах із досліджуваною сполукою). Сполука **6.47** індукує значне збільшення ДНК у «хвості» комети у клітинах *HepG2* (рис. 11) та спричиняє пошкодження ДНК у клітинах *HepG2* (ДНК у «хвості» = 26,2%, *Olive tail moment* = 13,2) порівняно із контрольними клітинами (ДНК у «хвості» = 5,76%, ОТМ (*Olive tail moment*) = 1,55).

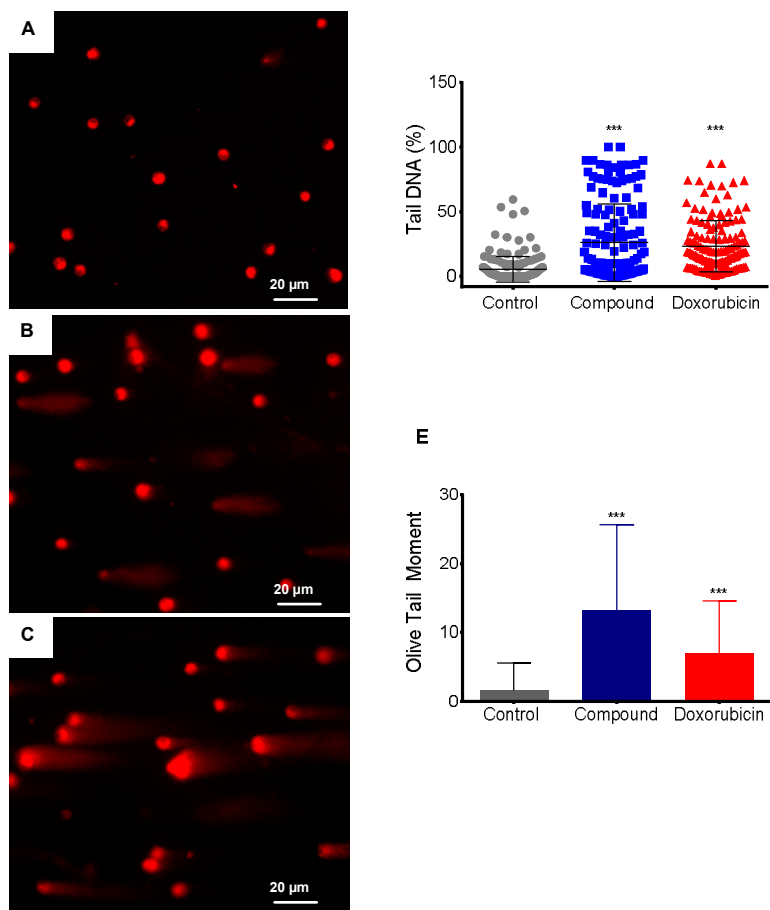


Рис. 11. Дані аналізу ДНК-комет для визначення пошкодження ДНК у клітинах *HepG2* із додаванням сполуки **6.47** та доксорубіцину.

Знімок комет у контролі (А);

Знімок комет після експозиції **6.47** у концентрації 45,0 мкМ (В);

Додавання доксорубіцину (1,6 мкМ) (С);

Відсоток ДНК у хвості комет (D);

«Момент оливкового хвоста» (*olive tail moment*) (E).

Для високоактивних трипаноцидів 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметил)-гідразон]-тіазолідин-4-онів **5.27** та **5.28** вивчалася цитотоксичність на клітинах гепатоцелюлярної карциноми *HepG2* та нормальних клітинах *Balb/c 3T3*. Чутливість клітин *HepG2* до дії **5.27**, як і **5.28** була вищою, ніж нормальних *Balb/c 3T3* фібробластів. Антипроліферативна активність **5.27** виявлялася на 24 год при концентрації 0,0001 мкМ, тоді як токсичний вплив на псевдонормальні клітини спостерігався при вищій концентрації – 0,1 мкМ (рис. 12). Найнижчі наномолярні цитотоксичні концентрації **5.27** та **5.28** щодо *HepG2* обчислено в LDH тесті незалежно від часу експозиції, що свідчить про пошкодження клітинної стінки та наступних біохімічних порушеннях в пухлинних клітинах.

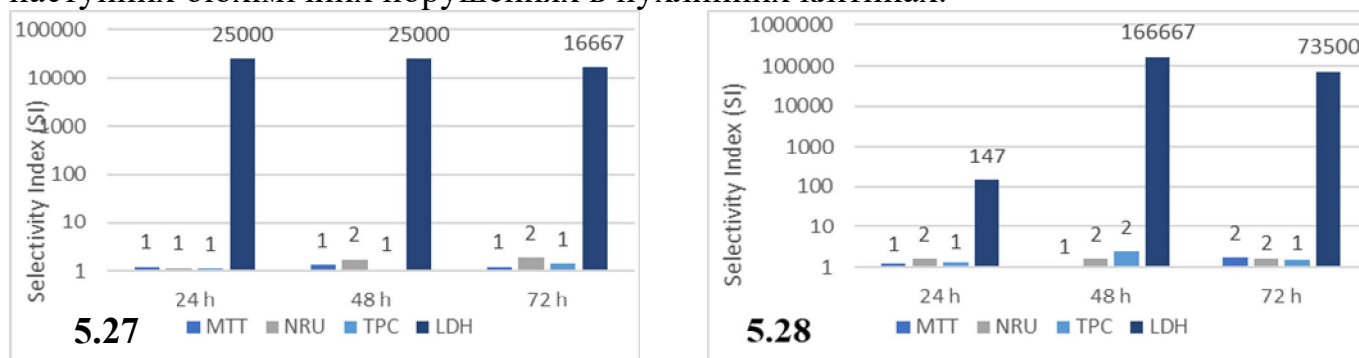


Рис. 12. Індеси селективності (SI) для сполук **5.27** і **5.28** щодо клітин *HepG2*.

Антипроліферативна активність (24 год інкубації) 5-флюоро-3-{[2-(4-гідроксифеніл)іміно-4-оксотіазолідин-5-іліден]метил}-1*H*-індол-2-карбоксилату **7.32**

відзначена у концентрації 0,0001 мкМ, а токсичний вплив на псевдонормальні клітини – при 0,1 мкМ (рис. 13). 4-[3-(5-Бromo-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5H-тіазол-2-он **7.40** показав високу протипухлинну дію, а також інгібував ріст *Tb brucei*. Важливо відзначити високу протипухлинну активність сполуки (рис. 12) на 24 год експозиції при GI_{50} 0,00001 мкМ та цитотоксичність щодо нормальних фібробластів на рівні 0,001 мкМ. Цитотоксичність **7.40** реалізувалася шляхом інгібування мітохондріальних функцій.

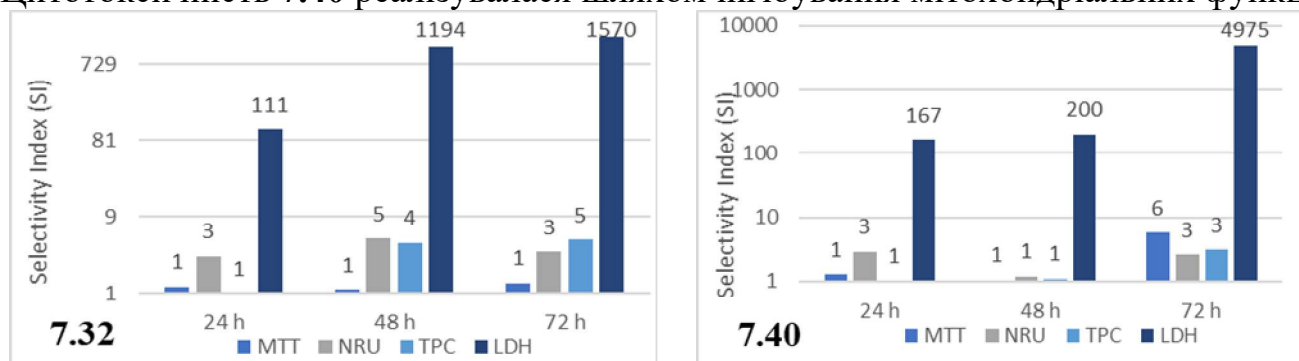


Рис. 13. Індеси селективності (SI) похідних **7.32** і **7.40** щодо клітин *HepG2*.

Для поглибленого вивчення механізмів активності протипухлинної сполуки-лідера **7.32** проведено дослідження впливу на цитохром-залежну детоксикацію (лінія *3T3-L1*). Після 24 год експозиції **7.32** у концентраціях 100 нМ, 1 та 10 мкМ, сполука не спричиняла значного відновлення резазурину та не впливала на активність каспази-3 (рис. 14а), що свідчить про нетоксичність та відсутність ініціювання апоптозу у нормальних фібробластах. При вивченні впливу **7.32** на AhR рецептор та експресію генів *Cyp1a1*, *Cyp1b1* мРНК (β -нафтофлавіон (β NF) як агоніст AhR рецептора був позитивним контролем) у клітинах *3T3-L1* встановлено, що сполука-лідер знижує експресію мРНК тільки AhR рецептора (рис. 14б).

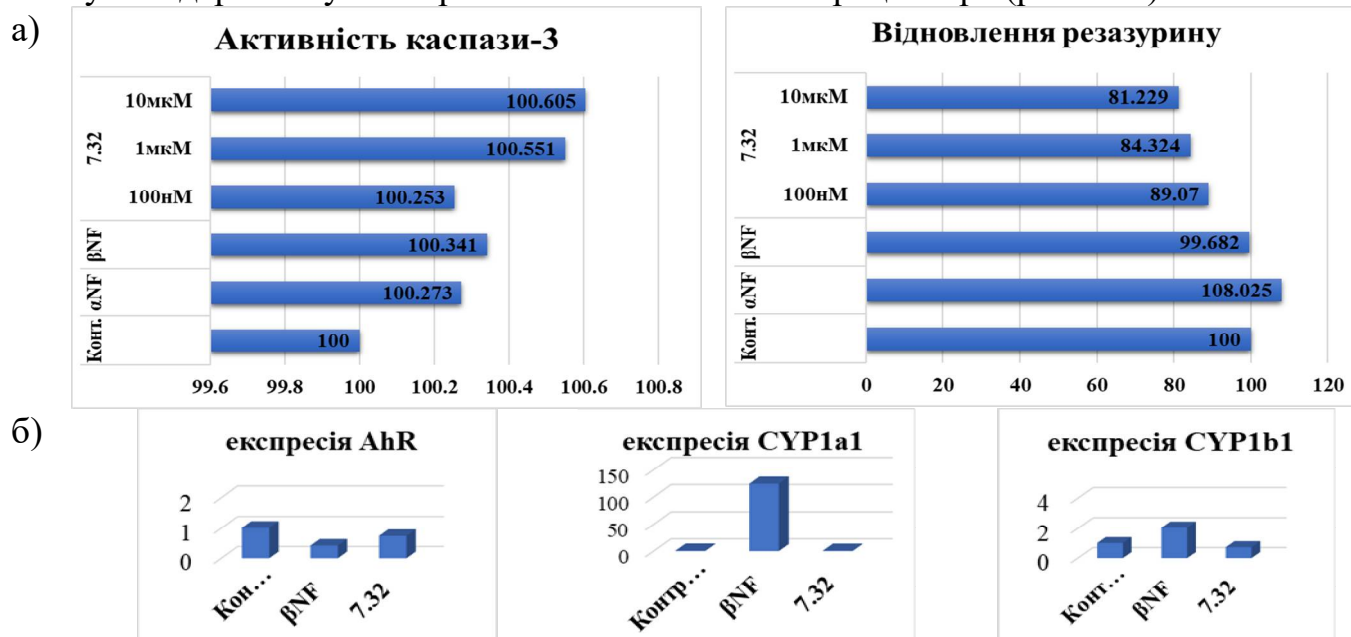


Рис. 14. а) вплив **7.32** на відновлення резазурину та активність каспази-3; б) вплив **7.32** (1 мкМ) і β -нафтофлавіону (1 мкМ) на експресію мРНК AhR, *Cyp1a1* та *Cyp1b1* генів (експозиція протягом 6 год) на *3T3-L1* фібробластах.

Для високоактивних 5-іліден-3-(1-арилпіролідін-2,5-діон)-роданінів **4.67**, **4.79** та **4.81** вивчено вплив на ДНК методом електрофорезу плазмідної ДНК у концентраціях 0,1, 1 та 10 мкМ; сполуки не затримували рух плазмідної ДНК, що свідчить про відсутність прямого впливу на ДНК (рис. 15а). На противагу цьому, у методі ДНК-комет в лужному середовищі на клітинах лінії лейкемії *Jurkat* сполуки **4.67**, **4.79** і **4.81** впливали на ДНК, що свідчить про непрямий вплив на ДНК; найвищий відсоток ДНК у хвості комети виявлено для **4.81** - 53,38% (концентрація 1,5 мкМ, що відповідає IC_{50}), трохи нижчий – при дії **4.79** (3,5 мкМ) і найменший – за дії **4.67** (55 мкМ), що є співмірно з ефектом доксорубіцину (рис. 15б).

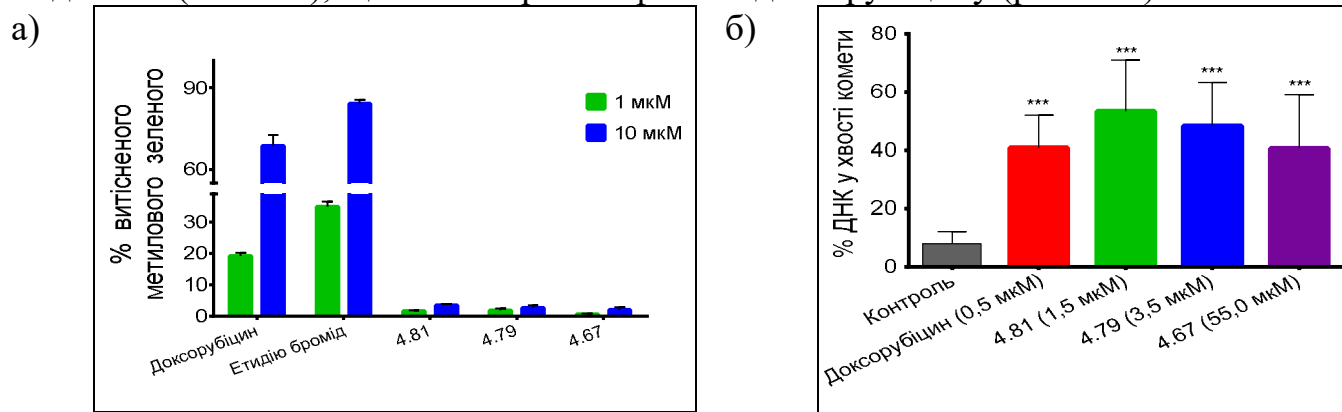


Рис. 15. а) Заміщення метилового зеленого із комплексу ДНК-метиловий зелений; б) кількісне пошкодження ДНК (хвіст ДНК, %) похідними **4.67**, **4.79** та **4.81**.

Враховуючи *in silico* дані попередньої оцінки можливого механізму дії протиракових 4-тіазолідинонів, вивчено вплив високоактивних 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5H)-онів *in vitro* в концентрації 10 мкМ на полімеризацію тубуліну. Сполуки **7.8**, **7.20**, **7.22** та **7.24** володіли інгібуючою активністю на рівні з еталонним препаратом нокодазолом, тоді як **7.18** та **7.23** показали вищий рівень інгібування (рис. 16). На рис. 17 представлено ймовірне зв'язування сполук **7.23** та **7.24** із тубуліном (PDB ID: 4O2B).

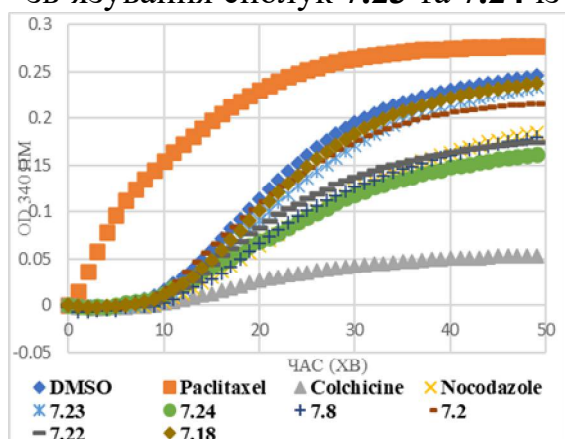


Рис. 16. Вплив на полімеризацію тубуліну *in vitro*.

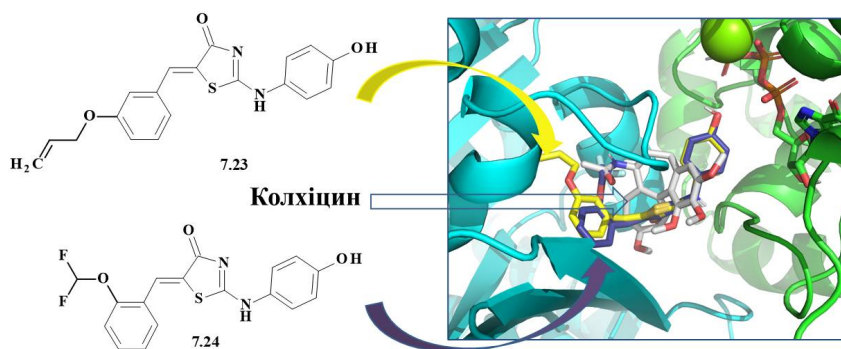


Рис. 17. Візуалізація зв'язування сполук **7.23** та **7.24** із тубуліном (PDB:4O2B).

Крім того, *in silico* методи встановлення ймовірних механізмів дії сполук-хітів включали розробку фармакофорних моделей на снові лігандів CA074 до Cathepsin B

із *T. brucei* (PDB ID: 3HHI) та лігандів до протеїнів MCL-1 із Bcl-2 родини (pdb ID: 6FS1 та 6FS2). Тіазолідинон/тіазол-феніліндольні гібриди **5.27**, **5.28**, **5.41**, **5.43** виявились сумісними із фармакофорною моделлю за 5-ма ознаками, сполука **5.73** – за 6-ма ознаками (рис. 18а). 3-(4-Оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметилден)-1*H*-індол-карбонові кислоти **6.53** та **7.32** відповідали фармакофорній моделі на основі лігандів до 6FS1 та 6FS2 за 7-ма ознаками, а **6.47** – за 6-ма (рис. 18б).

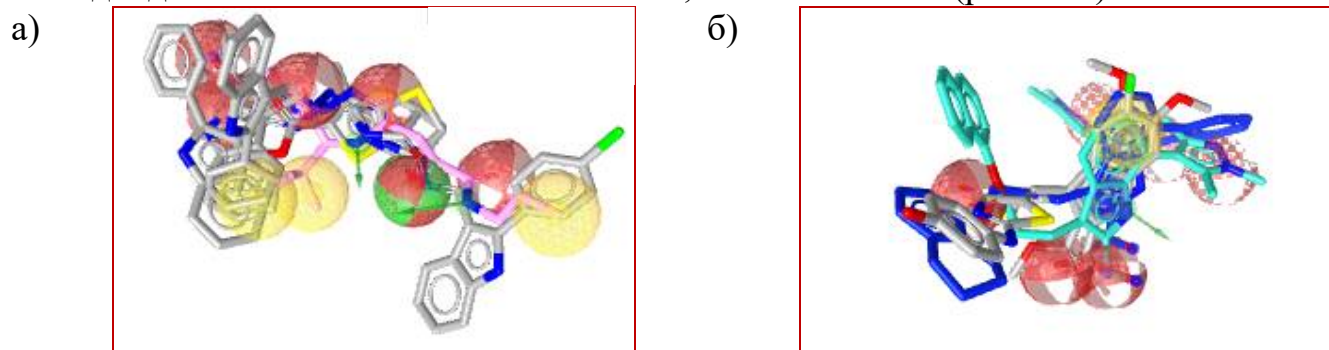


Рис. 18. Фармакофорні моделі розроблені а) на основі ліганду CA074 до Cathepsin B (3HHI); б) на основі лігандів до протеїнів MCL-1 (6FS1 та 6FS2).

У процедурі молекулярного докінгу до протеїну MCL-1 (6FS1) для сполук **6.47** та **7.32** обчислено енергії зв'язування, які становили -7,7 ккал/моль і -8,7 ккал/моль відповідно, що співмірно із показниками відомого ліганду E4Q (-9,1 ккал/моль) (рис. 19) і може свідчити про інгібування MCL-1 як можливого механізму реалізації протипухлинної дії.

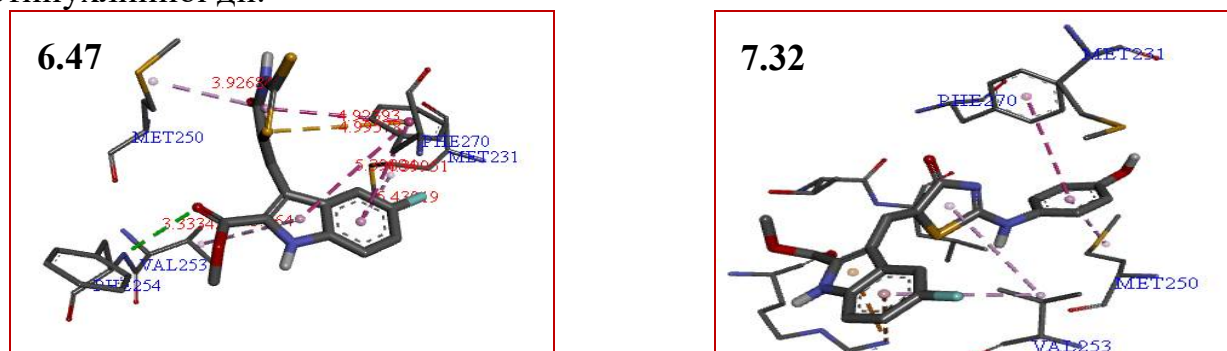


Рис. 19. Візуалізація області зв'язування 6FS1 із сполуками **6.47** та **7.32**.

У рамках поліфармакологічного підходу 45 новосинтезованих сполук з різних класів похідних тіазолідонів наведених у роботі, тестовано на предмет протимікробної та протигрибкової активності. Вивчались 5-іліден-3-(1-арилпіролідин-2,5-діон)-2-(ті)оксо-4-тіазолідинони, похідні 2-ціано-*N*-арил-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідин-2-іліден)ацетаміду та 5-[(3,5-діарил-3,4-дигідропіразол-2-іл)метилден]-2-тіоксотіазолідин-4-онів. Ідентифіковано ряд високоактивних речовин із протигрибковою активністю, що інгібували ріст *Candida albicans* із величинами МІС в межах 0,33-1,33 мкМ, при цьому найактивнішими були похідні 5-амінометиліден-роданін-3-пропанової кислоти **4.39** та 5-амінометиліден-2-іліден-3-феніл-4-тіазолідинону **4.94**. Найактивнішою щодо *Staphylococcus aureus* була група 2-(5-іліденроданін-3-іл)-сукцинімідів, серед яких найвищу активність відзначено

(MIC 0,33 мкМ) для сполуки **4.79** із 2-хлоро-3-(4-нітрофеніл)проп-2-еніліденовим фрагментом у С5 положенні базового гетероциклу (рис. 20).

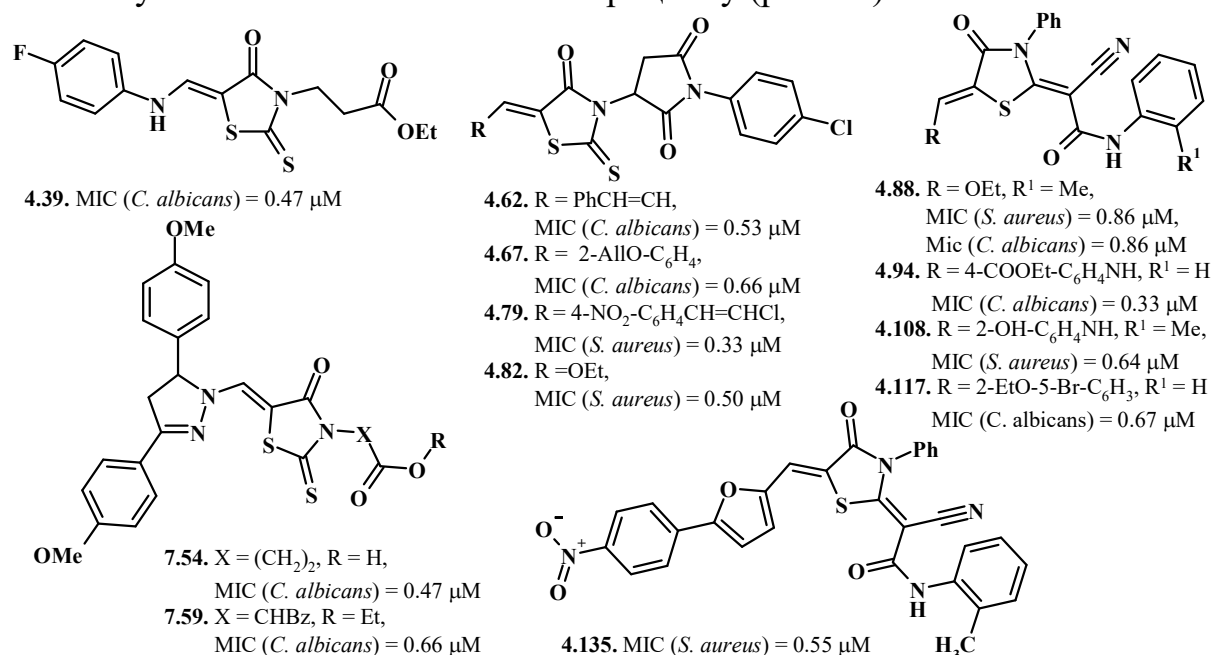


Рис. 20. Сполуки-хіти з протистафілоковою та антикандидозною активністю.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Розроблено ефективні методи синтезу і одержано 333 нових похідних 4-тіазолідинонів та гетероциклічних систем на їх основі, встановлена будова, вивчені фізико-хімічні параметри та біологічна активність. На основі комплексу досліджень кореляції «структура – біологічна дія», який включав віртуальний, традиційний та високоефективний фармакологічний скринінг, QSAR-аналіз, молекулярне та математичне моделювання, виділено 100 «лікоподібних» молекул з високою протираковою, протитрипаносомною, антилейшманіозною та антимікробною активностями для поглиблених досліджень та спрямованого синтезу нових біологічно активних сульфур- та нітрогенвмісних гетероциклів, а також обґрунтовано механізми реалізації фармакологічної активності нових «кандидатів у лікарський засіб».

2. Методом множинної регресії вперше розроблено математичну модель для прогнозування протипухлинної дії тіазолідинонів щодо різних ліній раку на основі встановленої їх протитрипаносомної активності та ряду запропонованих і обчислених дескрипторів; виділено 8 ліній ракових клітин, показники інгібування росту яких найкраще корелюють значеннями IC₅₀ щодо *Trypanosoma brucei brucei* та розроблено відповідні рівняння регресії, що може бути використано для раціонального дизайну нових тіазолідин-споріднених молекул з поліфармакологічними властивостями як прототипів нових лікарських засобів.

3. На основі проведеного аналізу кількісного взаємозв'язку «структура-активність» серій ізотіокумаринів, тіопіранотіазолів, імідазотіадіазолів та піразоло-тіазол/тіазолідинонів із протитрипаносомною дією, методами асоціативних нейронних мереж (ASNN) та регресії Random Forest (RFR), виділені молекулярні

дескриптори, які критично впливають на реалізацію протипухлинної та/або протитрипаносомної активності даних похідних, що дозволяє реалізувати дизайн та синтез спрямованих суб-бібліотек гетероциклічних сполук для сфокусованого фармакологічного скринінгу.

4. Розроблено методи отримання та структурної функціоналізації похідних 2-тіоксо-4-тіазолідинон-3-карбонових кислот, що дозволило одержати серії неописаних в науковій літературі різноманітних 5-арил(гетерил)амінометилених похідних, 5-арил(гетерил)ілідених та 5-єнамін-3-(1-арилпіролідін-2,5-діон)-роданінів, які проявляють суттєву протитрипаносомну, антилейшманіозну і протипухлинну активність з високою селективністю щодо ліній лейкемії *DAMI* та *HL-60*, а також низькі токсикометричні показники щодо людських первинних фібробластів *in vitro* та невисоку гостру токсичність *in vivo*.

5. Синтезовано нові 2-ціано-*N*-арил-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідін-2-іліден)-ацетаміди та їх іліденопохідні, для яких встановлено протипухлинну дію, що розширює напрямки пошуку потенційних протиракових агентів серед 4-тіазолідинон-споріднених гетероциклів.

6. Вперше спрямовано одержано групи 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилених)-гідразино]- та 2-[(6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилених)-гідразино]-тіазолідін-4-онів, 2-{*N'*-[2-(феніл)-1*H*-індол-3-ілметилених]-гідразино}- та 2-[6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилених)-гідразино]-тіазолів та 2-[6-фенілімідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазол-5-ілметилених)-гідразино]-тіазолів, для яких встановлено високу протипаразитарну активність *in vitro* на субмікромольному рівні щодо *Trypanosoma brucei brucei* та *Trypanosoma brucei gambiense* на фоні несуттєвої цитотоксичності на людських первинних фібробластах (лінія AB943) *in vitro* та низької гострої токсичності *in vivo*, що є важливим аргументом на предмет ефективності гібрид-фармакорного підходу в дизайні трипаноцидів для фармакотерапії сонної хвороби.

7. Вперше встановлено, що результати протилейшманіозної дії тіазолідинон/тіазол-індол/імідазотіадіазольних гібридних молекул щодо *Leishmania major* корелюють із їх протитрипаносомною та протималарійною активностями, що відкриває нові можливості для спрямованого синтезу протипаразитарних агентів.

8. З метою диверсифікації суб-бібліотек тіапіранотіазолів отримано нові *N*-заміщені похідні ізотіохроменотіазолів, опрацьовано методи синтезу 9-арил(гетерил)-3,7-дитіа-5-азатетрацикло[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]тетрадецен-4(8)-онів-6 та їх *N*-заміщених похідних. Для синтезованих сполук вперше встановлено протитрипаносомний ефект щодо *Trypanosoma brucei brucei* та протилейшманіозну активність на промастиготах *Leishmania major* (штам Friedlin V1), що дозволило запропонувати ряд високоактивних агентів для поглиблених досліджень та підтвердити гіпотезу про збереження виду та рівня біологічної дії гетероциклічних молекул при переході від 5-ен-4-тіазолідинонів до структурно-споріднених тіопіранотіазолів.

9. Шляхом реалізації гібрид-фармакофорного підходу запропоновано нові напрямки дизайну «лікоподібних молекул», що вміщують азолідиноновий та індольний гетероцикли. Вперше одержано 1-оксо-1,9-дигідро-2-тіа-9-аза-флуорен-3-карбонові кислоти на основі гідролізу та рециклізації 3-(роданін-5-іліденометилених)-

1*H*-індол-карбонових кислот, тетрациклічні 1-тіоксо-9,10а-дигідропіроло[3,4-*b*]карбазол-3,10-діони, 5-[(1*H*-індол-3-іл)метилен]-2-тіоксо-тіа(іміда)золідин-4-они та 2-[1-карбокси-2-(4-карбокси-1*H*-3-індоліл)-1-етенілдісульфаніл]-3-(4-карбокси-1*H*-3-індоліл)-2-пропенові кислоти. Системне вивчення протипухлинної дії синтезованих азолідинон-індольних гібридних молекул дозволило встановити ряд нових особливостей кореляції «структура-дія» та запропонувати для поглиблених досліджень метиловий естер 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти, для якого доведено протипухлинну активність щодо більшості ліній лейкемії, меланоми, раку легень, кишківника, ЦНС, яєчників, нирок, простати та молочної залози на субмікромольному рівні ($GI_{50} = 0,452-0,649$ мкМ).

10. Проведено спрямований синтез та поглиблене вивчення протиракового потенціалу нових 5-ариліден-2-(4-гідроксифеніл)амінотіазол-4(5*H*)-онів, що дозволило достовірно встановити селективну протилейкемічну активність зазначеного класу гетероциклів, запропонувати прогностичні характеристики для дизайну нових агентів та виділити «сполуки-лідери», для яких встановлено механізм дії, що полягає в інгібуванні полімеризації тубуліну.

11. Запропоновано нові напрямки дизайну тіазолідинон- та тіопіранотіазол-піразолінових гібридних молекул, що дозволило одержати 4-[3-(5-бromo-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5*H*-тіазол-2-он та його 5-іліденпохідні, 5-[3,5-діарил-3,4-дигідропіразол-2-іл]метилен]-2-тіоксотіазолідин-4-они, 2-[5-[[3,4-дигідропіразол-2-іл]метилен]-4-оксо-3-фенілтіазолідин-2-іліден]-2-ціано-ацетаміди, 3-піразолілзаміщені ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-они, хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазоли та 3,7-дитіа-5-азатетрацикло-[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]тетрадецен-4(8)-они. Доведено подвійну протипаразитарну та протипухлинну активності синтезованих сполук, що є фундаментальною основою для дизайну нових поліфармакологічних молекул або високоселективних агентів на основі біфармакофорних сполук.

12. На основі системного опрацювання експериментальних даних протитрипаносомної активності більше ніж 200 сполук алгоритмами машинного навчання розроблено нові QSAR-моделі, що описують антитрипаносомну активність та володіють необхідною прогностичною здатністю. Запропоновані QSAR-моделі можуть бути використані для *in silico* прогнозування протитрипаносомної дії та оптимізації процесу пошуку нових сполук-хітів.

13. Поглиблене *in vitro* вивчення цитотоксичності для сполук-хітів 2-[(2-феніл-1*H*-індол-3-ілметилен)-гідразоно]-тіазолідин-4-ону **5.27** та його 5-метилпохідного **5.28**, метилового естеру 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти **6.47**, метил 5-флюоро-3-[(2-(4-гідроксіаніліно)-4-оксо-тіазол-5-іліден)метил]-1*H*-індол-2-карбоксилату **7.32** та 4-[3-(5-бromo-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5*H*-тіазол-2-ону **7.40** на клітинах гепатоцелюлярної карциноми *HepG2* та нормальних фібробластах *Balb/c3T3* довело високу селективність їх дії до пухлинних клітин у субмікромольних концентраціях порівняно із нормальними клітинами. Одержані результати свідчать про те, що початковим етапом цитотоксичної дії сполук-хітів є дезінтеграція клітинної мембрани ракових клітин, що призводить до пригнічення їх лізосомальної та мітохондріальної активності.

14. Встановлено селективну дію у субмікромолярних концентраціях метилового естеру 5-флюоро-3-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил)-1*H*-індол-2-карбонової кислоти щодо клітинних ліній *MCF-7*, *HCT116* та *HepG2*, яка реалізується індукцією апоптозу через каспаз 3-, PARP1- та Вах-протеїн-залежні шляхи, що є суттєвим аргументом для поглиблених досліджень даної сполуки-лідера як потенційного протиракового засобу.

15. Показано, що метил 5-флюоро-3-[(2-(4-гідроксианіліно)-4-оксотіазол-5-іліден)метил]-1*H*-індол-2-карбоксилат проявляє тропність до *Cyp1a1* та *Cyp1b1* генів лінії клітин *3T3-L1* знижуючи експресію мРНК AhR рецептора та *Cyp1b1* мРНК, що зумовлює вплив на активність протеїнів родини CYP450, ендогенні метаболічні шляхи, екстрагепатичний метаболізм ксенобіотиків та опосередковано на канцерогенез і є важливим аргументом для поглиблених досліджень індол-тіазолідинонів як потенційних протиракових агентів.

16. Вивчення інтеркаляції протипухлинних 3-[4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-1-(феніл)піролідин-2,5-діонів у ДНК методами заміщення метилового зеленого із комплексу ДНК-метиловий зелений та електрофорезу плазмідної ДНК pEGFPc-1 показало, що досліджувані речовини не мають прямого впливу на ДНК. Методом ДНК-комет в лужному середовищі на клітинах лінії лейкемії *Jurkat* встановлено, що сполуки-лідери спричиняють пошкодження ДНК на рівні доксорубіцину.

17. Вперше ідентифіковано похідні 5-амінометиліден-роданін-3-пропанової кислоти, 2-(5-іліден-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл)-сукцинімідів та 5-амінометиліден-2-іліден-3-феніл-4-тіазолідинону як високоактивні протигрибкові (*Candida albicans*, MIC = 0,33-1,33 мкМ) та протимікробні (*Staphylococcus aureus*, MIC = 0,33 мкМ) агенти, що обґрунтовує продовження системних досліджень протимікробного потенціалу 5-ен-4-тіазолідинонів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Крицишин АП**, Камінський ДВ, Зеліско НІ, Хилюк ДВ, Грельє Ф, Лесик РБ. Вивчення протитрипаносомної активності тіазолідинонів та споріднених гетероциклічних систем. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2013; 11(42):57-62. (Особистий внесок – дизайн дослідження, синтез тіопіранотіазолів, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговоренні результатів, оформлення статті).

2. Атаманюк ДВ, **Крицишин АП**, Зименковский БС, Лесык РБ. Синтез и фармакологические свойства конденсированных полициклических соединений на основе тиазолидинонов в кн. «Химия и биологическая активность азолов. Избранные обзоры» (под. ред. В. Броварца, В. Зябрева), LAP Lambert Academic Publishing, 2014; 339-390. ISBN 978-3-659-55188-8. (Особистий внесок – розробка методик синтезу сполук, інтерпретації фармакологічних досліджень, узагальнення результатів, оформлення розділу монографії).

3. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Grellier P, Lesyk R. Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. European Journal of Medicinal Chemistry. 2014; 85:51-64. (Особистий внесок – дизайн роботи, аналіз літературних даних та узагальнення результатів, оформлення статті).

4. **Kryshchyshyn AP**, Kaminsky DV, Atamanyuk DV, Lesyk RB. Computer technologies in pharmacy - Filling in the gaps in Ukrainian PharmD curriculum. Currents in Pharmacy Teaching and Learning. 2015; 7(4):556-9. (*Особистий внесок – постановка задачі, дизайн роботи, оформлення статті*).

5. **Крищишин АП**, Камінський ДВ, Лесик РБ. Створення інноваційних лікарських засобів (підходи та методологія drug design) – одне з ключових питань сучасної фармацевтичної освіти. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2015; 13(1):49-58. (*Особистий внесок – постановка завдання і дизайн дослідження, обговорення результатів, оформленні статті*).

6. Lesyk R, Zimenkovsky B, Kaminsky D, **Kryshchyshyn A**, Havrylyuk D, Zelisko N, Devinyak O, Khylyuk D, Roman O, Lozynskyi A, Leliuch M, Wojtyra M. 4-Thiazolidinone-based Michael acceptors as tool for anticancer agents design. Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology (Ed. V. Novikov), Lviv: Lviv Polytechnic Publishing House, 2015;102-113. (*Особистий внесок – участь у постановці задачі дослідження, дизайні роботи, експериментальних дослідженнях, обговоренні результатів, оформленні розділу монографії*).

7. Kaminsky D, **Kryshchyshyn A**, Lesyk R. 5-Ene-4-thiazolidinones – An efficient tool in medicinal chemistry. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017; 140:542-594. (*Особистий внесок – дизайн та обговорення результатів, оформлення статті*).

8. Kaminsky D, **Kryshchyshyn A**, Lesyk R. Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery. 2017; 12(12):1233-1252. (*Особистий внесок – дизайн та обговорення результатів, оформлення статті*).

9. **Kryshchyshyn AP**, Atamanyuk DV, Kaminsky DV, Grellier P, Lesyk RB. Investigation of anticancer and anti-parasitic activity of thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles bearing norbornane moiety. Biopolymers and Cell. 2017; 33(3):183-205. (*Особистий внесок – постановка завдання, дизайн роботи, синтез сполук, інтерпретація спектральних даних та фармакологічних досліджень, оформлення статті*).

10. **Крищишин АП**. Фрагмент-орієнтований дизайн лікарських засобів. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2017; 15(1):28-44.

11. Szychowski KA, Leja ML, Kaminsky DV, **Kryshchyshyn AP**, Binduga UE, Pinyazhko OR, Lesyk RB, Tobiasz J, Gmiński J. Anticancer properties of 4-thiazolidinone derivatives depend on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). European Journal of Medicinal Chemistry. 2017; 141:162-168. (*Особистий внесок – синтез тіопіранотіазолів, обговорення результатів, оформлення статті*).

12. **Kryshchyshyn A**, Roman O, Lozynskyi A, Lesyk R. Thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles as new efficient scaffolds in medicinal chemistry. Scientia Pharmaceutica. 2018; 86(2):26. (*Особистий внесок – дизайн дослідження, узагальнення результатів, оформлення статті*).

13. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Nektegayev I, Grellier P, Lesyk R. Isothiochromenothiazoles – a class of fused thiazolidinone derivatives with established anticancer activity that inhibits growth of Trypanosoma brucei brucei. Scientia Pharmaceutica. 2018, 86(4):47. (*Особистий внесок – постановка завдання, дизайн роботи, розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектрів ЯМР та результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті*).

14. **Kryshchyshyn A**, Devinyak O, Kaminsky D, Grellier P, Lesyk R. Development of Predictive QSAR Models of 4-Thiazolidinones Antitrypanosomal Activity Using Modern Machine Learning Algorithms. *Molecular Informatics*. 2018; 37(5):1700078. (Особистий внесок – участь в постановці завдання, проведення *in silico* досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

15. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Karpenko O, Gzella A, Grelier P, Lesyk R. Thiazolidinone/thiazole based hybrids – New class of antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 174:292-308. (Особистий внесок – синтез тiazолідин-феніліндолів, інтерпретація результатів фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

16. Holota S, **Kryshchyshyn A**, Derkach H, Trufin Y, Demchuk I, Gzella A, Grellier P, Lesyk R. Synthesis of 5-enamine-4-thiazolidinone derivatives with trypanocidal and anticancer activity. *Bioorganic Chemistry*. 2019; 86:126-136. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація фармакологічних досліджень, оформлення статті).

17. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Grellier P, Lesyk R. Thiazolidinone-related heterocyclic compounds as potential antitrypanosomal agents. In *Azoles-Synthesis, Properties, Applications and Perspectives*. IntechOpen. 2020; 1-30. (Особистий внесок – дизайн роботи, узагальнення результатів, оформлення розділу монографії).

18. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Roman O, Kralovics R, Karpenko O, Lesyk R. Synthesis and anti-leukemic activity of pyrrolidinedione-thiazolidinone hybrids. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020; 92(2):108-19. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація спектрів та фармакологічних досліджень, оформлення статті).

19. **Kryshchyshyn-Dylevych AP**, Zelisko NI, Grellier P, Lesyk RB. Preliminary evaluation of thiazolidinone-and pyrazoline-related heterocyclic derivatives as potential antimalarial agents. *Biopolymers and Cell*. 2020; 36(1):47-59. (Особистий внесок – синтез сполук, інтерпретація даних фізико-хімічних методів аналізу та фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення статті).

20. **Крищишин-Дилевич АП**. Синтез і протипухлинна активність 2-ціано-2-(4-оксо-3-фенілтіазолідин-2-іліден)-N-арилацетамідів. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. 2020; 13(2):194-201.

21. **Kryshchyshyn-Dylevych AP**. 5-Ene-rhodanine-3-carboxylic acids as potential antimicrobial and antiparasitic agents. *Biopolymers and Cell*. 2020, 36(3):229-241.

22. **Kryshchyshyn-Dylevych A**, Garazd M, Karkhut A, Polovkovych S, Lesyk R. Synthesis and anticancer activity evaluation of 3-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-yl)-1 H-indole-carboxylic acids derivatives. *Synthetic Communications*. 2020; 50(18):2830-2838. (Особистий внесок – розробка методик одержання та синтез сполук, інтерпретація спектральних даних та результатів протиракової активності, оформлення статті).

23. Schadich E, **Kryshchyshyn-Dylevych A**, Holota S, Polishchuk P, Džubak P, Gurska S, Hajdуч M, Lesyk R. Assessing different thiazolidine and thiazole based compounds as antileishmanial scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2020; 30:127616. (Особистий внесок – постановка задачі дослідження, синтез сполук, обговорення результатів, оформлення статті).

24. **Крищишин-Дилевич АП**. Синтез та вивчення біологічної активності поліциклічних 1-тіоксо-9,10а-дигідропіроло[3,4-*b*]карбазол-3,10-діонів. Фармацевтичний часопис. 2020; 4:5-10.

25. Subtelna I, **Kryshchysyn-Dylevych A**, Ruochen J, Lelyukh M, Ringler A, Kubicek S, Zagrijtschuk O, Kralovics R, Lesyk R. 5-Arylidene-2-(4-hydroxyphenyl)aminothiazol-4(5H)-ones with selective inhibitory activity against some leukemia cell lines. Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences. 2020; e2000342. (*Особистий внесок* – участь у дизайні дослідження, інтерпретації спектральних даних та результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

26. Szychowski KA, Skóra B, **Kryshchysyn-Dylevych A**, Kaminsky D, Rybczyńska-Tkaczyk K, Lesyk R, Gmiński J. Induction of Cyp450 enzymes by 4-thiazolidinone-based derivatives in 3T3-L1 cells in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2020; 1-13. (*Особистий внесок* – синтез, інтерпретація спектрів та результатів фармакологічних досліджень, оформлення статті).

27. **Kryshchysyn-Dylevych A**. Some pharmacological properties of 4-[3-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)-5-phenyl-3,4-dihydropyrazol-2-yl]-5H-thiazol-2-one. Ukrainica Bioorganica Acta 2020; 5(2):40-47.

28. **Кришишин-Дилевич АП**. QSAR-Аналіз бібліотек 4-тіазолідинон-споріднених гетероциклів для прогнозування протитрипаносомних властивостей нових похідних. Медична та клінічна хімія 2020; 22(4):39-46.

29. **Кришишин АП**, Лесик РБ. (5*aRS*,11*bSR*)-3,5*a*,6,11*b*-Тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-2-тион. "Химия гетероциклических соединений. Современные аспекты" (Том 2/Ред. В.Г. Карцев), Москва, Международ. Благотворител. фонд "Научное Партнерство", МБФНП (International charitable foundation "Scientific Partnership Foundation", ICSPF), 2014; 237-238. (*Особистий внесок* – дизайн роботи, експериментальні дослідження, оформлення статті).

30. Лесик РБ, **Кришишин АП**, Піняжко ОР, Коропецька НЮ, Нектегаєв Ю, Остапів ДД. N-(3-трифторметилфеніл)-2-(2-оксо-3,5*a*,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-3-іл)ацетамід, що проявляє анаболічну і андрогенну активність. Патент (на корисну модель) №98069; 05.12.2014; 10.04.2015,7. (*Особистий внесок* – синтез сполуки, інтерпретація спектрів, дизайн фармакологічних досліджень, обговоренні результатів, оформлення патенту).

31. Зіменковський БС, Лесик РБ, **Кришишин АП**, Камінський ДВ, Нектегаєв Ю. 5-(1-Феніл-2-меркапто-1,3,4-триазоліл-метилен)-9-(4'-хлорофеніл)-3,7-дитіа-5-азатетрацикло-[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]тетрадецен-4(8)-он-6, що проявляє протипухлинну активність. Патент (на корисну модель) № 98037; 01.12.2014;10.04.2015,7. (*Особистий внесок* – синтез сполуки, інтерпретація спектрів, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення патенту).

32. Лесик РБ, **Кришишин АП**, Зіменковський БС. 4-[3-(5-Бromo-2-гідроксифеніл)-5-феніл-3,4-дигідропіразол-2-іл]-5H-тіазол-2-он, що проявляє протипухлинну дію. Патент (на корисну модель) № 142117; 27.12.2019;12.05.2020,9. (*Особистий внесок* – синтез сполуки, інтерпретація спектрів, дизайн фармакологічних досліджень, обговорення результатів, оформлення патенту).

33. Kaminsky D, **Kryshchysyn A**, Havrylyuk D, Zelisko N, Devinyak O, Subtel'na I, Khylyuk D, Atamanyuk V, Lozynskyi A, Hyrkov S, Lesyk R. Search of new anticancer thiazolidinones within structure-based design. Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference RECOOP HST; 2013 Apr. 5-7, Prague, Czech Republic; 2013. 29:81. (*Особистий внесок* – постановка завдання та дизайн досліджень).

34. Зіменковський БС, Камінський ДВ, **Кришишин АП**, Лесик РБ. Досвід викладання ІТ-суміжних дисциплін на прикладі «Комп'ютерних технологій у фармації». Матеріали X ювілейної Всеукраїнської навчально-наук. конф. з міжнародною участю «Кредитно-модульна система організації навчального процесу у вищих медичних (фарм.) навчальних закладах України на новому етапі»; 2013 квіт. 18-19, Тернопіль; 2013. (*Особистий внесок – постановка завдання та дизайн роботи, обговорення результатів, оформлення тез*).

35. Камінський ДВ, **Кришишин АП**, Драпак ІВ, Хилук ДВ, Лесик РБ. Пошук нових протитрипаносомних агентів серед 4-тіазолідинонів та споріднених гетероциклічних систем. Матеріали XXX Всеукр. Наук-практ. конф. з міжнародною участю «Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»; 2013 трав. 23, Харків; 2013, 65-6. (*Особистий внесок – дизайн досліджень, синтез сполук, участь в обговоренні результатів, оформленні тез*).

36. Lesyk R, Zimenkovsky B, Kaminsky D, **Kryshchysyn A**, Havrylyuk D, Zelisko N, Atamanyuk V, Lozynskyi A. Prospects of the thiopyrano[2,3-*d*]thiazole heterocyclic system exploration in structure-based drug design. Abstract book "XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego"; 2013 Sep. 18-21, Białystok, Polska; 2013, 175. (*Особистий внесок – дизайн досліджень, синтез сполук, оформлення тез*).

37. Kaminsky D, **Kryshchysyn A**, Havrylyuk D, Zelisko N, Khylyuk D, Zimenkovsky B, Grellier P, Lesyk R. Thiazolidinone-based design of new antitrypanosomal agents. Bridges in Life Science 10th Annual Scientific Conference, 2015 Apr. 16-19, Wroclaw; 2015, 80. (*Особистий внесок – участь в постановці завдання та дизайні досліджень, обговоренні результатів, оформленні тез*).

38. Kaminsky D, Havrylyuk D, **Kryshchysyn A**, Zelisko N, Leliuch M, Grellier P, Lesyk R. Design of new antitrypanosomal agents bearing 4-thiazolidinone core. Abstract book 24th Scientific Congress of the Austrian Pharmaceutical Society (OPhG); 2015, Sep. 12-14, Vienna, Austria; 2015, 38. (*Особистий внесок – участь у дизайні досліджень, синтезі сполук та обговоренні результатів*).

39. Lesyk R, Zimenkovsky B, Kaminsky D, Havrylyuk D, **Kryshchysyn A**, Zelisko N, Devinyak O, Khylyuk D, Roman O, Lozynskyi A, Leliuch M, Wojtyra M. 5-Ene-4-thiazolidinones: Promiscuous or Polyfunctional Compounds in Drug Design. Book of Abstracts Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles, CNCH-2015; 2015, Nov. 9-13, Kharkiv, Ukraine; 2015, 03. (*Особистий внесок – участь у дизайні досліджень, синтезі сполук та обговоренні результатів*).

40. Kaminsky D, Havrylyuk D, **Kryshchysyn A**, Zelisko N, Leliuch M, Grellier P, Lesyk R. Search for new antitrypanosomal agents among 4-thiazolidinones. Book of Abstracts. The 6th International Pharmaceutical conference Science and Practice; 2015 Nov. 5-6, Kaunas, Lithuania; 2015, 14. (*Особистий внесок – участь у дизайні дослідження, синтезі сполук, обговоренні результатів та оформленні тез*).

41. **Kryshchysyn A**, Kaminsky D, Devinyak O, Grellier P, Lesyk R. QSAR studies of 4-thiazolidinone derivatives showing antitrypanosomal activity. Abstract book Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Meeting RECOOP HST; 2016 Apr. 7-10, Prague, Czech Republic; 2016, 43. (*Особистий внесок – дизайн дослідження, участь у *in silico* розрахунках та обговоренні результатів, оформлення тез*).

42. **Kryshchyshyn A**, Grellier P, Lesyk R. Dual anticancer and antitrypanosomal activity as a tool in new drug-like molecules design. Abstracts of IX International meeting "From molecular to Cellular Events in Human Pathologies"; 2016 Sep. 19-22, Lviv, Ukraine; 2016, 307. (*Особистий внесок* – постановка завдання, участь у дизайні дослідження, обговорення результатів, оформлення тез).

43. **Kryshchyshyn A**, Grellier P., Lesyk R. Hybrid-pharmacophore approach – an efficient tool in novel antitrypanosomal agents' development. Abstract book XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego; 2017 Sep. 19-22, Kraków, Polska; 2017, 307. (*Особистий внесок* – участь в постановці завдання, дизайні роботи, обговоренні результатів та оформленні тез).

44. Kaminsky D, **Kryshchyshyn A**, Grellier P, Lesyk R. Thiazolidinone core in the design and development of new antitrypanosomals. Abstract book International Weigl Conference; 2017 Sep. 26-29, Lviv, Ukraine; 2017, 56. (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, синтез сполук, обговоренні результатів, оформлення тез).

45. **Kryshchyshyn A**, Grellier P, Lesyk R. Summarizing recent advances in the search for new antitrypanosomals among the thiazolidine-based compounds. 8th RECOOP Annual Project Review Meeting; 2017 Oct. 19 – 21, Zagreb, Croatia; 2017, 91. (*Особистий внесок* – дизайн дослідження, синтез сполук, оформлення тез).

46. Kaminsky D, **Kryshchyshyn A**, Lesyk R. 5-Ene-thiazolidinone based design of drug-like molecules. Abstract book XIII Diagnostic, predictive and experimental oncology days; 2017 Nov. 28-30, Olomouc, Czech Republic; 2017, 9. (*Особистий внесок* – участь у постановці завдання та розробленні стратегії досліджень).

47. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Golota S, Trufin Y, Derkach H, Grellier P, Lesyk R. Study of 5-aminomethylene-4-thiazolidinones as potential trypanocidals. Abstract Book 25th Wilhelm Bernard Workshop on the cell Nucleus; 2017 Jun 19-22, Nizhny Novgorod; 2017, 96. (*Особистий внесок* – участь у плануванні експерименту, розробленні стратегії досліджень та синтезі сполук, оформлення тез).

48. **Kryshchyshyn A**, Lesyk R. Search for drug-like molecules among thiopyranothiazoles. IX Konwersatorium Chemii Medycznej; 2018 Sep. 13-15, Lublin; 2018, 63. (*Особистий внесок* – синтез сполук, оформлення тез).

49. **Kryshchyshyn A**, Kaminsky D, Lesyk R. ROS dependent/antioxidant effects of thiazolidinones with dual action. 2-й міжнародний симпозіум Innovation in Medicine Smart Lion 2018; 2018 Oct. 11-12, Lviv; 2018. (*Особистий внесок* – розроблення стратегії досліджень, оформлення тез).

50. **Kryshchyshyn A**, Lesyk R. Combination of [6+5]-heterocycles with thiazolidinone core in the design of new anticancer agents. Abstract book Recoop 14th Bridges in Life Sciences and 2nd Recoop – KFSD International Student Conference; 2019 Apr. 10-14, Bratislava, Slovak Republic; 2019, 171. (*Особистий внесок* – стратегія досліджень, синтез сполук, оформлення тез).

51. **Крищишин А**, Грельє Ф, Щадіч Е, Джубак П, Гайдук М, Лесик Р. Тіазолідинон/тіазол-феніліндол/імідазотіадіазольні гібриди – новий клас протипаразитарних агентів. Збірник наукових праць: XVII наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2019». Львів: Видавничий центр Львівського національного університету імені Івана Франка; 2019 чер 2-5, Львів; 2019, У34. (*Особистий внесок* – стратегія досліджень, синтез сполук, оформлення тез).

52. Lesyk RB, Kaminsky DV, **Kryshchysyn AP**. Design and development of new thiazolidinone-based drug-like molecules. Biopolym. Cell. 2019; 35(3):222. (*Особистий внесок* – участь в дизайні досліджень, обговоренні результатів та оформленні тез).

53. **А. Крицишин**, Ф. Грельс, Р. Лесик. Похідні тiazолідинону – потенційні протипаразитарні агенти. Результати досліджень та майбутні перспективи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України “Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку”; 2019 вер.19-20, Харків; 2019, Т1:30-32. (*Особистий внесок* – планування та експериментальні дослідження).

54. **Kryshchysyn A**, Kaminsky D, Roman O, Kralovics R, Karpenko O, Lesyk R. Synthesis and antileukemic activity of pyrrolidinedione-thiazolidinone hybrids. Abstract book Bridges in Life Sciences 10th RECOOP Annual Review Meeting; 2019 Oct. 11-12, Wroclaw, Poland; 2019, 78. (*Особистий внесок* – участь у розробленні стратегії дослідження, опрацюванні даних, обговоренні результатів та оформленні тез).

АНОТАЦІЯ

Крицишин-Дилевич А.П. 4-Тiazолідинони та споріднені гетероцикли в дизайні протипаразитарних та протипухлинних агентів як поліфармакологічних лікоподібних молекул. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія (226 – фармація, промислова фармація). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена спрямованому нових біологічно активних 5-ен-4-тіазолідинонів, тіазолідинон/тіазол-індол/імідазотіадіазольних гібридних молекул, конденсованих тіазолвмісних поліциклічних сполук та біоізостерних кон'югатів як лікоподібних молекул з поліфармакологічним профілем; вивченню їх фізико-хімічних, фармакологічних властивостей, встановленню молекулярних механізмів реалізації їх біологічної активності з метою впровадження нових прототипів протипухлинних та протипаразитарних лікарських засобів.

На основі статистичних розрахунків та QSAR-аналізу знайдено закономірності взаємозв'язку структура-активність похідних тіазолідинону з протитрипаносомною та/або протипухлинною дією, які використано для дизайну спрямованих суббібліотек гетероциклічних сполук. Ідентифіковано низькотоксичні сполуки-лідери з високою протипухлинною, протитрипаносомною, антилейшманіозною, протималярійною та протимікробною активністю для поглиблених досліджень. Встановлено, що протипухлинна дія сполук реалізується індукцією апоптозу через каспаз 3-, PARP1- та Вах-протеїн-залежні шляхи або впливом на активність протеїнів СYP450 і ендогенні метаболічні шляхи, екстрагепатичний метаболізм ксенобіотиків та опосередковано на канцерогенез.

Ключові слова: похідні 4-тіазолідинону, протитрипаносомна активність, протипухлинна активність, протилейшманіозна активність, гібрид-фармакофорний підхід, поліфармакологічний підхід, цитотоксичність.

АННОТАЦИЯ

Кришчшин-Дилевич А.П. 4-Тиазолидиноны и родственные гетероциклы в дизайне противопаразитарных и противоопухолевых агентов как полифармакологических “drug-like” молекул. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия (226 - фармация, промышленная фармация). –

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, МОЗ Украины, Львов, 2021.

Диссертация посвящена направленному дизайну и синтезу новых биологически активных 5-ен-4-тиазолидинонов, тиазолидинон/тиазол-индол/имидазотиадиазольных гибридных молекул, конденсированных тиазолсодержащих полициклических соединений и биоизостерных конъюгатов как лекарственно-подобных молекул с полифармакологическим профилем; изучению их физико-химических, фармакологических свойств, установлению молекулярных механизмов реализации их биологической активности с целью внедрения новых прототипов противоопухолевых и противопаразитарных лекарственных средств.

На основе статистических расчетов и QSAR-анализа найдено закономерности взаимосвязи структура-активность производных тиазолидина с противотрипаносомным и/или противоопухолевым действием, которые использованы для дизайна направленных суб-библиотек гетероциклических соединений. Идентифицированы низкотоксические соединения-лидеры с высокой противоопухолевой, противотрипаносомной, антилейшманиозной, противомаларийной и противомикробной активностью для углубленных исследований. Установлено, противоопухолевое действие соединений реализуется индукцией апоптоза через каспаз 3-, PARP1- и Вах-протеин-зависимые пути или влиянием на активность протеинов CYP450 и эндогенные метаболические пути, экстрагепатический метаболизм ксенобиотиков и опосредованно на канцерогенез.

Ключевые слова: производные 4-тиазолидинона, противотрипаносомная активность, противоопухолевая активность, противолейшманиозная активность, гибридно-фармакофорный подход, полифармакологический подход, цитотоксичность.

SUMMARY

Kryshchychyn-Dylevych A.P. 4-Thiazolidinones and related heterocycles in the design of antiparasitic and antitumor agents as polypharmacological drug-like molecules. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a doctor of pharmaceutical science degree in speciality 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy (226 - pharmacy, industrial pharmacy). Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to the design and synthesis of 5-ene-4-thiazolidinones, thiazolidinone/thiazole-indole/imidazothiadiazole hybrid molecules, fused thiazole containing polycyclic compounds and their bioisosters as drug-like molecules with the polypharmacological profile, study of their physicochemical, pharmacological properties,

investigation of molecular mechanisms of their biological activity for the purpose of introduction of new prototypes of antitumor and antiparasitic drugs.

Based on the results of QSAR-analysis of the series of thiazole/thiazolidinone derivatives towards *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei gambiense* and method of multiple regression, the molecular descriptors critically influencing the antitrypanosomal and/or antitumor activity of these derivatives had been identified. The obtained data were used for the design of focused sub-libraries of compounds for further synthetic and biological studies.

Based on the developed synthetic methods, 5-ethoxymethylidene-2-thioxo-4-thiazolidinone-3-carboxylic acids and their esters were obtained, which were functionalized in the reactions with aromatic and heterocyclic amines, hydrazides and ammonium bicarbonate. An efficient alternative one-step method for the synthesis of 5-ylidene-3-(1-aryl-pyrrolidine-2,5-dione)-rhodanines had been proposed. Within the hybrid-pharmacophore approach a series of 2-[(2-phenyl-1*H*-indol-3-ylmethylene)-hydrazono]- and 2-[(6-phenyl)-imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol-5-ylmethylene]-hydrazono}thiazolidin-4-ones were synthesized in the reactions of thiosemicarbazones and appropriate $[C_2]^{2+}$ -reagents. In order to establish the structure-activity relationship, a number of related thiazoles were obtained. For the majority of thiazolidinone/thiazole-indole/imidazothiadiazole hybrids high antitrypanosomal and antileishmanial activity at submicromolar level was found. New polycyclic isothiochromenothiazoles and 9-aryl(heteryl)-3,7-dithia-5-azatetracyclo[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]tetradecen-4(8)-ones-6 as well as their *N*-substituted derivatives were synthesized. Molecules containing thiazolidone/thiohydantoin and indole heterocycles were synthesized for the first time: 3-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-ylidenemethylene)-1*H*-indole-carboxylic acids and their methyl esters, 1-oxo-1,9-dihydro-2-thia-9-aza-fluorene-3-carboxylic acids and 1-thioxo-9,10a-dihydropyrrolo[3,4-*b*]carbazole-3,10-diones.

Based on the systematization of molecular fragments of highly active compounds, the sub-libraries of drug-like molecules were designed and synthesized: 5-arylidene-2-(4-hydroxyphenyl)aminothiazol-4(5*H*)-ones, 3-[(4-oxo-3-carboxy-2-thioxothiazolidin-5-yl)]-1*H*-indole-2-carboxylic acids and 3-[(2-amino-4-oxothiazol-5-ylidene)methyl]-1*H*-indole-2-carboxylic acids with selective inhibitory activity against different leukemic cell lines.

QSAR-analysis of more than 200 compounds with trypanocidal activity allowed to develop a number of QSAR-models with good prognostic ability. For the 5 lead-compounds identified in a result of a comprehensive studies of antiparasitic and antitumor activity of different classes of thiazoles/thiazolidinones, an in-depth *in vitro* study of cytotoxicity on hepatocellular carcinoma *HepG2* cells and normal fibroblasts in Balb/c 3T3 was carried out using the MTT, NRU, LDG and TCP tests that showed higher sensitivity of *HepG2* cells to their action than normal cells. Western blot analysis (*HepG2* cells) showed that 5-fluoro-3-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-ylidenemethyl)-1*H*-indole-2-carboxylic acid methyl ester induced apoptosis through caspase 3-, PARP1- and Bax-protein-dependent pathways and did not affect the passage of G1/S phase in *HepG2* cells. Probably, the mechanism of its antiproliferative effect occurs through the G2/M phase arrest in tumor cells. An alkaline comet assay showed that it causes DNA damage in *HepG2* cells at a level comparable to that of doxorubicin. It was established that methyl 5-fluoro-3-[(2-(4-hydroxyanilino)-4-oxothiazol-5-ylidene)methyl]-1*H*-indole-2-carboxylate

decreased the AhR receptor mRNA expression and decreased Cyp1b1 mRNA expression, therefore affecting endogenous metabolic pathways, extrahepatic xenobiotic metabolism, and indirectly carcinogenesis.

Study of the intercalation of 3-[5-[(2-allyloxyphenyl)methylene]- and 3-[(5-[2-chloro-3-(4-nitrophenyl)prop-2-enylidene]-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-1-(4-chlorophenyl)pyrrolidine-2,5-diones as well as 3-[(5-[2-chloro-3-(4-nitrophenyl)prop-2-enylidene]-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-1-(4-hydroxyphenyl)pyrrolidine-2,5-dione in the DNA in the methyl green method showed that these molecules do not intercalate in the DNA, therefore do not have a direct effect on DNA. The absence of the impact of mentioned compounds on DNA was also proved by the method of electrophoresis of plasmid DNA pEGFPc-1. In contrast, the alkaline comet assay on *Jurkat* leukemia cell line proved that the above compounds cause DNA damage at the same level as doxorubicin.

Search for the antimicrobial agents among various non-fused polycyclic 4-thiazolidinone derivatives with the established other pharmacological profiles allowed to identify a number of highly active antifungal lead-compounds that inhibited the growth of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: 4-thiazolidinone derivatives, antitrypanosomal activity, antitumor activity, antileishmanial activity, hybrid pharmacophore approach, polypharmacological approach, cytotoxicity.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР	– біологічно активні речовини
ЛАТ	– людський африканський трипаносомоз
НЕКТ	– ніфуртимокс-ефлорнітин комбінована терапія
ЛЗ	– лікарський засіб
ХШ	– хвороба Шагаса
РОР	– проліл олігопептидаза
РФК	– реактивні форми кисню
НАДФ	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
TryR	– трипанотіон редуктаза
ЛЗ	– лікарський засіб
VSG	– (variant surface glycoprotein) поверхневий глікопротеїн
ДМСО	– диметилсульфоксид
IC ₅₀	– концентрація досліджуваної речовини, що інгібує ріст 50% клітин
GP%	– відсоток росту пухлинних клітин
GI ₅₀	– концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє інгібування росту 50% клітин
TGI	– концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє тотальне інгібування росту пухлинних клітин
LC ₅₀	– концентрація досліджуваної речовини, що спричиняє загибель 50% пухлинних клітин
LD ₅₀	– концентрація, що викликає загибель 50 відсотків тварин
ЯМР	– ядерно-магнітний резонанс
MTT	– метил тетразоліум тест
NRU	– тест з нейтральним червоним
TCP	– дослідження вмісту загального білку клітини
LDH	– дослідження виходу лактатдегідрогенази
CC ₂₀ , CC ₅₀ , CC ₈₀	– цитотоксичні концентрації, що інгібують життєздатність клітин на 20%, 50% та 80% відповідно
AhR	– арил-гідрокарбонові рецептори
βNF	– β-нафтофлавіон
Cyp1a1, Cyp1b1, Cyp1a2 та Cyp2b10	– гени, що кодують синтез білків родини цитохрому P450 – CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2 та CYP2B10 відповідно
MIC	– мінімальна інгібуюча концентрація
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція