

Міністерство охорони здоров'я України
ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького»
Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Гойдик Михайло Володимирович

УДК 615.012.1.076:547.789.6

**СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ ХРОМЕНО[4',3' :
4,5]ТІОПІРАНО[2,3-*d*]ТІАЗОЛІВ ТА ЇХ 3-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ**

226 - Фармація, промислова фармація

22 - Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

_____ М.В. Гойдик

Наукові керівники:

Лесик Роман Богданович, доктор фармацевтичних наук, професор

Половкович Святослав Володимирович, доктор хімічних наук, доцент

Львів – 2026

АНОТАЦІЯ

Гойдик М.В. Синтез та біологічна активність нових хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 - Фармація, промислова фармація (22 - Охорона здоров'я). - Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2026.

Дисертаційну роботу присвячено синтезу нових похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу та їх 3-заміщених аналогів, дослідженню їхніх фізико-хімічних властивостей і вивченню біологічної активності. На підставі аналізу сучасних літературних джерел обґрунтовано вибір синтетичних підходів до одержання цільових сполук, зокрема з використанням [4+2]-циклоконденсації, доміно-реакцій типу Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера, а також методів алкілювання, ацилювання та ціаноетилювання. Системний підхід до побудови хімічної бібліотеки забезпечив структурну різноманітність та створив підґрунтя для оцінки залежностей «структура-активність» щодо цитотоксичної дії на пухлинні клітини. Низку синтезованих сполук досліджено на предмет потенційної протисудомної дії з використанням *in silico* прогнозування, моделей молекулярного докінгу та оцінки ADME/ПК-параметрів. Результати скринінгу засвідчили наявність перспективних молекул, що дозволяє розглядати дані структури як основу для створення нових кандидатів у протиепілептичні засоби.

Показано, що реакція доміно-Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера є досить ефективним і відносно простим методом для одержання конденсованих структур похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу. Перевагою даної реакції є те, що швидко вдається одержати складні каркаси з відносно простих та доступних реагентів, з мінімальними витратами розчинників, що є сучасними тенденціями у медичній хімії. Отже завдяки реакції доміно-Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера нам вдалось поєднати тіопірановий та тіазольний фрагменти у молекулі, що є досить перспективним напрямком. Дана стратегія відкриває широкі можливості оскільки

тіопірано[2,3-*d*]тіазоли можуть володіти протисудомною, протипухлинною, протимікробною та протигрибковою активностями, що робить даний клас сполук важливим для подальших досліджень.

Встановлено, що оптимальними умовами проходження реакції доміно-Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера з використанням 4-тіоксо-2-оксо-тіазолідинону **2.1** та похідних 2-алілоксибензальдегіду **2.2a-j** є середовище ацетонітрилу та EDDA. Синтез цільового 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8** супроводжується практично однаковим виходом не залежно від того чи в якості реакційного середовища використовували ацетонітрil/EDDA чи оцтову кислоту/натрію ацетат. Завдяки наявності пропаргілового фрагменту в структурі альдегіду реакція проходила через стадію утворення проміжного продукту, який окиснювався утворюючи ароматичну систему.

Синтез N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)пропанаміду **2.14** був здійснений двома методами. Один з методів включав реакцію ціаноетилювання базового каркасу з подальшим рядом хімічних перетворень. Альтернативний метод одержання цільового N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)пропанаміду **2.14** передбачав введення в реакцію вихідного тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону та безпосередньо 3-хлор-N-(4-хлорофеніл)-пропанаміду **2.12** в середовищі спиртового розчину КОН. Даний метод є більш доцільним, оскільки характеризується меншою кількістю стадій реакції та економією розчинників.

В умовах реакції [4+2]-циклоприєднання між гетеродієновими структурами похідними 5-(2-гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону **2.15** та дієнофільними реагентами - похідними акрилового альдегіду та ітаконової кислоти вдалось одержати конденсовані похідні 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5a(6*H*)-іл)оцтової кислоти **2.21** та 6-гідрокси-3,5a,6,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **2.17**.

В продовження розвитку даної тематики було одержано ряд тіопірано-тіазолів з піразоліновим фрагменту у положенні 3 тіазолідинового циклу **4.2b,c**, **4.6- 4.8**, **4.10**, **4.23** та їх структурних аналогів **4.14a-c**, **4.16**, в основі яких знаходиться 5,5,8-триметил-3,5,5a,6,7,8,9,9a-октагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-2-он **4.12**. Для синтезу 9-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.21** був застосований кардинально інший підхід, що демонструє структурне різноманіття даного класу сполук та можливості їх подальшої функціоналізації

Раніше встановлена спектроскопічними методами (^1H та ^{13}C ЯМР) структура похідного **4.23** була підтверджена за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Будова підтверджена як *rel*-(5aSR,11bSR)-2-[2-оксо-(3,5a,6,11b)-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолін-3-іл]-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетамід. Сполука **4.23** побудована з жорсткого тетрациклічного кон'югованого фрагмента, тобто 3,5,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірану.

Проведено дослідження протисудомної активності ряду синтезованих похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу та поділено їх на 4 групи відповідно до впливу на перебіг судомного процесу. До групи **(A)** відносяться похідні, що спричинили незначний вплив на перебіг судом, група **(B)** - це похідні з проконвульсивною дією, група **(C)** - похідні з помірними протисудомними властивостями та група **(D)** - похідні, що викликали виражений протисудомний ефект.

Ідентифіковано потенційні протисудомні агенти 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5a(6H)-іл)оцтової кислоти **2.21**, 2-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-N-(2-(трифторметил)феніл)ацетамід **2.18b** та N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-пропанамід **2.14** який проявив найвищу активність, використання якого спричинило п'ятикратне збільшення латентного періоду настання клінічних судом порівняно з контрольною групою та зменшення кількості мишей із клінічними та тонічними судомами на 60% і 63.33% відповідно. Також смертність знизилась на

63.33 і 20% відповідно, кількість нападів - у 4.62 раза, а вираженість судом - удвічі порівняно з контрольною групою.

У результаті проведення молекулярного докінгу з рецептором GABA_A встановлено що сполуки 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)-N-(2-(трифторметил)феніл) ацетамід **2.18b** та N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)пропанамід **2.14** мають високу спорідненість до рецептора GABA_A, з докінг-балами, вищими за показники діазепаму та флумазенілу. Водночас похідне 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5а(6H)-іл)оцтової кислоти **2.21**, виявило дещо нижчий рівень афінності. Накладання позицій діазепаму та N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду **2.14** показало, що обидві молекули зв'язуються з одними й тими самими амінокислотними залишками. Як відомо, флумазеніл - антагоніст бензодіазепінів, - конкурує за той самий сайт зв'язування, проте утворює з ним міцніший комплекс. Отже, зв'язування N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду **2.14** вказує на те, що вона імітує дію діазепаму на рецептори GABA_A.

Проведено поглиблене дослідження для N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду **2.14** протисудомної активності на шести моделях судом, п'ять моделей передбачали хімічне індукування судом, в якості проконвульсантів виступали такі речовини як: пікротоксин, тіосемікарбазид, стрихнін, кофеїн та камфора, у порівнянні з референтними препаратами (натрію вальпроат, карбамазепін, інозин). Одна модель передбачала індукування судом за допомогою електрошоку (максимальний електрошок, MES). В результаті дослідження впливу N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду **2.14** на перебіг пікротоксин-індукованих судом встановлено, що протисудомні властивості досліджуваної сполуки були на рівні натрію вальпроату, проте такі параметри, як латентний період та кількість нападів

на одну мишу були навіть дещо кращими. У стрихніновій моделі **2.14** знижувала частоту клонічних і тонічних судом на 28,57% та летальність на 28,6% відносно контролю, тоді як натрію вальпроат знижував летальність на 71,4% і тяжкість судом у 1,6 раза. У моделі, індукованій кофеїном, **2.14** перевершувала інозин, зменшуючи частку мишей з тонічними судомами на 85,7% (проти 42,9%) і летальність на 42,9% (проти 14,3%). На камфорній моделі **2.14** лише частково проявила ефект, зменшуючи частку тварин із тонічними судомами на 14,3% і подовжуючи латентний період у 1,7 раза, без істотного впливу на летальність, у той час як натрію вальпроат знижував судоми на 42,9%, подовжував латентність у 2,8 рази та повністю запобігав загибелі. У моделі електроіндукованих судом **2.14** показала ефективність, співставну з карбамазепіном: судоми виникали у 20% мишей, тяжкість була нижчою у 1,8 раза, летальність відсутня. На моделі, індукованій тіосемікарбазидом, **2.14** збільшувала латентний період на 22,8%, зменшувала кількість судом до $3,37 \pm 0,80$ (порівняно з $6,33 \pm 1,26$ у групі з натрію вальпроатом) та подовжувала інтервали між судомними нападами, що свідчить про стабілізацію нейрональної активності. Таким чином, **2.14** проявляє модель-залежну протисудомну активність, у деяких випадках перевершуючи референтні препарати, і заслуговує на подальші дослідження як потенційний протисудомний засіб.

На основі проведених *in vitro* досліджень встановлено, що 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5a(6*H*)-іл)-оцтова кислота **2.21**, 2-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)-N-(2-(трифторметил)феніл)ацетамід **2.18b** та N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)-пропанамід **2.14** проявляють низьку цитотоксичність щодо нормальних клітин людини (лімфоцити периферичної крові та НЕК293). При концентрації 100 мкМ жодна зі сполук не досягла рівня IC_{50} для лімфоцитів, а пригнічення життєздатності клітин становило 20,86-29,94%. Найменший ефект спостерігався щодо клітин НЕК293, з максимумом інгібування життєздатності 8,06%.

Із серії синтезованих похідних, 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **3.8** проявив найвищу цитотоксичну активність. У тесті на 52 ракових лініях клітин сполука викликала значне інгібування росту в 25 випадках, з рівнем гальмування від -80,26% до -125,90%. Проведена оцінка селективності показала загальне SI < 3, проте для окремих чутливих ліній значення було значно вищим: OVCAR-4 (SI = 20,94), SR (SI = 11,83), A498 (SI = 15,10), 786-0 (SI = 11,49), BT-549 (SI = 12,00). Це свідчить про перспективність сполуки як потенційного протипухлинного агента з обмеженою, але вираженою вибірковістю.

У результаті виконаної роботи синтезовано низку нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних із використанням реакцій [4+2]-циклоконденсації та доміно-підходів. Виявлено чіткий зв'язок між структурою та біологічною активністю, що дозволило ідентифікувати три сполуки з вираженим протисудомним потенціалом у різних експериментальних моделях (стрихнін-, кофеїн-, камфора-, тіосемікарбазид- та електроіндуковані судоми), а також одну сполуку з широким спектром протипухлинної активності *in vitro*. Визначено низький рівень токсичності найбільш активних речовин щодо нормальних клітин людини (лімфоцитів периферичної крові, НЕК293), що вказує на сприятливі токсикометричні параметри та перспективність цих структур як вихідних сполук для створення нових протисудомних і протипухлинних лікарських засобів.

За матеріалами дисертації опубліковано **10** наукових робіт.

Ключові слова: синтез, тіазолідинони, тіопірано[2,3-*d*]тіазоли модифікація, реакція Кньюенагеля, реакція *гетеро*-Дільса-Альдера, протиракова активність, протисудомна активність, докінгові дослідження.

Abstract

Hoidyk M.V. *Synthesis and Biological Activity of New Chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-d]thiazoles and Their 3-Substituted Derivatives.*

Qualification scientific work submitted as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 226 – Pharmacy, Industrial Pharmacy (22 – Health Care). Danylo Halytsky Lviv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2026.

The dissertation is devoted to the synthesis of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives and their 3-substituted analogues, study of their physicochemical properties, and study of their biological activity. Based on an analysis of current literature data, the choice of synthetic approaches for obtaining the target compounds was substantiated, in particular using [4+2]-cyclocondensation, domino Knoevenagel-*hetero*-Diels-Alder reactions, as well as alkylation, acylation, and cyanoethylation methods. A systematic approach to the construction of a chemical library ensured structural diversity and created a basis for evaluating structure–activity relationships with respect to cytotoxic effects on tumor cells. A number of synthesized compounds were investigated for potential anticonvulsant activity using *in silico* prediction, molecular docking models, and assessment of ADME/PK parameters. The screening results revealed promising molecules, allowing these structures to be considered as a basis for the development of new antiepileptic drug candidates.

It was shown that the domino Knoevenagel-*hetero*-Diels-Alder reaction is a fairly efficient and relatively simple method for obtaining condensed thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives. The advantage of this reaction is the rapid formation of complex frameworks from relatively simple and readily available reagents with minimal solvent consumption, which corresponds to modern trends in medicinal chemistry. Thus, due to the domino Knoevenagel-*hetero*-Diels-Alder reaction, it was possible to combine thiopyrane and thiazole fragments within one molecule, which is a promising approach. This strategy opens broad opportunities, since thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles may exhibit anticonvulsant, antitumor, antimicrobial, and antifungal activities, making this class of compounds important for further research.

Optimal conditions for the domino Knoevenagel-*hetero*-Diels-Alder reaction using 4-thioxo-2-oxothiazolidinone **2.1** and 2-allyloxybenzaldehyde **2.2a-j** derivatives were established as acetonitrile medium and EDDA. The synthesis of the target 9-(prop-2-yn-1-yloxy)-2*H*,6*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-2-one **3.8**

proceeded with nearly identical yields regardless of whether acetonitrile/EDDA or acetic acid/sodium acetate was used as the reaction medium. Due to the presence of a propargyl fragment in the aldehyde structure, the reaction proceeded through the formation of an intermediate product, which was oxidized to form an aromatic system.

The synthesis of N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14** was carried out by two methods. One method involved cyanoethylation of the basic framework followed by a series of chemical transformations. The alternative method involved reacting the starting thiopyrano-thiazole directly with 3-chloro-N-(4-chlorophenyl)propanamide **2.12** in an alcoholic KOH solution. This method was more advantageous due to a smaller number of reaction steps and solvent savings.

Under [4+2]-cycloaddition conditions between heterodiene structures derived from 5-(2-hydroxybenzylidene)-4-thioxothiazolidin-2-one **2.15** and dienophilic reagents (acrolein and itaconic acid), condensed derivatives of 2-(10-nitro-2,6-dioxo-3,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-5a(6*H*)-yl)acetic acid **2.21** and 6-hydroxy-3,5a,6,11b-tetrahydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-2-one **2.17** were obtained.

As a continuation of the development of this research topic, a series of thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles bearing a pyrazoline fragment at the N-3 position of the thiazolidine ring **4.2b,c**, **4.6–4.8**, **4.10**, **4.23**, as well as their structural analogues **4.14a–c** and **4.16**, were synthesized. These compounds are based on the 5,5,8-trimethyl-3,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydro-2*H*-isothiochromeno[3,4-*d*]thiazol-2-one scaffold **4.12**. For the synthesis of 9-(2-(5-(4-chlorophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-2-oxoethoxy)-2*H*,6*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-2-one **4.21**, a fundamentally different synthetic approach was employed, demonstrating the structural diversity of this class of compounds and the potential for their further functionalization.

The structure of derivative **2.46**, previously established by spectroscopic methods (¹H and ¹³C NMR), was confirmed by X-ray crystallographic analysis. The structure was confirmed as *rel*-(5a*SR*,11b*SR*)-2-[2-oxo-(3,5a,6,11b)-tetrahydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazolin-3-yl]-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-acetamide.

Compound **2.46** is derivative of a rigid tetracyclic conjugated fragment, namely 3,5,5a,6,11b-tetrahydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrane.

The anticonvulsant activity of a series of synthesized thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives was studied, and they were divided into four groups according to their effect on seizure progression: group (A) compounds with negligible effects; group (B) compounds with proconvulsant activity; group (C) compounds with moderate anticonvulsant properties; and group (D) compounds exhibiting pronounced anticonvulsant effects.

Potential anticonvulsant agents were identified, including 2-(10-nitro-2,6-dioxo-3,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-5a(6*H*)-yl)acetic acid **2.21**, 2-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)-N-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide **2.18b**, and N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14**, the latter showing the highest activity. Its use resulted in a fivefold increase in the latent period of seizure onset compared to the control group and a reduction in the number of mice with clonic and tonic seizures by 60% and 63.33%, respectively. Mortality decreased by 63.33% and 20%, respectively, the number of seizures decreased 4.62-fold, and seizure severity was reduced by half compared to the control group.

Molecular docking studies with the GABA_A receptor showed that 2-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)-N-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide **2.18b** and N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14** exhibited high affinity for the GABA_A receptor, with docking scores exceeding those of diazepam and flumazenil. The derivative 2-(10-nitro-2,6-dioxo-3,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-5a(6*H*)-yl)acetic acid **2.21** showed slightly lower affinity. Superposition of diazepam and N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14** demonstrated that both molecules bind to the same amino acid residues. As flumazenil, a benzodiazepine antagonist, competes for the same binding

site but forms a stronger complex, the binding of the studied compound indicates that it mimics the action of diazepam at the GABA_A receptor.

An in-depth study of the anticonvulsant activity of N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14** was conducted using six seizure models: five chemically induced models (picrotoxin, thiosemicarbazide, strychnine, caffeine, and camphor) and one electrically induced model (maximal electroshock, MES). In the picrotoxin-induced seizure model, the anticonvulsant properties of the compound were comparable to sodium valproate, while the latent period and the number of seizures per mouse were even slightly better.

The anticonvulsant activity of compound **2.14** N-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide was studied in five experimental models: seizures induced by strychnine, caffeine, camphor, electrostimulation, and thiosemicarbazide, in comparison with reference drugs (sodium valproate, carbamazepine, inosine). In the strychnine model, **2.14** reduced the frequency of clonic and tonic seizures by 28.57% and mortality by 28.6% compared to control, whereas sodium valproate reduced mortality by 71.4% and seizure severity 1.6-fold. In the caffeine-induced model, **2.14** outperformed inosine, reducing the proportion of mice with tonic seizures by 85.7% (vs. 42.9%) and mortality by 42.9% (vs. 14.3%). In the camphor model, **2.14** showed partial efficacy, reducing tonic seizures by 14.3% and prolonging the latent period 1.7-fold without significantly affecting mortality, while sodium valproate reduced seizures by 42.9%, prolonged latency 2.8-fold, and completely prevented death. In the electroshock model, **2.14** demonstrated efficacy comparable to carbamazepine: seizures occurred in 20% of mice, severity was reduced 1.8-fold, and mortality was absent. In the thiosemicarbazide-induced model, **2.14** increased the latent period by 22.8%, reduced the number of seizures to 3.37 ± 0.80 (compared to 6.33 ± 1.26 for sodium valproate), and prolonged intervals between seizures, indicating stabilization of neuronal activity. Thus, **2.14** exhibits model-dependent anticonvulsant activity, in some cases exceeding reference drugs, and merits further investigation as a potential anticonvulsant agent.

Based on *in vitro* studies, it was established that 2-(10-nitro-2,6-dioxo-3,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-5a(6*H*)-yl)acetic acid **2.21**, 2-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)-*N*-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide **2.18b**, and *N*-(4-chlorophenyl)-3-(2-oxo-5a,11b-dihydro-2*H*,5*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-3(6*H*)-yl)propanamide **2.14** exhibit low cytotoxicity toward normal human cells (peripheral blood lymphocytes and HEK293). At a concentration of 100 μ M, none of the compounds reached the IC₅₀ level for lymphocytes, and inhibition of cell viability ranged from 20.86% to 29.94%. The lowest effect was observed for HEK293 cells, with a maximum viability inhibition of 8.06%.

Among the synthesized derivatives, 9-(prop-2-yn-1-yloxy)-2*H*,6*H*-chromeno[4',3':4,5]thiopyrano[2,3-*d*]thiazol-2-one **3.8** exhibited the highest cytotoxic activity. In a panel of 52 cancer cell lines, the compound caused significant growth inhibition in 25 cases, with inhibition levels ranging from -80.26% to -125.90%. Selectivity assessment showed an overall SI < 3; however, for certain sensitive lines the values were much higher: OVCAR-4 (SI = 20.94), SR (SI = 11.83), A498 (SI = 15.10), 786-0 (SI = 11.49), and BT-549 (SI = 12.00). This indicates the promise of the compound as a potential anticancer agent with limited but pronounced selectivity.

As a result of this work, a series of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles and their 3-substituted derivatives were synthesized using [4+2]-cyclocondensation and domino approaches. A clear relationship between structure and biological activity was revealed, enabling identification of three compounds with pronounced anticonvulsant potential in various experimental models (strychnine-, caffeine-, camphor-, thiosemicarbazide-, and electroshock-induced seizures), as well as one compound with a broad spectrum of *in vitro* antitumor activity. A low level of toxicity of the most active substances toward normal human cells (peripheral blood lymphocytes, HEK293) was established, indicating favorable toxicometric parameters and the promise of these structures as lead compounds for the development of new anticonvulsant and anticancer drugs.

Based on the dissertation materials, **10 scientific papers** were published.

Key words: synthesis, thiazolidinones, thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles, modification, Knoevenagel reaction, *hetero*-Dils-Alder reaction, anticancer activity, anticonvulsant activity, docking studies.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

1. Mishchenko M., Shtrygol S., Lozynskyi A., Hoidyk M., Khylyuk D., Gorbach T., Lesyk R., (2022). Evaluation of 5-[(Z)-(4-nitrobenzylidene)]-2-(thiazol-2-ylimino)-4-thiazolidinone (Les-6222) as Potential Anticonvulsant Agent. *Scientia Pharmaceutica* 90 (3), 56 doi.org/10.3390/scipharm90030056 (*Концептуалізація: S.S. та R.L.; методологія та експериментальна робота: M.M., M.H., D.K. та T.G.; аналіз даних: S.S., A.L. та R.L.; написання, рецензування та редагування: M.M., S.S., A.L., D.K. та R.L.; керівництво проєктом та нагляд: S.S. та R.L.*)

2. Davydov E., Hoidyk M., Shtrygol S., Karkhut A., Polovkovych S., Klyuchivska O., Karpenko O., Lesyk R., Holota S., (2024). Evaluation of thiopyrano[2,3-*d*]thiazole derivatives as potential anticonvulsant agents. *Archiv der Pharmazie* 357 (10), e2400357, doi:10.1002/ardp.202400357. (*Концептуалізація: S.S. та R.L.; методологія та експериментальна робота: M.H., D.K. та S.H.; аналіз даних: D.E., K.S. та R.L.; написання, рецензування та редагування: D.E., S.H., S.S., K.O., K.A., P. S. та R.L.; керівництво проєктом та нагляд: S.S. та R.L.*)

3. Stasevych M., Hoidyk M., Roman O., Konechna R., Karkhut A., Lozynskyi A., Polovkovych S., Lesyk R., (2025). Structural-fragment analysis of active pharmaceutical ingredients of antiepileptic drugs in group N03A of the Ukrainian pharmaceutical market and their pharmacophoric features. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 20-34. doi: 10.15587/2519-4852.2025.337842 (*опрацювання результатів дослідження, редагування та затвердження остаточного варіанту - S. M., H M., R. O., K. R., K. A., L. A.; редагування та затвердження остаточного варіанту - S. M., P. S., L. R.; створення концепції, опрацювання результатів дослідження, редагування та затвердження остаточного варіанту - P. S., L. R.;*).

4. Hoidyk M., Karkhut A., Polovkovych S., Lesyk R., (2025). Synthesis, structural characterization and antitumor activity of new chromeno [4', 3': 4, 5] thiopyrano[2, 3-*d*]thiazole derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 37-49.

doi: 10.15587/2519-4852.2025.341796 (дослідження, методологія, кураторство даних - Н. М.; формальний аналіз, валідація, ресурси - К. А.; концептуалізація, підготовка оригінального рукопису, адміністрування проєкту - Р. С.; наукове керівництво, рецензування та редагування, концептуалізація - Л. Р.)

5. Hoidyk, M., Karkhut, A., Polovkovych, S., Lesyk, R. (2025). Knoevenagel-hetero-Diels-Alder tandem and domino reactions as a platform for designing biologically relevant molecules in organic and medicinal chemistry: A review. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, (6), doi: 15-38.10.32434/0321-4095-2025-163-6-15-38 (дослідження, методологія, кураторство даних - Н. М.; формальний аналіз, валідація, ресурси - К. А.; концептуалізація, підготовка оригінального рукопису, адміністрування проєкту - Р. С.; наукове керівництво, рецензування та редагування, концептуалізація - Р. С. та Л. Р.)

Тези доповідей

1. М. Гойдик, А. Лозинський, Н. Леб'як, А. Кархут, С. Половкович, Р. Лесик. Доміно Реакції Гетеро-Дільса-Альдера у синтезі поліконденсованих похідних тiazолотіопірану. XXI Наукова конференція «Львівські хімічні читання - 2023» м.Львів, Україна, 29-31 травня 2023, О59, с-188. (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку).

2. М. Гойдик, А. Лозинський, А. Кархут, С. Половкович, Р. Лесик. Синтез та функціоналізація поліконденсованих похідних тіопірано[2,3-d]тіазолів. Міжнародна науково-практична конференція «КиївЛьвівФарма. Фармацевтичні технології і фармакологія в забезпеченні активного довголіття» 16-18 листопада 2023р. (с. 103-104). (Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку).

3. Гойдик М. В. Голота С.М, Кархут А.І, Половкович С.В, Лесик Р.Б. Синтез та вивчення біологічної активності нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу. XXVI Українська конференція з органічної та біоорганічної хімії, 16-

20 вересня 2024. м. Ужгород, Україна. С-61. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку).*

4. Давидов Е.М., Штриголь С.Ю., Гойдик М.В., Лесик Р.Б. Антikonвульсанта ефективність нового похідного Тіопірано[2,3-d]тіазолу на моделі електро-індукованих судом. I Міжнародна науково-практична online конференція «Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології». 7 березня, 2024, м. Харків, Україна, (с. 519-521) *(Особистий внесок автора: узагальнення результатів, підготовка тез до друку).*

5. Гойдик М. В. Голота С.М, Кархут А.І, Половкович С.В, Лесик Р.Б. (2025). Доміно-реакція Кньювеная-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі поліконденсованих похідних тіазолотіопірану. УЗ9. XX Наукова Конференція “Львівські Хімічні Читання - 2025”. м. Львів, Україна. *(Особистий внесок автора: експериментальна частина роботи, узагальнення результатів, підготовка тез до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. РЕАКЦІЇ ДОМІНО В ОРГАНІЧНОМУ СИНТЕЗІ ТА МЕДИЧНІЙ ХІМІЇ.....	27
1.1. Доміно-реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі конденсованих структур	28
1.1.1. Доміно-реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі конденсованих структур, що включають індоловий, тіопірановий та хроменовий фрагменти	29
1.1.2. Доміно-реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі похідних, тетрагідропірану.....	33
1.1.3. Доміно-реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі похідних хромено-тіопірано-тіазолів	35
1.2. Потенціал тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазолів у дизайні біологічно активних малих молекул	45
РОЗДІЛ 2. СИНТЕЗ ТА ХІМІЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ КОНДЕНСОВАНИХ ХРОМЕНО-ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛІВ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ.....	55
2.1. Синтез базових тіопірано-тіазолових каркасів	55
2.1.1. Синтез 2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону ..	59
2.1.2. Синтез 3-(2-оксо-5 <i>a</i> ,11 <i>b</i> -дигідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-3(6 <i>H</i>)-іл)пропанонітрилу	62
2.1.3. Синтез N-(4-хлорфеніл)-3-(2-оксо-5 <i>a</i> ,11 <i>b</i> -дигідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-3(6 <i>H</i>)-іл)пропанаміду	64
2.1.4. Синтез 6-гідрокси-3,5 <i>a</i> ,6,11 <i>b</i> -тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону.	66
2.1.5 Синтез деяких 3-заміщених похідних з ацетамідними замісниками.	67

2.1.6 Синтез 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено [4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-5а(6 <i>H</i>)-іл)оцтової кислоти	70
2.2. Вивчення протисудомної активності синтезованих похідних тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазолу	72
2.2.1. Пентилентетразолова модель судом scPTZ	73
2.3. Молекулярний докінг.....	81
2.3.1. Молекулярна динаміка прогнозування стабільності комплексу похідного 2.14 та GABA _A (MD) simulation	83
2.4. Поглиблене вивчення протисудомної активності похідного 2.14 на шести моделях судом	86
2.4.1. Пікротоксин-індуковані судоми	89
2.4.2. Судоми, індуковані тіосемікарбазидом	91
2.4.3. Судоми, індуковані стрихніном	92
2.4.4. Судоми, індуковані кофеїном	94
2.4.5. Судоми, індуковані камфорою	96
2.4.6. Модель електроіндукованих судом (MES)	98
2.5 Молекулярний докінг.....	100
2.6 In vitro дослідження цитотоксичності сполук 2.14, 2.18b, і 2.21	107
2.8 Опис експериментів	108
2.8.1. Хімічні дослідження.....	108
2.8.2. Вивчення цитотоксичності синтезованих сполук (МТТ тест)	111
Висновки до розділу 2.....	112
РОЗДІЛ 3. СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛІВ ТА ЇХ 3-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ	115
3.1. Одержання цільових 3-(2- та 3-хлоробензил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону ..	115
3.2. Одержання цільового 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону	117
3.3. Синтез водорозчинної солі 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону.....	120

3.4. Синтез 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону	122
3.5. Дослідження протипухлинної активності	124
3.6. Опис експериментів.....	133
3.6.1. Хімічні дослідження.....	133
Висновки до розділу 3.....	135
РОЗДІЛ 4. СИНТЕЗ 3-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛУ ТА ІЗОТІОХРОМЕНО-ТІАЗОЛУ.....	137
4.1. Синтез тіопірано-тіазолів з 1-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1 <i>H</i> -піразол-1-іл)етан-1-оновим замісником	138
4.2. Синтез 3-(3-(5-(4-фторфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1 <i>H</i> -піразол-1-іл)-3-оксопропіл)-3,5а,6,11 <i>b</i> -тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону та 3-(4-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1 <i>H</i> -піразол-1-іл)-4-оксобутил)-3,5а,6,11 <i>b</i> -тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано [2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону	140
4.3. Синтез похідного 3-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1 <i>H</i> -піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11 <i>b</i> -тетрагідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону з нафталеновим фрагментом у молекулах	143
4.4. Синтез 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2 <i>H</i> -ізотіохромено[3,4- <i>d</i>]тіазол-2-ону	145
4.5. Синтез 3 заміщених похідних на основі 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2 <i>H</i> -ізотіохромено[3,4- <i>d</i>]тіазол-2-ону.	148
4.6. Синтез цільового N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2 <i>H</i> -ізотіохромено[3,4- <i>d</i>]тіазол-3(5 <i>H</i>)-іл)ацетаміду.	149
4.7. Синтез 9-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1 <i>H</i> -піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-2-ону.....	151
4.8. Синтез цільового 2-(2-оксо-5а,11 <i>b</i> -дигідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-3(6 <i>H</i>)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду.	153

4.8.1. Рентгеноструктурне дослідження 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3- <i>d</i>]тіазол-3(6 <i>H</i>)-іл)- <i>N</i> -(3,4,5-триметокси-феніл)ацетаміду.	155
4.9. Комплексний аналіз ¹ H ЯМР та РСА як основа структурної діагностики та пояснення діастереотопності метиленових протонів - <i>N</i> -CH ₂ -C(O)-фрагмента.	158
4.10. Опис експериментів.....	162
4.10.1. Хімічні дослідження.....	162
Висновки до розділу 4.....	163
ВИСНОВКИ.....	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ADME - Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
BRCA – Breast Cancer
DTP NCI – Developmental Therapeutic Program of National Cancer Institute
GI₅₀ – концентрація, яка викликає пригнічення росту 50% клітин лінії
GP – відсотки росту
GABA_A - gamma-aminobutyric acid type A receptor
HEK - Human embryonic kidney
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
IC₅₀ – концентрація напівмаксимального інгібування
MDR – Multiple Drug Resistance
PAINS – Pan-assay Interference Compounds
ROESY – Rotating-Frame NOE Spectroscopy
SI – індекс селективності
FDA - Food and Drug Administration
COX – cyclooxygenases
LOX - Lysyl oxidase
scPTZ - Study carried Pentylentetrazole
mTOR - mammalian Target of Rapamycin
MES - максимальні електрошокові судоми
ГДА - *гетеро*-Дільса-Альдера
ДМСО – диметилсульфоксид
ДМФА – диметилформамід
ДМФА-ДМА – диметилформамід диметилацеталь
ЕДДА – етилендіаміндіацетат
ДКГДА - доміно-реакція Кньювенегеля-*гетеро*-Дільса-Альдера
ДХМ - дихлорметан
ЕДДА – етилендіаміндіацетатом
МІК – мінімальна інгібувальна концентрація
ЯМР - Ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Доміно реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера давно відома як ефективний метод одержання складних конденсованих структур з відносно простих та доступних реагентів, а відсутність багатьох стадій синтезу дозволяє економити розчинники, що відповідає сучасним тенденціям. Реакція Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера дозволяє об'єднати хроменовий, тіопірановий та тіазольний фрагменти в межах однієї молекули, утворюючи конденсовані гетероциклічні структури які становлять інтерес у хіміків по всьому світу. Дані каркаси володіють широким спектром активностей, серед яких: протимікробна, антибактеріальна, протигрибкова, протипухлинна, протизапальна та протисудомна. Таким чином, з відносно не великими затратами можна одержати ряд сполук з зміненим профілем селективності, різноманітними та/або комбінованими механізмами дії, а також задовільними показниками токсикометричних параметрів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом комплексної науково-дослідної роботи ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» (державна реєстрація 0121U107504) та в рамках виконання проекту ДБ/ПРОТЕП «Пошук нових потенційних антиконвульсантних агентів для терапії посттравматичної епілепсії серед військовослужбовців та цивільного населення» (державна реєстрація № 0125U001794).

Мета та завдання дослідження. Створення ряду сполук на основі тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних, їх молекулярне моделювання та віртуальний скринінг, вивчення фармакологічної активності, дослідження особливостей зв'язку структура-активність одержаних сполук, з метою відбору високоактивних сполук із мінімальними показниками токсикометричних параметрів як потенційних кандидатів у лікарські засоби.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- синтезувати ряд базових конденсованих гетероциклічних структур похідних хромено-тіопірано-тіазолів та їх структурних аналогів, зокрема похідних ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону;

- здійснити хімічну модифікацію нуклеофільного центру в положенні 3 тіазолідинового циклу;

- запропонувати ефективні методи синтезу та хімічної модифікації хромено-тіопірано-тіазолів та їх 3-заміщених похідних;

- для синтезованих сполук дослідити протипухлинну та протисудомну активності *in vitro*, а також виділити «сполуки-хіти» для подальших поглиблених досліджень;

- для сполук-хітів здійснити *in vitro* дослідження токсикометричних параметрів.

- провести *in silico* дослідження методом молекулярного докінгу молекул, обґрунтувати імовірний механізм дії та сформулювати прогностичні характеристики для дизайну нових потенційних «лікоподібних» молекул.

Об'єкт дослідження: реакції [2+3]-циклоконденсації, реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера, фізико-хімічні та біологічні властивості.

Предмет дослідження: конденсовані тіопірано[2,3-*d*]тіазоли та їх 3-заміщені похідні як потенційні біологічно активні сполуки.

Методи дослідження: органічний синтез, ІЧ, ¹H та ¹³C ЯМР спектроскопія, хромато-мас-спектрометрія, елементний аналіз, рентгеноструктурний аналіз, фармакологічні дослідження *in vitro* та *in silico*.

Наукова новизна отриманих результатів.

Синтезовано ряд тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних в структурі яких поєднуються різні фармакофорні фрагменти та ідентифіковано сполуки-лідери, які проявили найвищу протисудомну активність, а саме: *rel*-N-(4-[хлорофеніл]-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]-тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-3(6H)-іл]пропанамід **2.14**, 2-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)-N-(2-(трифторметил)-

феніл)ацетамід **2.18b** та 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5a(6H)-іл)оцтова кислота **2.21**.

Встановлено, що показники за якими оцінювався протисудомний потенціал *rel-N*-(4-[хлорофеніл)-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-3(6H)-іл]пропанаміду **2.14** були на рівні показників препарату порівняння натрію вальпроату, в деяких випадках навіть перевищували їх.

Проведено поглиблене дослідження протисудомної дії *rel-N*-(4-[хлорофеніл)-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл]пропанаміду **2.14** на шести моделях судом. Встановлено, що із 6 гострих моделей судомного синдрому похідне продемонструвало значну протисудомну дію на 4 моделях судом, а саме: у моделях хімічно індукованих судом - пікротоксинових, стрихнінових, кофеїнових, а також в електрично індукованій моделі.

Проведено аналіз цитотоксичності **2.14**, **2.18b** і **2.21** по відношенню до лімфоцитів ізольованих з периферичної крові дорослих людей і ембріонів нирок людини та встановлено, що сполуки проявили низьку токсичність, що робить дані молекули перспективними для подальшого вивчення.

Завдяки методам молекулярного докінгу встановлено, що *rel-N*-(4-[хлорофеніл)-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-3(6H)-іл]пропанамід **2.14** та 2-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6H)-іл)-N-(2-(трифторметил)феніл)-ацетамід **2.18b** мають високу спорідненість до рецептора GABA_A, з докінг-балами, вищими за показники діазепаму та флумазенілу. Накладання позицій діазепаму та сполуки *rel-N*-(4-[хлорофеніл)-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*][1,3]тіазол-3(6H)-іл]пропанаміду **2.14** показало, що обидві молекули зв'язуються з одними й тими самими амінокислотними залишками отже сполука імітує дію діазепаму на рецептори GABA_A.

Синтезовано серію похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу шляхом каскадної реакції Кновенагеля-гетеро-Дільса-Альдера з подальшим N3-алкілуванням та проведена оцінка їх протипухлинної активності *in vitro* у панелі клітин людини NCI-60. В результаті проведення скринінгу ідентифіковано сполуку 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **3.8**, яка спричинила повну загибель клітин OVCAR-4 (рак яйників, LC₅₀ = 29,5 мкМ), а також істотно інгібувала ріст клітин SR (лейкемія, GI₅₀ = 0,676 мкМ), 786-0 (рак нирок, 0,696 мкМ), A498 (рак нирок 0,528 мкМ) та BT-549 (рак молочної залози, 0,666 мкМ).

Практичне значення одержаних результатів. Здійснено синтез та функціоналізацію тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних, досліджено їх фізико-хімічні параметри. На основі скринінгу біологічної активності ідентифіковано та досліджено нові високоефективні молекули з протипухлинною та протисудомною дією, які рекомендовано для подальших детальних досліджень.

Особистий внесок здобувача. У ході виконання роботи автором було здійснено проведення експериментальної частини, узагальнення отриманих результатів та формулювання основних положень і висновків, що будуть представлені на захист. Співавторами наукових праць є наукові керівники та дослідники, з якими проводились спільні фізико-хімічні та біологічні дослідження.

Апробація результатів дослідження. Основні результати дисертаційної роботи було представлено на:

1. XXI Наукова конференція «Львівські хімічні читання - 2023», м.Львів, Україна, 29-31 травня 2023- публікація тез.

2. Міжнародна науково-практична конференція «КиївЛьвівфарма. Фармацевтичні технології і фармакологія в забезпеченні активного довголіття» 16-18 листопада 2023- публікація тез, стендова доповідь.

3. XXVI Українська конференція з органічної та біоорганічної хімії, 16-20 вересня 2024. м. Ужгород, Україна. публікація тез, стендова доповідь.

4. I Міжнародна науково-практична online конференція «Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології». 7 березня, 2024, м. Харків, Україна, - публікація тез.

5. XX Наукова Конференція “Львівські Хімічні Читання - 2025”. м. Львів, Україна. - публікація тез, усна доповідь.

6. Робота заслухана та обговорена на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького (Львів, 2025).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, з них 5 статей у журналах, які індексуються в наукометричних базах даних Scopus і Web of Science (2 статті у міжнародних фахових виданнях *Archiv der Pharmazie*, *Scientia Pharmaceutica*, 3 статті у вітчизняних фахових виданнях) та 5 тез доповідей, включених до збірників матеріалів конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 190 сторінках друкованого тексту, з яких 112 основного тексту. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, трьох розділів власних досліджень, висновків, списку використаної літератури. Робота ілюстрована 30 таблицями та 94 рисунками. Список використаних джерел містить 180 найменувань.

РОЗДІЛ 1

РЕАКЦІЇ ДОМІНО В ОРГАНІЧНОМУ СИНТЕЗІ ТА МЕДИЧНІЙ ХІМІЇ.

Доміно, каскадні або тандемні реакції становлять потужний інструментарій для органічного синтезу, що дозволяє створювати складні молекулярні структури шляхом послідовного формування кількох хімічних зв'язків у межах однієї синтетичної операції. У своїй знаковій оглядовій роботі *Domino Reactions in Organic Synthesis*, опублікованій у журналі *Chemical Reviews* у 1996 році, L. F. Tietze визначив доміно-реакції як ключову синтетичну методологію, що надає суттєві переваги, зокрема високу ефективність, атомну економію та зменшення утворення побічних продуктів.

Значущість доміно-реакцій у фармації зумовлена їхньою здатністю ефективно формувати біологічно релевантні гетероциклічні системи - ключові фрагменти активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ). Такі стратегії дозволяють зменшити кількість етапів синтезу, витрату розчинників та вплив на довкілля. Доміно-реакції характеризуються здатністю здійснювати дві або більше послідовних трансформацій, у яких кожна наступна реакція відбувається як прямий наслідок утворення функціональної групи на попередньому етапі. Серед найбільш досліджених реакцій, що поєднують полярні та перициклічні стадії, зокрема є конденсація Кньюенагеля, за якою слідує циклоприєднання *гетеро*-Дільса-Альдера (ГДА). Саме вони формують основу доміно-послідовності реакцій Кньюенагеля-ГДА.

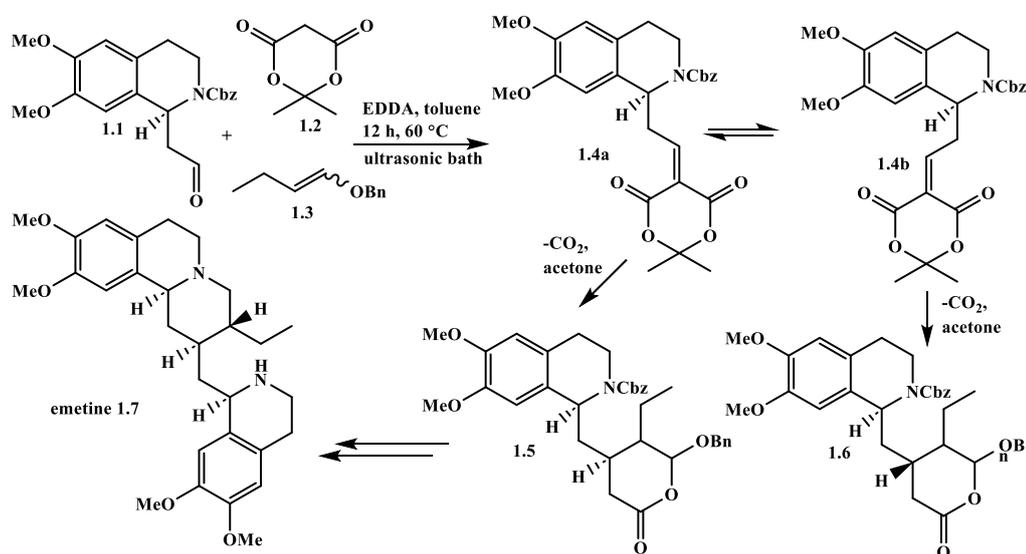
Конденсація Кньюенагеля, яка полягає в основно-каталізованій реакції між карбонільними сполуками та активними метиленовими компонентами, приводить до утворення високоактивних алкенів. Ці проміжні продукти здатні вступати в реакції Дільса-Альдера або *гетеро*-Дільса-Альдера (ГДА), що відкриває шлях до поліфункціональних продуктів зі складною стереохімією. Поєднання цих двох перетворень, відоме як доміно-реакція Кньюенагеля-*гетеро*-Дільса-Альдера (ДКГДА), здобуло визнання завдяки здатності швидко та стереоселективно

утворювати різноманітні гетероцикли за м'яких і часто екологічно дружніх умов. Із часу першої публікації Tietze цей метод став цінним інструментом у медичній хімії, який дедалі частіше використовують для створення бібліотек біологічно активних молекул, у практиках «зеленої хімії» та для тотального синтезу активних фармацевтичних інгредієнтів.

1.1 Доміно-реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі конденсованих структур.

Tietze та Rackelmann [1] зробили вагомий внесок у розвиток каскадної хімії, запропонувавши енантіоселективну доміно-реакцію Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера для синтезу аналогів епіметину (Схема 1) [1].

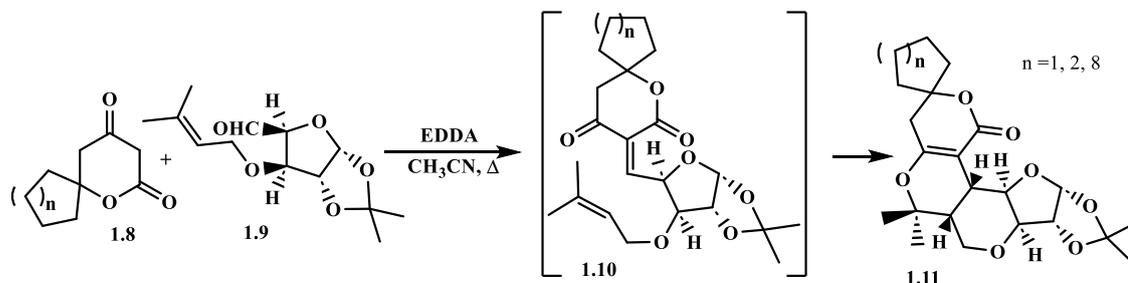
Схема 1



Описана у їхній роботі стратегія передбачала багатокomпонентну реакцію між рацемічними альдегідами **1.1**, кислотою Мельдрума **1.2** та еніл-естерами **1.3**, що призводила до утворення високофункціоналізованих проміжних сполук **1.4a**, **1.4b**. Подальший сольволиз, конденсація з амінами та асиметричне гідрування з використанням хірального каталізатора забезпечили одержання енантімерно чистих тетрагідроізохінолінів **1.5** і **1.6**. Такий підхід продемонстрував важливі принципи економії синтетичних стадій, діастереоселективності та гнучкості у варіюванні функціональних груп. Синтезовані структури проявили цитотоксичну та антипаразитарну активність, що робить цей метод перспективним для медичної хімії та розробки протималарійних і протиракових препаратів.

Sabitha з колегами розробили високо діастереоселективну ДКГДА-реакцію для синтезу дигідропіранів, використовуючи 1,3-дикарбонільні сполуки **1.8** та цукрові альдегіди з дієнофільною групою **1.9** як вихідні речовини (Схема 2) [2]. Реакцію каталізували етилендіаміндіацетатом (ЕДДА) в ацетонітрилі за помірної температури.

Схема 2



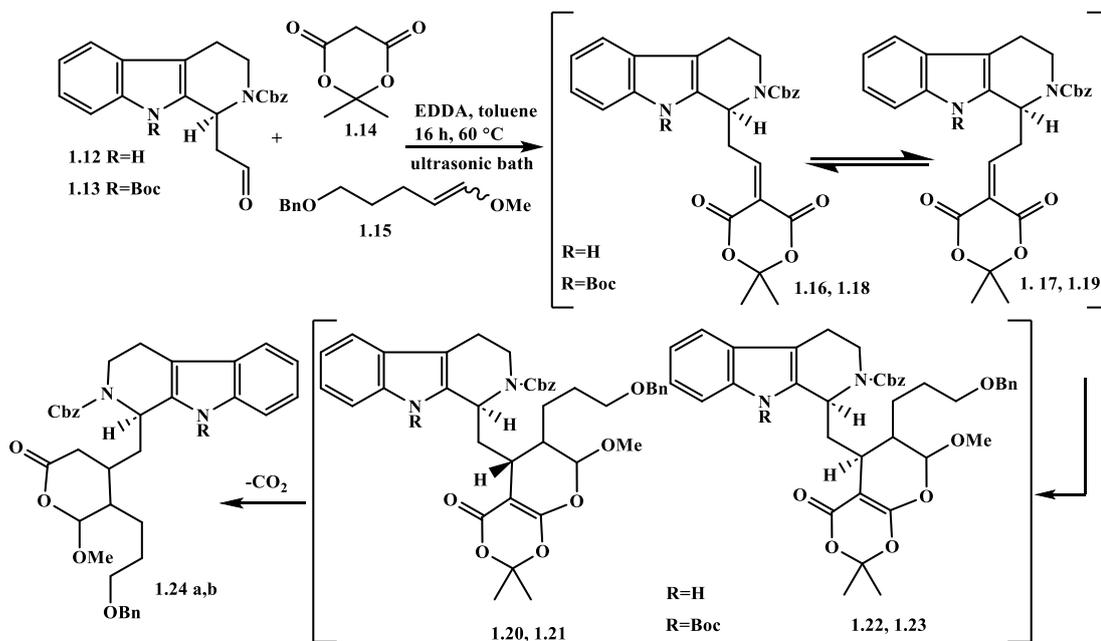
Після конденсації Кньюенагеля утворені проміжні сполуки **1.10** зазнавали внутрішньомолекулярного гетероциклічного приєднання за механізмом *гетеро*-Дільса-Альдера. Отримані каркаси характеризувалися високою *цис*-стереохімією завдяки хіральності вуглеводних попередників. Синтезовані дигідропірани **1.11** демонструють структурну подібність до полігидроксильованих природних сполук з антимікробною активністю, що дозволяє розглядати цей підхід як перспективний для створення глікоміметиків та аналогів нуклеозидів [2].

1.1.1 Доміно-реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі конденсованих структур, що включають індоловий, тіопірановий та хроменовий фрагменти.

Клара у своїй докторській дисертації [3] продемонстрував ефективність каскаду реакцій Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера для повного синтезу складних природних сполук, включаючи алкалоїди йохімбін та камптотецин. Основу цього підходу становили реакції Кньюенагеля між формілзаміщеними аренами та 1,3-дикарбонільними сполуками, що призводили до утворення електронозбагачених алкенів - попередників внутрішньомолекулярної гетероциклізації. Цей метод дозволив стереоселективно побудувати трициклічні системи **1.24a,b**, що містять атоми кисню (Схема 3). Важливо, що стратегія уникала стадій захисту та зняття захисту, спрощуючи одержання кінцевих продуктів і

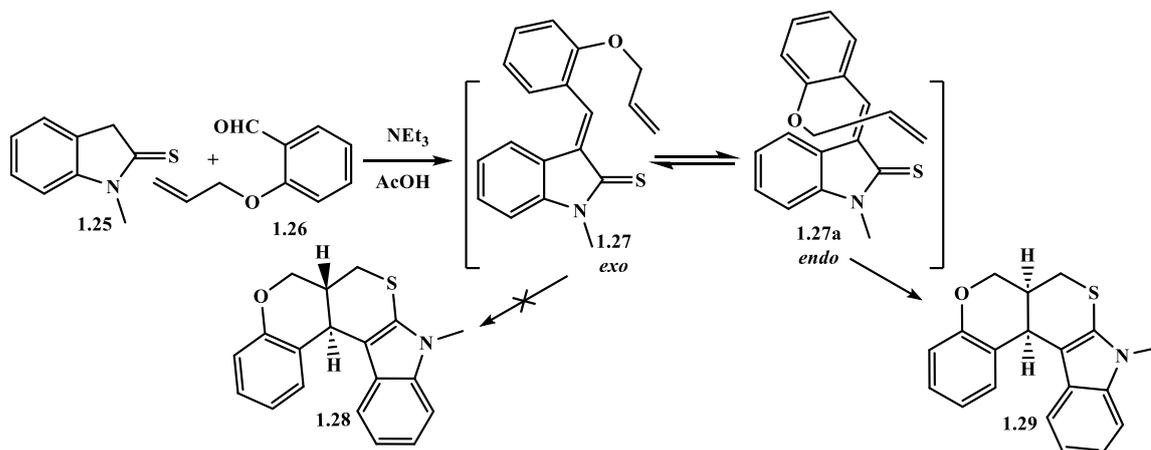
підвищуючи загальну ефективність. Отримані гетероцикли виявили сильну структурну подібність до відомих біоактивних агентів з протипухлинною, протисудомною та нейротропною активністю, що підкреслює універсальність КГДА-реакції для синтезу поліциклічних структур з великою кількістю фармакофорів, у медичній хімії.

Схема 3



У роботі [4] Majumdar K. та співавтори запропонували стратегію проведення ДКГДА-реакції у водному середовищі для побудови нових індолвмісних пентациклічних гетероциклів **1.28**, **1.29**. Реакція здійснювалася за участю *O*-алілсаліцилових альдегідів **1.26** та 1-метиліндолін-2-тіону **1.25** як вихідних сполук і проходила за каскадним механізмом Кньювенегеля-гетеро-Дільса-Альдера у присутності оцтової кислоти та триетиламіну як каталізаторної системи (Схема 4).

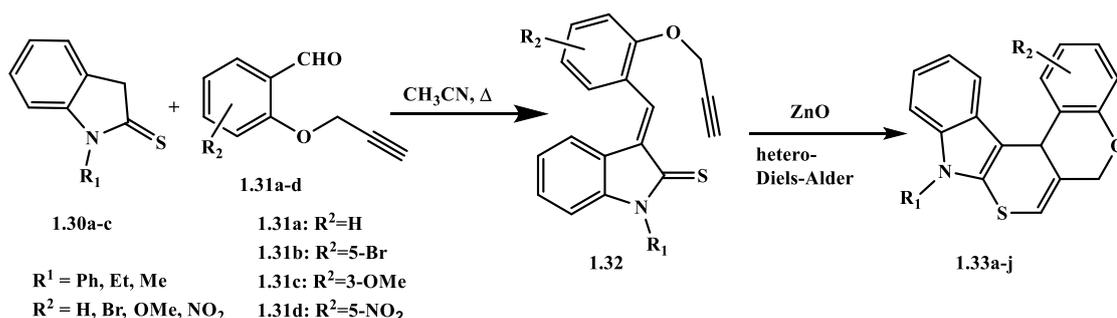
Схема 4



Kiamer та Moghaddam [5] запропонували новий варіант ДКГДА-реакції із використанням наночастинок ZnO як гетерогенного каталізатора для синтезу похідних тіопіранохромену. Реакція між О-пропаргілсаліциловими альдегідами **1.31a-d** та похідними 1-метиліндолін-2-тіону **1.30a-c** у присутності ZnO в ацетонітрилі забезпечила високі виходи поліциклічних структур **1.33a-j** (Схема 5) [5].

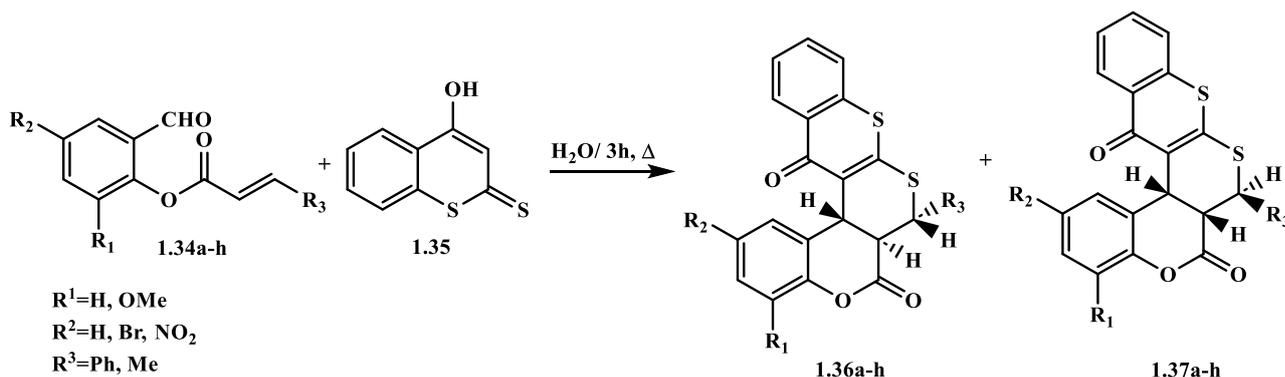
Отримані продукти містять фрагменти із сіркою та киснем як гетероатомами, що притаманні молекулам з антиоксидантною, протизапальною та цитотоксичною активностями. Каталізатор ZnO виявився стабільним і багаторазово придатним до використання, що свідчить про його екологічність і зручність для масштабування процесу. Розроблений метод відповідає принципам зеленої хімії, що робить його привабливим для практичного застосування в медичній хімії.

Схема 5



Moghaddam та співавтори розробили реакцію ДКГДА для синтезу пентациклічних тіопіранокумаринів із використанням 4-гідроксидіокумарину **35** та акриловмісних саліцилальдегідів **1.34a-h** (Схема 6). Цей підхід повністю відповідає принципам «зеленої хімії», оскільки синтез проводиться у водному середовищі без використання розчинників чи каталізаторів [6].

Схема 6

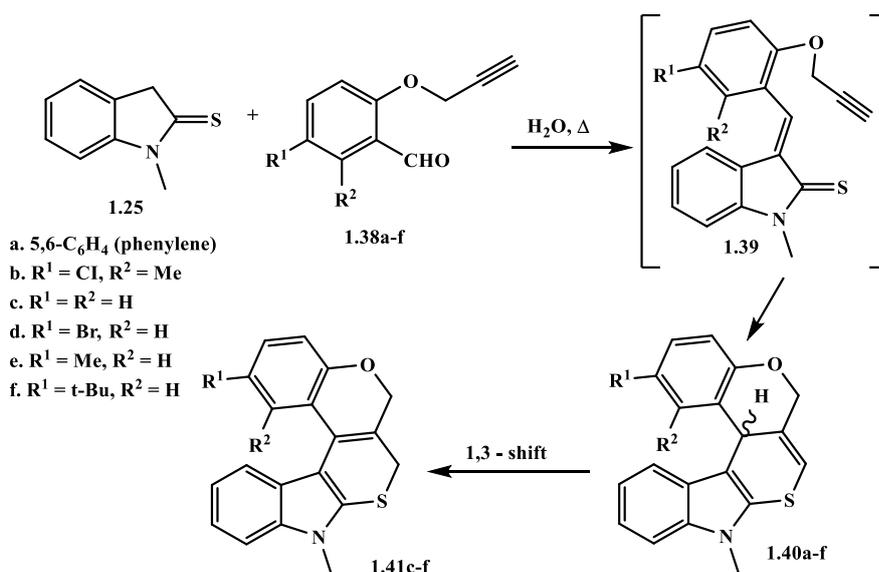


Отримані гетероциклічні похідні **1.36a-h** та **1.37a-h** характеризуються структурними особливостями, що корелюють із потенційною антибактеріальною, антикоагулянтною та протипухлинною активністю, що відкриває перспективи для їх подальшого фармакологічного вивчення. Висока регіоселективність, м'які умови проведення реакції, толерантність до функціональних груп і мінімальна потреба в очищенні свідчать про практичність та масштабованість методу. Цей варіант реакції ДКГДА має значну цінність для створення комбінаторних бібліотек нових лікарських засобів.

Мајумдар та співавтори [7] удосконалили попередні підходи до реакцій ДКГДА, запропонувавши варіант із використанням термінальних алкінів у водному середовищі без каталізаторів. Вихідними компонентами були *o*-пропаргілсаліцилові альдегіди **1.38a-f** та 1-метиліндолін-2-тіон **1.25**, які за умов реакції забезпечували високоефективне утворення конденсованих тіопірано[2,3-*d*]індольних систем **1.41c-f** (Схема 7). Метод характеризувався високою регіоселективністю, високими виходами та повною відсутністю необхідності в органічних розчинниках або металах.

Інтеграція алкінів у логіку доміно-реакцій у воді розширює хімію ДКГДА та демонструє її потенціал у створенні екологічно стійких синтетичних методів для одержання біоактивних полігетероциклів.

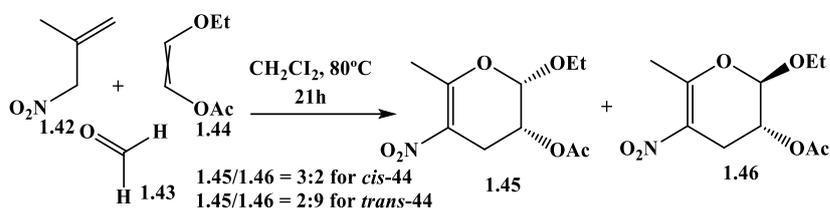
Схема 7



1.1.2 Доміно-реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі похідних, тетрагідропірану.

Tietze та співавтори у 2011 р. [8] запропонували трикомпонентний підхід до реакції ДКГДА для синтезу попередників аміноцукрів - важливих структурних фрагментів у глікозилізованих природних продуктах, таких як макроліди та антрациклінові антибіотики. У каскадному процесі вони використали нітроацетон **1.42**, формальдегід **1.43** та етоксивінілацетат **1.44** (Схема 8). Отримані продукти мали структуру 2-ацетоксиаміновмісних цукрів **1.45** та **1.46** з високим виходом та високою діастереоселективністю.

Схема 8

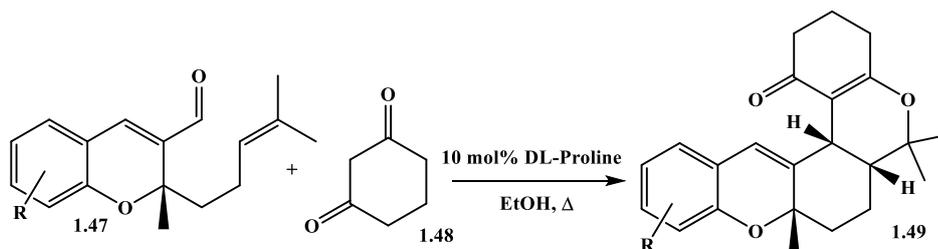


Метод характеризується мінімізацією кількості синтетичних стадій та можливістю введення полярних функціональних груп, що забезпечує ефективне одержання поліоксигенованих гетероциклів. Цей підхід демонструє, як доміно-реакції можна адаптувати для отримання складних біомолекул із потенційною антибіотичною та протипухлинною активністю.

У подальших роботах розглядається можливість інтеграції ДКГДА з іншими хімічними процесами для досягнення ще вищих виходів у синтезі гетероциклів. Особлива увага приділяється ефективності цих реакцій у зменшенні кількості синтетичних стадій та підвищенні селективності, що робить їх привабливими для промислового застосування.

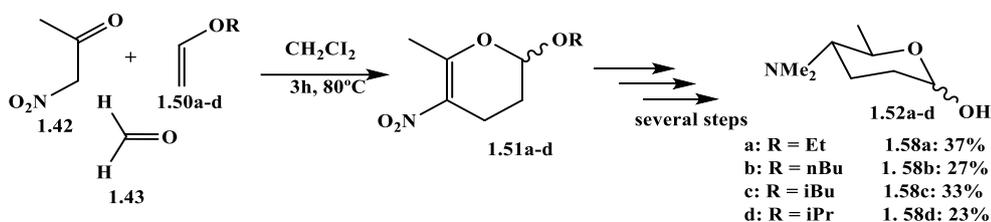
У дослідженні [9] представлено новий метод синтезу октагідрохромено[4,3-а]ксантен-1(2H)-онів **1.49** із використанням 10% DL-проліну як каталізатора в етанолі шляхом реакції ДКГДА між алкеновмісними хромен-3-карбальдегідами **1.47** та циклічними 1,3-дикетонами **1.48** (Схема 9).

Це перший приклад одностадійного синтезу пентациклічних похідних хромену з попередньою оцінкою їх цитотоксичності відносно клітинних ліній A549 та B-16.



Реакція *гетеро*-Дільса-Альдера також є ефективним методом одержання тетрагідропіранового скелета вуглеводів. За цим методом було синтезовано декілька 3-дезоксаміноцукрів з високими виходами та високою регіоселективністю. У роботі [10] описано синтез дезоксицукрів, зокрема форозаміну **1.52a-d**, у трикомпонентній реакції з використанням простих і доступних вихідних речовин (Схема 10).

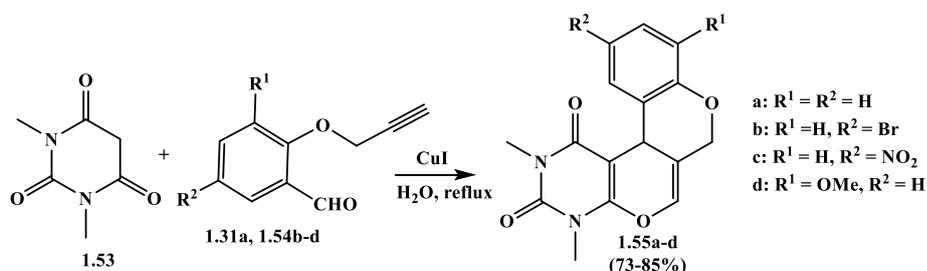
Схема 10



Реакція нітроацетону **1.42**, формальдегиду **1.43** та алкільних вінілових етерів **1.50a-d** у дихлорметані (ДХМ) при 80 °С призводила до утворення відповідних рацемічних дигідропіранів **1.51a-d** з виходами 23-37%. Подальші перетворення цих сполук забезпечили отримання рацемічних дезоксицукрів форозаміну **1.52a-d** [10].

Khoshkholgh та співавтори [11] синтезували тетрациклічні похідні урацилу **1.55a-d** із використанням термінальних алкінів через доміно-реакцію КГДА, застосовуючи сучасні підходи «зеленої хімії» (Схема 11).

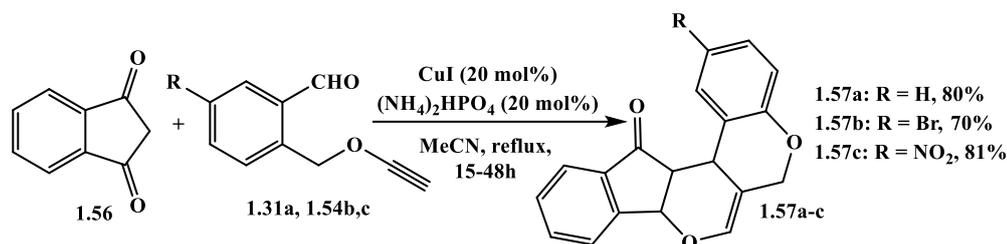
Схема 11



Реакції N,N-диметилбарбітурової кислоти **1.53** з O-пропаргільованими похідними саліцилового альдегіду **1.31a**, **1.54b-d** проводили у киплячій воді в присутності CuI (40 мол.%) з виходами **1.55a-d** [11].

Іншим прикладом реакції [1,4]-циклопрієднання, каталізованої CuI, є реакція O-пропаргільованих похідних саліцилового альдегіду **1.31a**, **1.54b,c** з 1,3-індантіоном **1.56** (Схема 12). У цій реакції як основу використовували діамоній гідрофосфат, а як розчинник - ацетонітрил, щоб одержати пентациклічні похідні пірану **1.57a-c** [12].

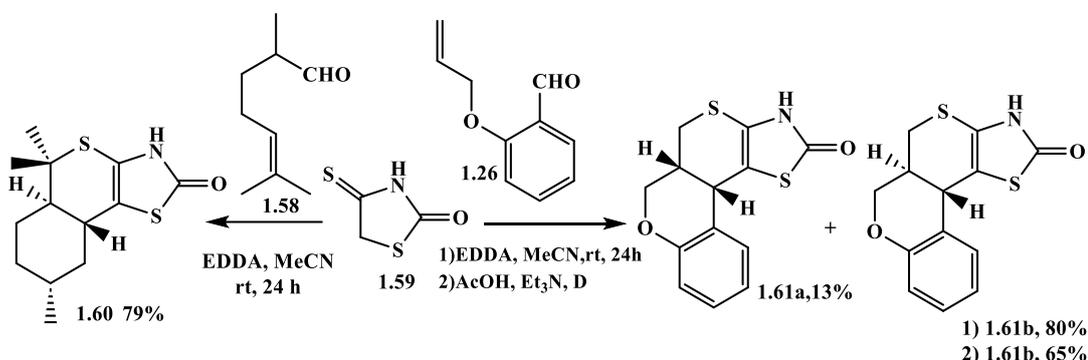
Схема 12



1.1.3 Доміно-реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера у синтезі похідних хромено-тіопірано-тіазолів.

У роботі [13] описано реакцію альдегіду **1.58** з 4-тіоксо-1,3-тіазолідин-2-оном **1.59** у присутності ЕДДА в ацетонітрилі або оцтовій кислоті за кімнатної температури, в результаті якої було одержано транс-конденсований продукт **1.60** з виходом 79 % (Схема 13).

Схема 13

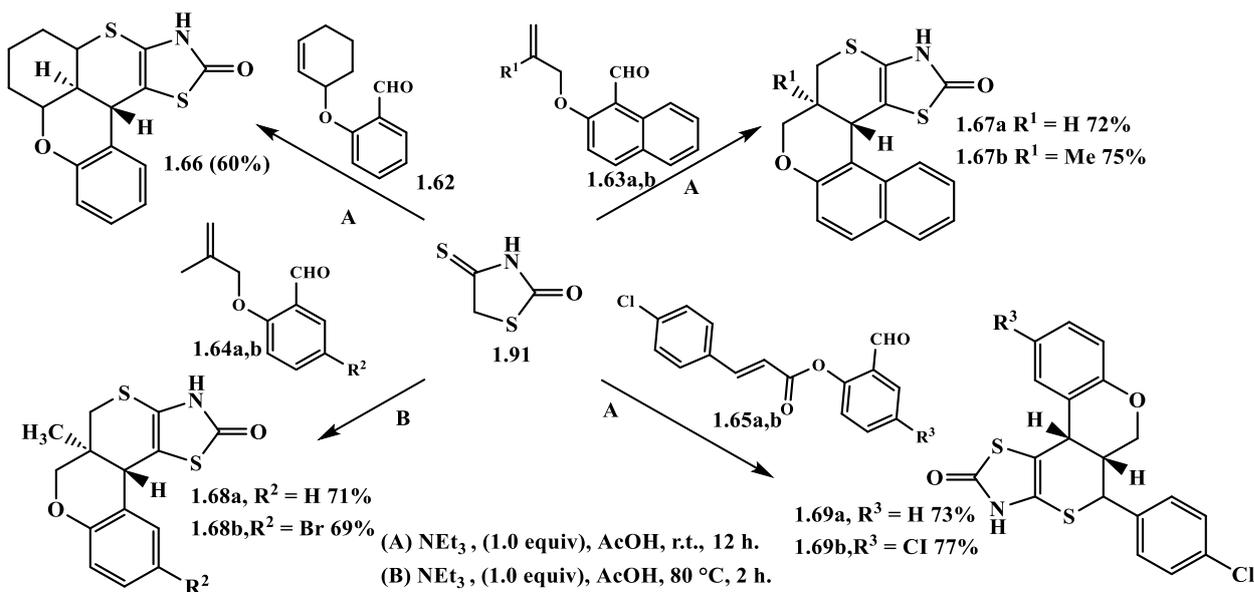


Аналогічно, сполука **1.59** реагувала з 2-алілоксибензальдегідом **1.26** з утворенням продукту **1.61b** з виходом 80 % за кімнатної температури. При кип'ятінні в оцтовій кислоті циклопрієднання не було діастереоселективним, тому

утворювалися обидва продукти – **1.61a** та **1.61b** - з виходами 13 % та 65 % відповідно (Схема 13).

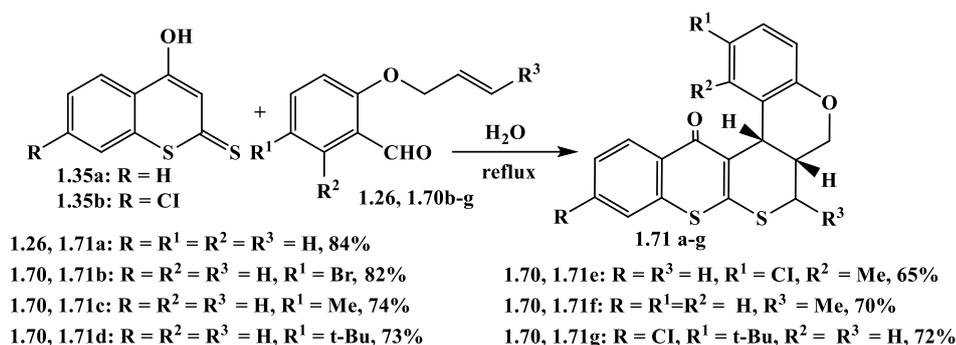
За подібним механізмом альдегіди **1.62**, **1.63a,b** та **1.64a,b**, які містять алільну групу, що виступає як дієнофіл, у реакції з **1.59** утворювали лише транс-діастереомери **1.66**, **1.67a,b** та **1.68a,b** відповідно, тоді як альдегіди **1.65a,b** утворювали лише цис-діастереомери **1.69a,b**.

Схема 14



Автори пояснюють це можливістю ендо- або екзо-орієнтації дієнофіла у перехідному стані [13]. У випадку сполук з алільною групою переважає екзо-перехідний стан. У похідних **1.65a,b** участь бере ендо-перехідний стан через вторинні орбітальні взаємодії, що призводить до утворення цис-діастереомерів **1.69a,b** (Схема 14).

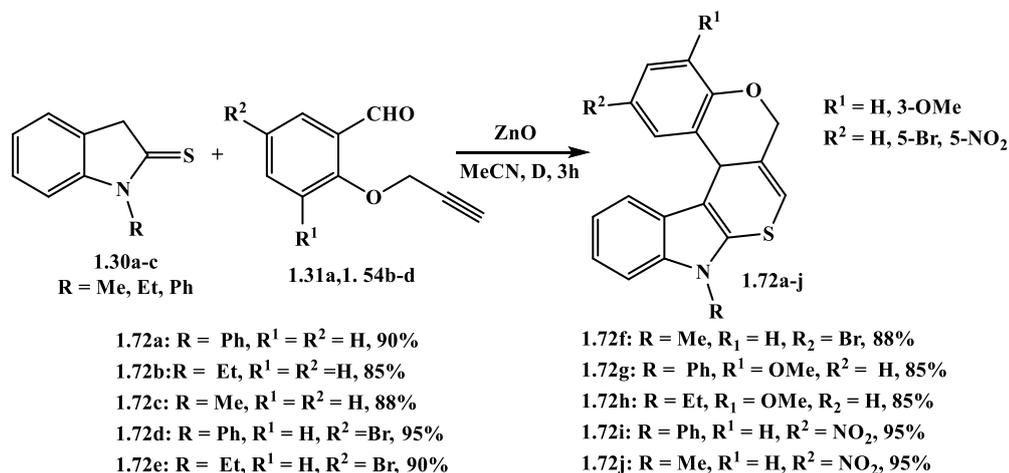
Доміно-реакція Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера (ДКГДА) між О-алілсаліциловим альдегідом **1.26** та 4-гідроксидітіокумарином **1.35a** у киплячій оцтовій кислоті в присутності триетиламіну проходила легко протягом 4 годин, забезпечуючи утворення конденсованого бензопірантіопіранового похідного тіохромону **1.71a** з виходом 85 %. Для порівняння впливу розчинника ту саму реакцію проводили за ідентичних умов у киплячій воді, отримавши **1.71a** з виходом 84 % (Схема 15).



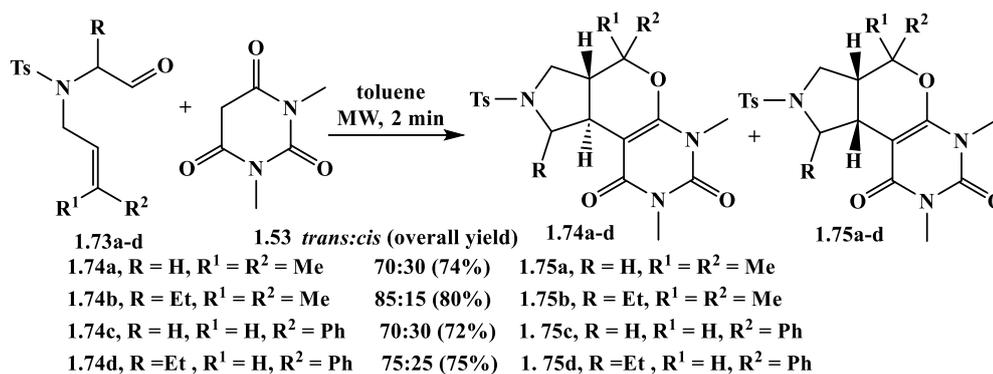
Варто відзначити, що ДКГДА-реакції 4-гідроксидитіокумаринів **1.35a,b** із рядом О-алілсаліцилових альдегідів **1.26, 1.70b-e,g** можна було також проводити без використання каталізаторів, що призводить до утворення відповідних продуктів **1.71a-g** [14].

Кіатехр та співавтори [5] повідомили про ефективний синтез індол-вмісних тіопіранобензопіранових похідних з виходами 85-95 % за допомогою доміно-реакцій Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера між неактивованими алкінами **1.31a, 1.54b-d** та тіоіндолами **1.30a-c** (Схема 16). Вони використали ZnO як каталізатор для активації неактивованих алкінів та ацетонітрил як реакційне середовище, що дозволило отримати продукти **1.72a-j**.

Схема 16



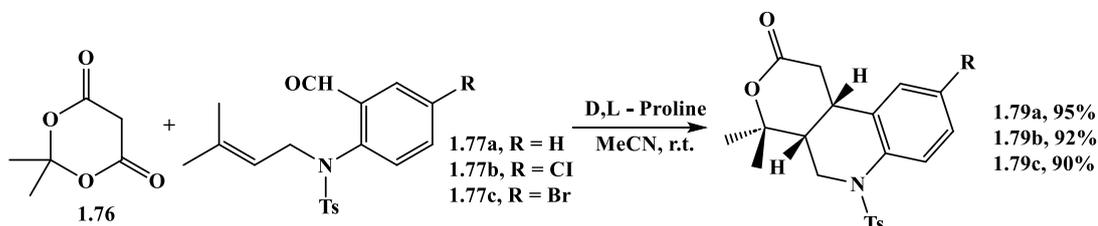
Ragunathan та співавтори [15] вперше застосували N-алкенилальдегіди в інтра-молекулярній реакції гетеро-Дільса-Альдера для здійснення стереоселективного синтезу похідних піранопіролу (Схема 17).



Реакція між аліфатичними альдегідами **1.73a** та барбітуровою кислотою **1.53** у присутності ЕДДА в киплячому толуолі під зворотнім холодильником дала транс-і цис-піранопірольні продукти **1.74a** та **1.75a** у співвідношенні 65:35 з загальним виходом 62 %. Для покращення виходів також застосовували мікрохвильове опромінення. При проведенні тієї ж реакції в толуолі під дією мікрохвильового випромінювання спостерігали кращі результати - вихід 74% після 2 хвилин синтезу із співвідношенням продуктів 70:30 (**1.74a:1.75a**) відповідно. Подібні результати (**1.74b-d** та **1.75b-d**) отримано також у реакціях **1.73b-d** з **1.81** [15].

Yadav та співавтори [16] повідомили також про синтез тетрагідрохінолін-вмісних піранонів **1.78a-c** у одному реакторі за допомогою доміно-реакції Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера між N-пренільованими альдегідами **1.77a-c** та кислотою Мельдрума **1.76** з використанням L- або D,L-проліну як каталізатора. Це унікальний приклад одночасного виділення ацетону та декарбосилування в одному циклі реакції доміно-Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера (Схема 18).

Схема 18

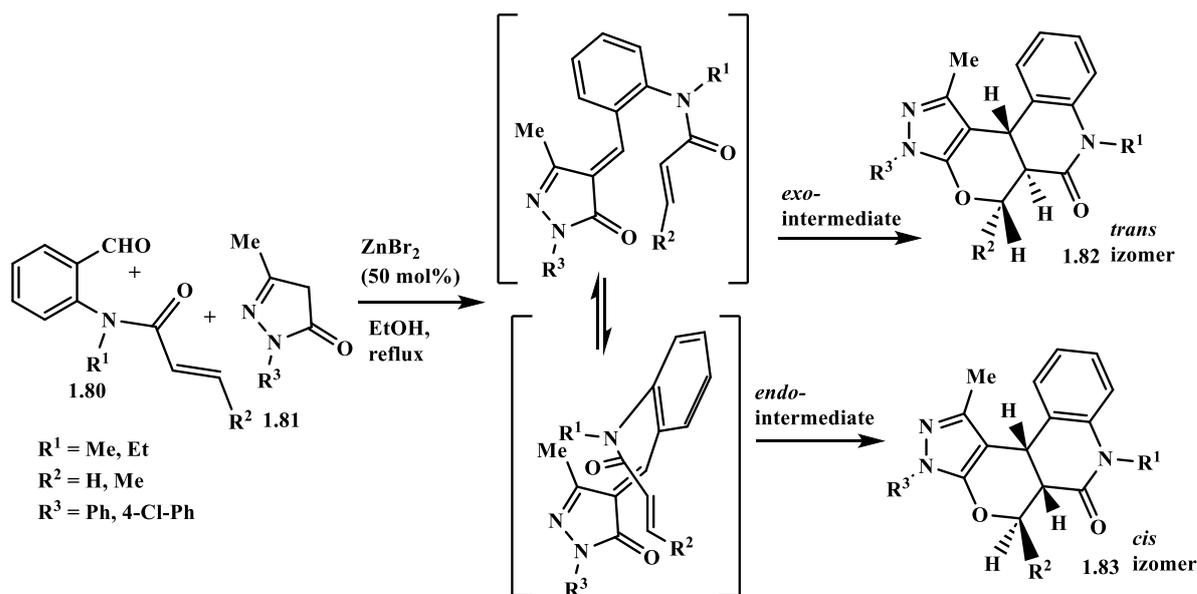


Kiameh та співавтори [17] у 2019 році повідомили про реакцію ДКГДА, каталізовану кислотами Льюїса, для побудови тетрагідропіразоло[4',3':5,6]пірано[3,4-c]хінолонових каркасів, що поєднує N-акриловані антранілові альдегіди **1.80** з піразолонами **1.81** (Схема 19). Реакція

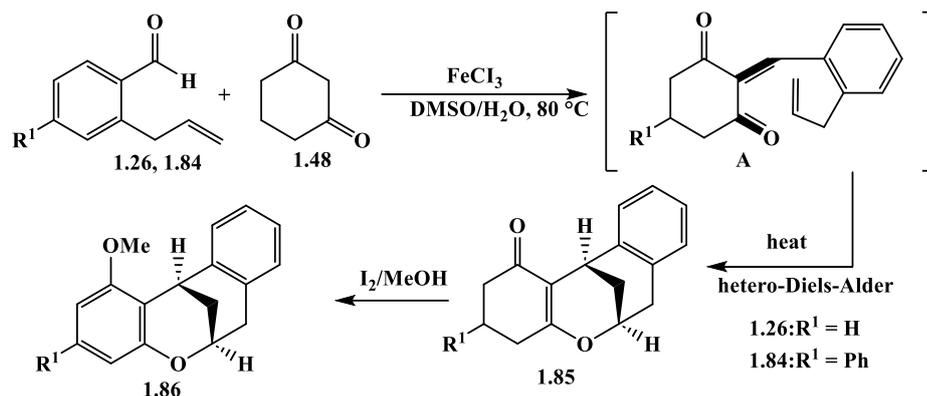
проходила через конденсацію Кньюенагеля з наступною інтрамолекулярною гетероциклізацією Дільса-Альдера, що забезпечувала утворення тетрациклічних систем із помітною цис-діастереоселективністю.

Отримані структури **1.82**, **1.83** містять азот- та оксигенвмісні цикли і нагадують фармакофори, знайдені в інгібіторах кіназ і антипроліферативних препаратах. Автори продемонстрували високу регіоселективність і високі виходи продуктів за м'яких умов реакції, а також відзначили сумісність їх методу з різними похідними піразолону. Біологічні дослідження не проводилися, але структурні паралелі з відомими активними речовинами вказують на потенційне застосування у протипухлинній або протизапальній терапії. Ця робота ілюструє, як хімія ДКГДА забезпечує ефективний доступ до високофункціоналізованих та складних гетероциклів.

Схема 19

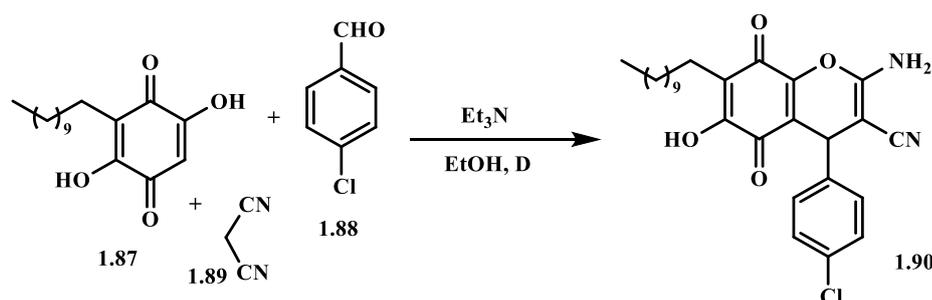


Wu та співавтори [18] розробили доміно-каталізовану реакцію Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера для синтезу похідних хромону та оксабіцикло[3.3.1]нонену **1.85**, **1.86**. Використовуючи саліцилальдегіди **1.26**, **1.84** та циклогексан-1,3-діон **1.48** як субстрати, вони застосували $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ за м'яких умов в етанолі, демонструючи економічно вигідну та екологічно чисту каталізаторну систему (Схема 20). Каскад трансформацій забезпечив доступ до конденсованих оксигенвмісних гетероциклів з високими виходами, гарною сумісністю з функціональними групами та простотою у виконанні.



Автори у своїй роботі [19] запропонували одностадійний синтез поліциклічних хінонів за допомогою каскадної реакції Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера. Сполуку **1.90** було отримано в результаті багатоетапного перетворення бензохінону ембеліну **1.87**, 4-хлоробензальдегіду **1.88** та малонітрилу **1.89** (Схема 21). Використовуючи гідроксиарильні альдегіди та активні метиленові сполуки, автори досягли побудови високо кон'югованих ароматичних систем із хіноноїдним ядром.

Отримані структури **1.90** є близькими аналогами антрациклінів та мітоксантрону, відомих сполук, що здатні інтеркалювати ДНК та генерувати реактивні форми кисню. Попередні дослідження виявили цитотоксичність даних сполук щодо деяких ракових клітинних ліній, підкреслюючи їх потенціал як потенційних хіміотерапевтичних агентів.

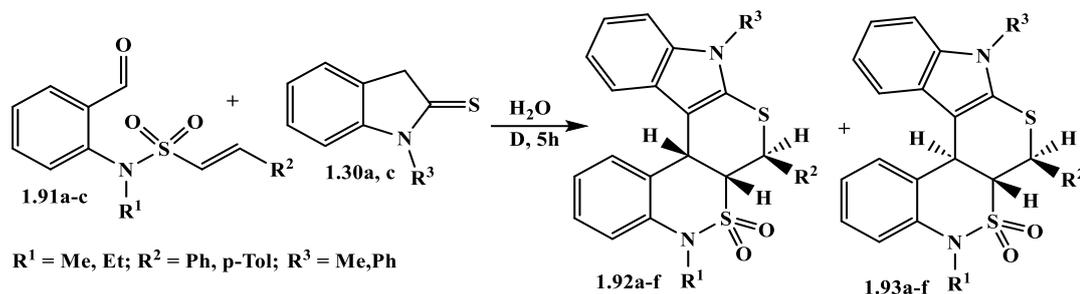


Простота реакції, толерантність до функціональних груп та медичне значення роблять цей метод цінним для швидкої розробки сполук-кандидатів у лікарські засоби, що інтеркалюють ДНК.

Кіатеhr та співавтори у 2020 році [20] внесли свій вклад у розвиток хімії доміно-реакцій типу Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера, запропонували новий

варіант синтезу похідних тіопірано[2,3-*b*]індолу в водному середовищі без каталізатора.

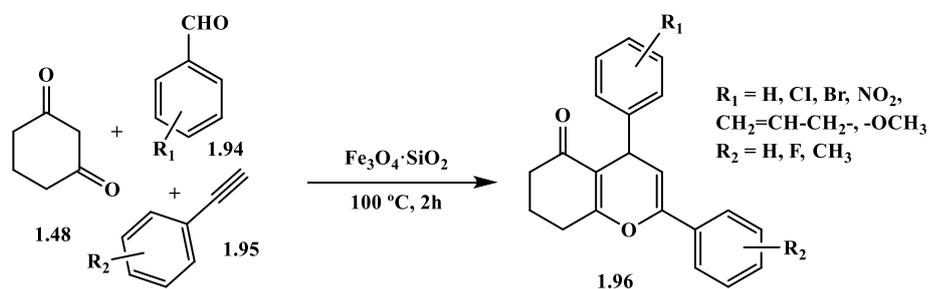
Схема 22



Цей підхід не лише забезпечив високі виходи цільових продуктів з високою регіо- та стереоселективністю, але й відповідає принципам «зеленої» хімії. Вони використали реакцію 1-метиліндолін-2-тіону **1.30a,c** з акрильованими саліцилальдегідами **1.91a-c** для одержання пентациклічних гетероциклів, що містять атоми сульфуру та нітрогену – **1.92a-f**, **1.93a-f** (Схема 22). Методологія підтверджує можливість застосування реакції ДКГДА для синтезу складних гетероциклів у рамках концепції стійкого та екологічного органічного синтезу.

Suri та співавтори у 2020 році повідомили про застосування нанокаталізатора $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{SiO}_2$ для спрямованого трьохкомпонентного синтезу хроменів у умовах без розчинника [21]. Каталізатор використовували у реакції 1,3-циклогександіону **1.48**, саліцилового альдегіду **1.94** та дімедону або активних алкенів **1.95**, що призвело до утворення циклічних каркасів **1.96** у препаративних виходах (Схема 23).

Схема 23

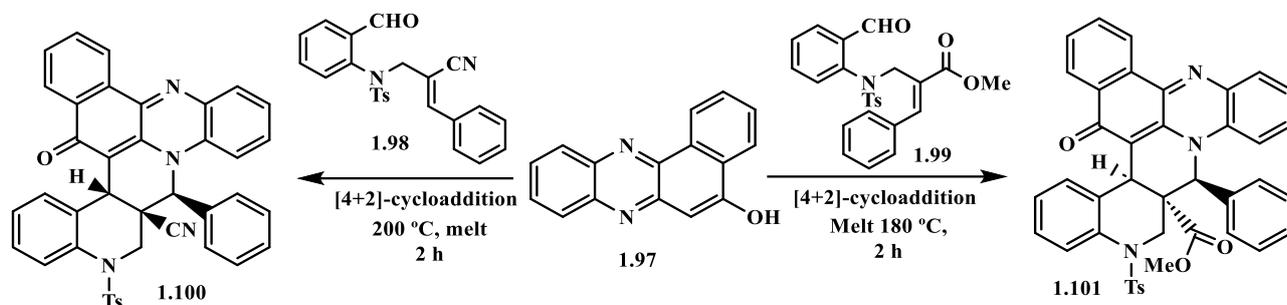


Особливістю цього підходу є те, що каталізатор можна легко відокремити за допомогою зовнішнього магніту та повторно використовувати протягом кількох циклів без суттєвої втрати активності. Висока атомна економія, відсутність

традиційних розчинників та багаторазове використання каталізатора роблять метод придатним для промислового синтезу.

Vakthadoss та Vinayagam розробили реакцію плавлення у твердому стані для синтезу гібридних поліциклічних хінонових каркасів на основі послідовності ДКГДА (Схема 24) [22].

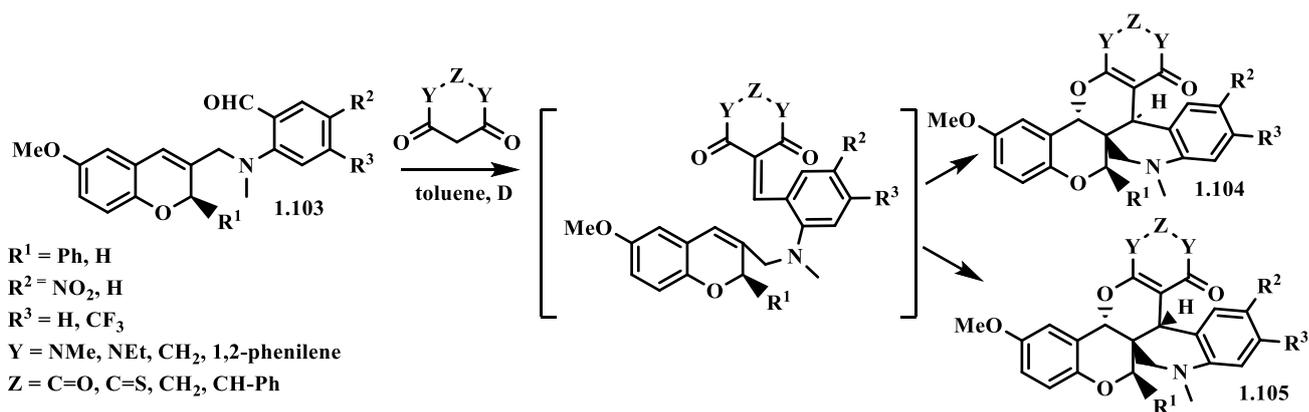
Схема 24



Використовуючи похідні хінону **1.97** та альдегіди **1.98**, **1.99**, автори провели реакцію за теплових умов без застосування розчинників. Такий підхід забезпечив утворення конденсованих ароматичних систем із трьома суміжними стереоцентрами (**1.100** та **1.101**) [22]. Метод дозволяє уникнути використання органічних розчинників, знизити енергоспоживання та усунути потребу в післясинтетичному очищенні. Застосування твердотілого підходу забезпечує отримання висококристалічних продуктів із хорошими або відмінними виходами, що робить його перспективним для масштабного синтезу лікарських сполук.

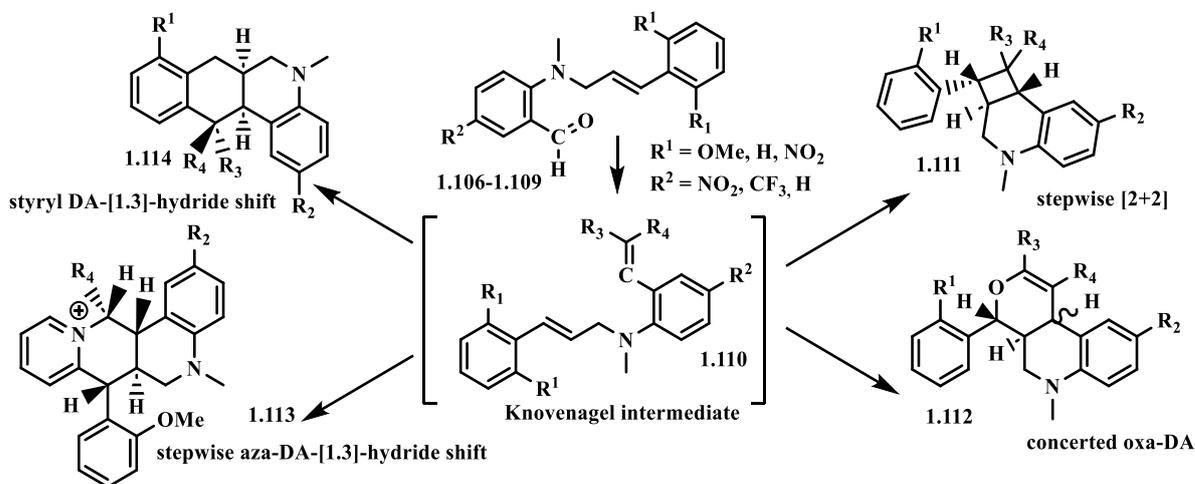
Kiraly та співавтори [23] дослідили полікаскадне перетворення, ініційоване реакцією Кньюенагеля, яка ініціює послідовні циклізації, включно з циклізацією *гетеро*-Дільса-Альдера та [2+2] циклоприєднання. Методологія дозволила синтезувати конденсовані хромени та хромони з різними функціональними групами (**1.104**, **1.105**) (Схема 25).

Синтезовані сполуки продемонстрували помітну *in vitro* антипроліферативну активність, що свідчить про їхню перспективність як протипухлинних агентів. Зміна замісників і умов реакції дала змогу контролювати каскадні перетворення, відкриваючи нові можливості для створення лікоподібних сполук.



У роботі [24] Кайтár та співавторів представлено доміно-реакції Кньювенегеля з подальшою циклізацією N-арилкоричних амінів з активними метиленовими реагентами, що супроводжувалась реалізацією кількох конкуруючих механізмів циклізації: внутрішньомолекулярної реакції *гетеро*-Дільса-Альдера, поетапного полярного [2+2] циклоприєднання, стиліл- або аза-Дільса-Альдера реакції з подальшою реароматизацією, а також [1,3]-гідридного зсуву з 6-ендо-циклізацією (Схема 26).

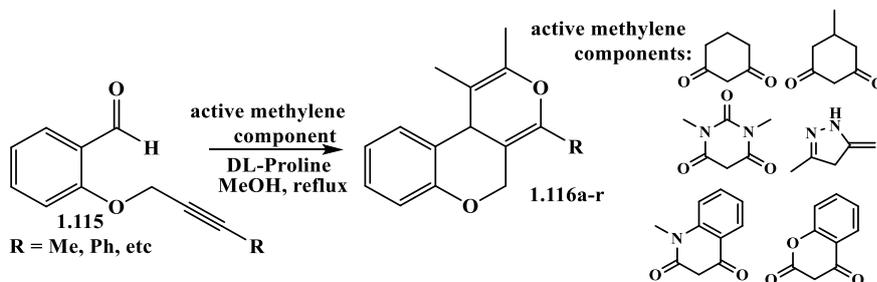
Такий підхід забезпечив велику кількість полігетероциклічних каркасів із невеликої кількості вихідних сполук за контрольованих умов. Деякі з отриманих сполук продемонстрували виражену цитотоксичну активність у низьких мікромольних концентраціях щодо ракових клітинних ліній. Ця стратегія є потужним інструментом для створення молекулярного різноманіття, необхідного для виявлення біологічно активних структур-лідерів у фармацевтичному скринінгу.



Такий підхід забезпечив велику кількість полігетероциклічних каркасів із невеликої кількості вихідних сполук за контрольованих умов. Деякі з отриманих сполук продемонстрували виражену цитотоксичну активність у низьких мікромолярних концентраціях щодо ракових клітинних ліній. Ця стратегія є потужним інструментом для створення молекулярного різноманіття, необхідного для виявлення біологічно активних структур-лідерів у фармацевтичному скринінгу.

Органокаталітичний підхід до послідовності реакцій ДКГДА був описаний Karthik та співавторами [25] для синтезу хроменопіранів **1.116a-r** (Схема 27). Ця методологія, що використовує органокаталізатор на основі аміну, дала змогу ефективно будувати поліоксигеновані каркаси, структурно споріднені з флавоноїдами та кумаринами.

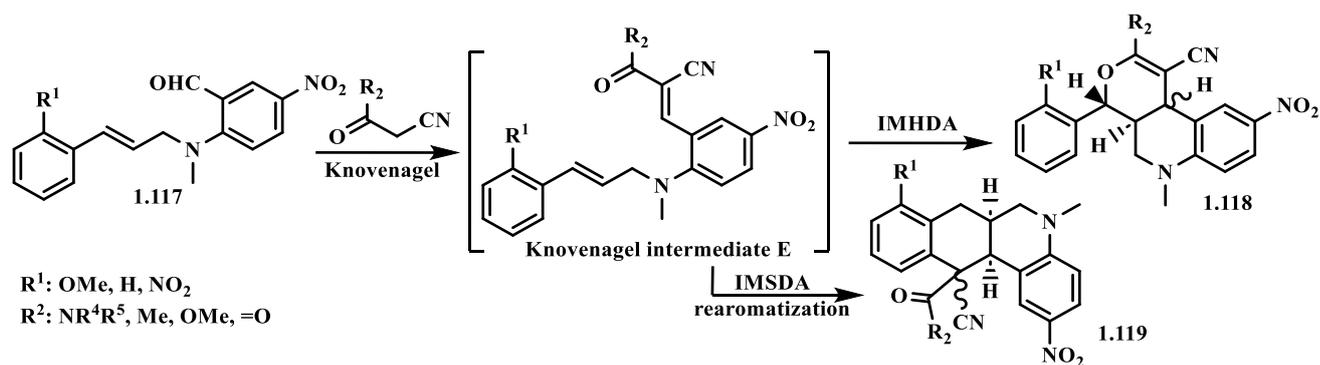
Схема 27



Робота демонструє синтетичну гнучкість безметалевого каталізу у створенні біологічно активних хіральних молекул та відкриває перспективи для екологічно орієнтованого розроблення лікарських засобів.

Кайтár та співавтори [26] застосували варіанти внутрішньомолекулярної реакції *гетеро*-Дільса-Альдера та сульфурвмісної реакції Дільса-Альдера (у поєднанні з реакцією Кньовенагеля для синтезу конденсованих O-, N- та S- вмісних гетероциклів **1.118-1.119**, що містять чотири суміжні стереоцентри (Схема 28).

За ретельно оптимізованих умов реакції було отримано високі виходи та стереоселективність. Отримані сполуки містять структурні фрагменти, подібні до фармакофорних ядер клінічно важливих лікарських засобів, зокрема тих, що мають протівірусну та цитотоксичну активність.



1.2 Потенціал тіопірано[2,3-*d*]тіазолів у дизайні біологічно активних малих молекул

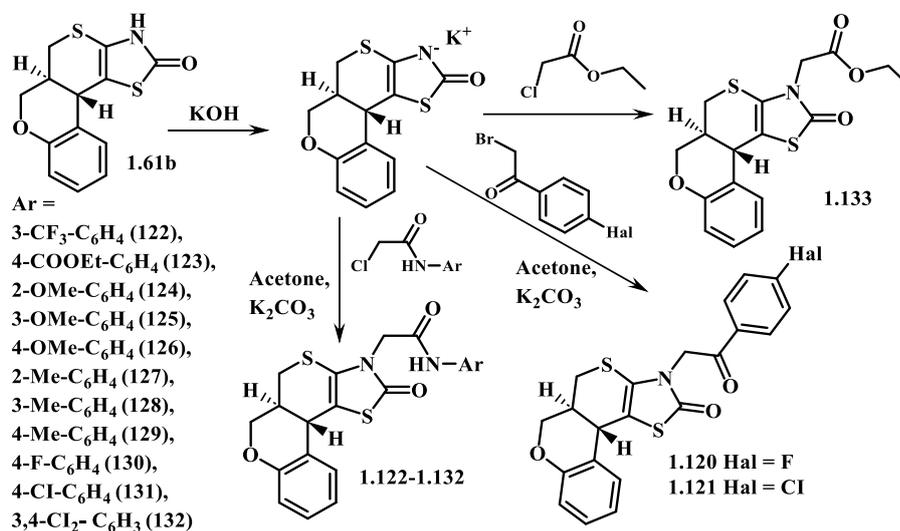
Похідні тіазолу та споріднені структури становлять особливий інтерес у контексті пошуку нових протипухлинних агентів, з огляду на доведену ефективність тіазольного циклу як структурної основи для створення біологічно активних молекул. Станом на 2021 рік перелік лікарських засобів, схвалених FDA, включає 18 препаратів, що містять тіазольний цикл, а також численні експериментальні сполуки з аналогічним фрагментом у структурі [27]. Серед тіазоловмісних гетероциклів особливе місце посідають 4-тіазолідиони [28-32], зокрема 5-ен-4-тіазолідиони, які формують добре вивчений клас сполук із широким спектром біологічної активності [33-39]. Водночас надзвичайна фармакологічна різноманітність цієї підгрупи стала підставою для класифікації 5-ен-4-тіазолідионів як *pan-assay interference compounds* (PAINS), тобто сполук, що проявляють неспецифічну активність щодо кількох біологічних мішеней [40, 41]. Це зумовлено їх поліфункціональністю, обмеженою селективністю та здатністю діяти як акцептори Міхаеля.

З огляду на викладене, похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолу розглядаються як перспективні біоізомерні аналоги 5-ен-4-тіазолідионів, здатні зберігати характерний біологічний профіль останніх, але водночас позбавлені типових недоліків, пов'язаних із неспецифічною активністю та реакційною здатністю, притаманною акцепторам Міхаеля [42-46].

Kryshchyshyn та співавтори [47] дослідили протипухлинний потенціал ряду 3-заміщених похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, одержаних у результаті реакції

ДКГДА, доповнивши синтетичні дослідження (Схема 29) систематичним аналізом залежності «структура - активність». Було встановлено, що сполуки **1.122-1.132** та **1.133** виявляють виражену цитостатичну дію щодо багатьох ліній пухлинних клітин, що свідчить про широкий спектр протипухлинної активності.

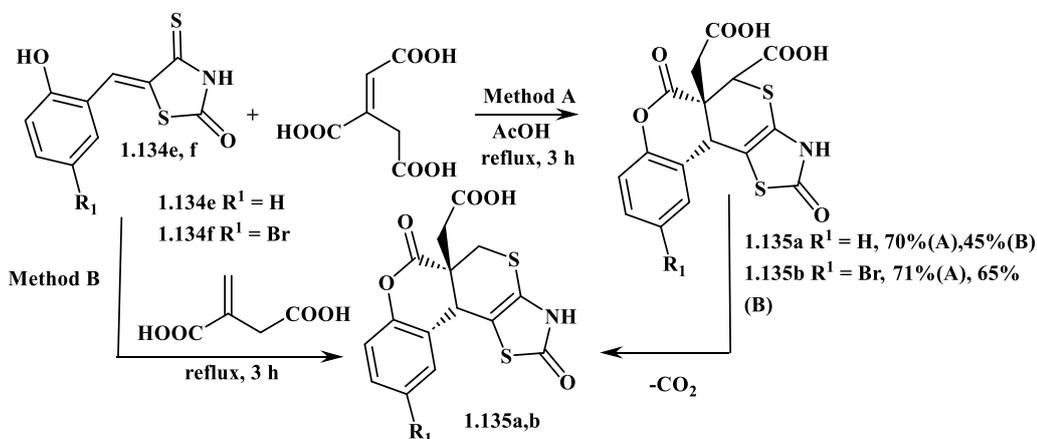
Схема 29



Було виявлено чітку кореляцію між біологічною активністю, природою та положенням замісників в ароматичному циклі. Електронноакцепторні та електроннодонорні групи по-різному впливали на біологічну активність, причому найвищу активність спостерігали для похідних з такими замісниками: 3-CF₃ > 3,4-Cl₂ > 2-OMe > 4-COOEt > 4-Cl > 4-Me, 3-OMe, 4-OMe, 2-Me [28].

Zelisko [48] та співавтори синтезували ряд тіопірано[2,3-*d*]тіазолів двома методами (Схема 30).

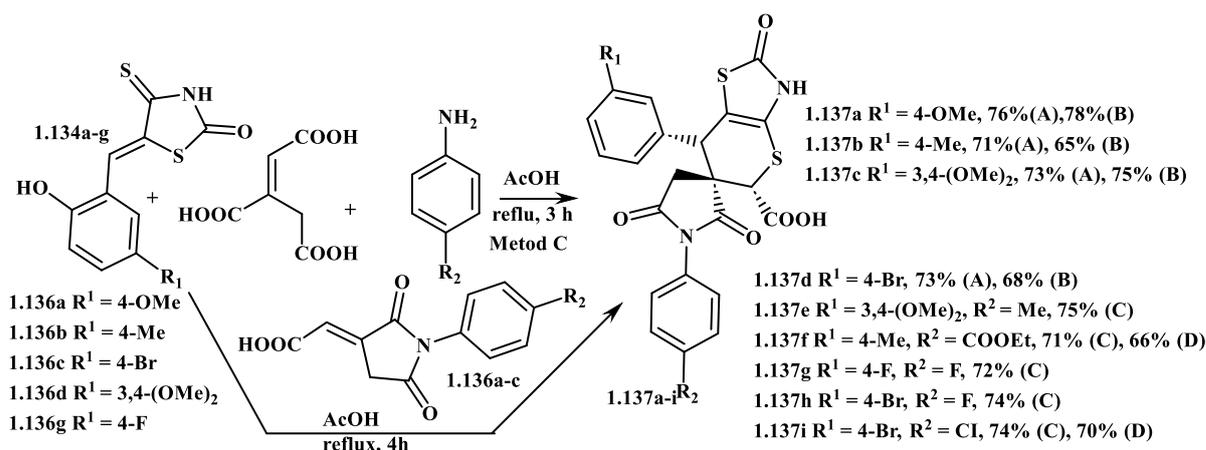
Схема 30



Метод А передбачав одержання конденсованих похідних з 5-ариліденізородананів **1.134e-f** та транс-аконітової кислоти. У методі В як дієнофіл використовувалася ітаконова кислота. Реакції проводили в оцтовій кислоті з утворенням відповідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **1.135a,b** (Схема 30) [48].

Метод С ґрунтувався на трикомпонентній реакції з використанням 5-ариліденізородананів **1.134a-g** як гетеродієнових систем з транс-аконітовою кислотою (Схема 31).

Схема 31



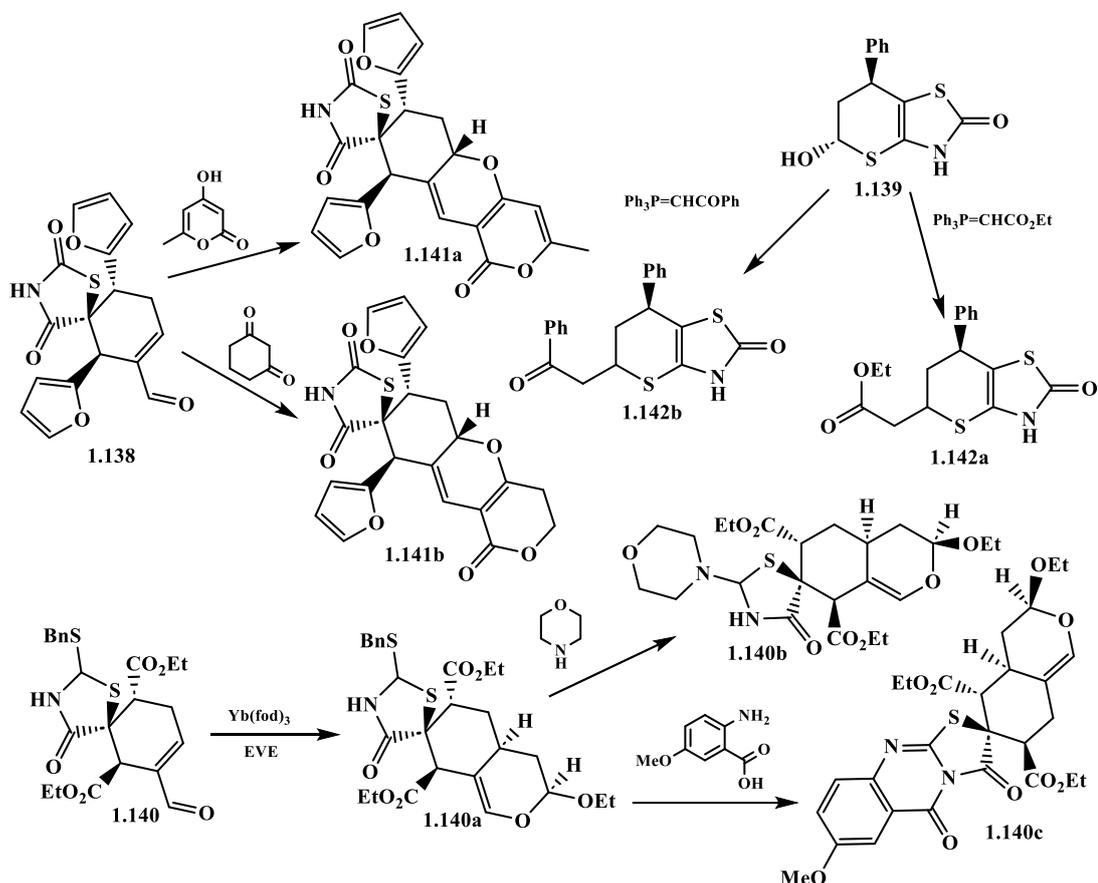
Згодом у реакцію ввели ароматичні аміни, що призвело до амінолізу естерної групи та утворення спіро-похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **1.137a-i**. Синтезовані похідні проявляють антитрипаносомну активність. Було встановлено, що сполука **1.137e** є найбільш активною проти *T. brucei* (IC₅₀ = 6,74 мкМ).

Zhang та співавтори [49] синтезували ряд спіро-тіазолідиндіонів, спіро-роданінів та конденсованих тіопіранів, використовуючи поетапний підхід, заснований на реакції ДКГДА, та дослідили їхню протипухлинну й протигрибкову активність (Схема 32).

Похідні **1.138**, **1.139** та **1.140a** проявили інгібуючу активність проти клітинної лінії раку молочної залози ZR-75-30, причому спіро-похідна **1.140a** була найактивнішою (IC₅₀ = 14,7 мМ). Сполуки **1.140b** та **1.140c**, отримані з 4-метокси-2-амінобензойної кислоти та морфоліну, були менш активними, а наявність гідроксильної групи у тіопірановому циклі **1.139** не призвела до підвищення активності. *In vitro* скринінг протигрибкової активності показав, що **1.141a**, **1.141b**

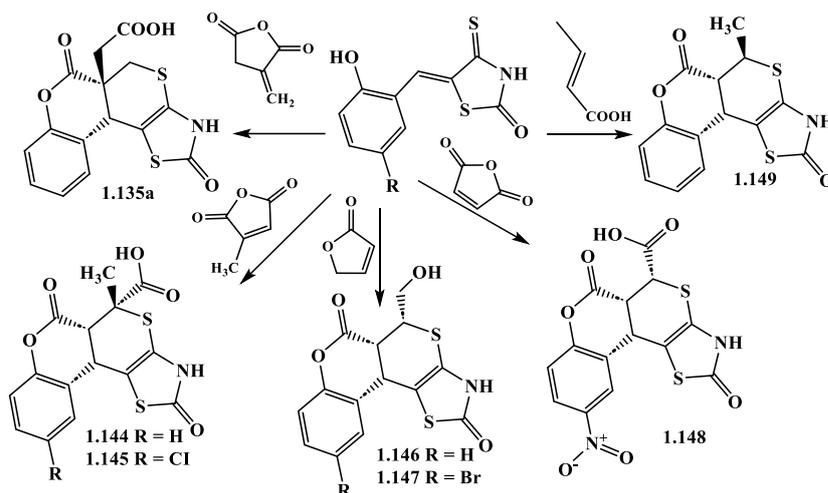
та **1.139** активні проти *Candida albicans* і *Cryptococcus neoformans*, причому сполука **1.142a** виявила найвищу активність (MIC = 16 мкг/мл і 8 мкг/мл відповідно), що зумовлено наявністю метильної групи та подвійного зв'язку в пірановому циклі [49].

Схема 32



Фініук та співавтори [50] дослідили ряд похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, синтезованих за допомогою тандемної реакції *гетеро*-Дільса-Альдера (ГДА), яка слугувала ключовим етапом у побудові поліциклічного, гетероциклічного каркаса (Схема 33). Ця синтетична стратегія дала змогу ефективно формувати насичені фармакофорами каркаси, що містять як сульфурвмісні, так і нітрогенвмісні гетероцикли, які часто зустрічаються у біологічно активних сполуках.

Синтезовані похідні були піддані комплексній біологічній оцінці з метою вивчення їх протипухлинного потенціалу, що виявило у кількох сполук селективну цитотоксичність щодо певних пухлинних ліній клітин людини.



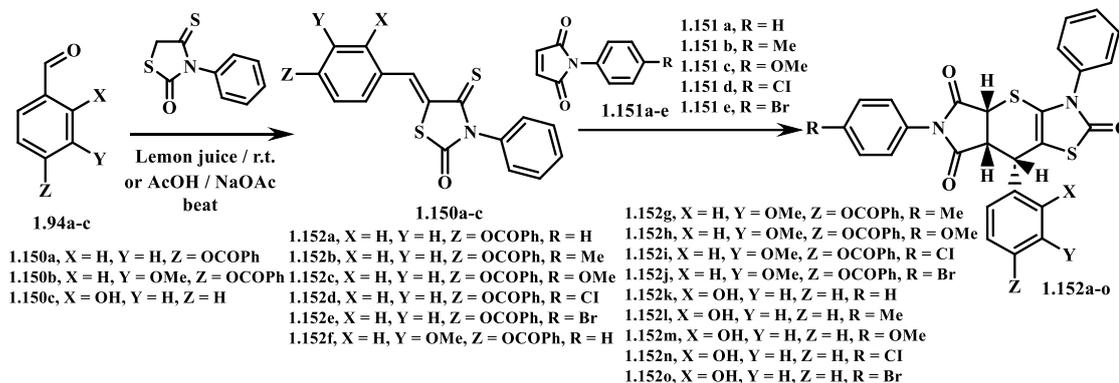
Зокрема, похідне **1.145** продемонструвало найвищий індекс селективності (SI) щодо клітин лейкозу людини Jurkat (SI = 25,64) та хронічного мієлоїдного лейкозу K562 (SI = 12,35), при цьому показуючи негативний індекс (-3,58) для клітин гліобластоми людини U251. Сполука **1.143** проявила селективність до клітин Jurkat (SI = 12,99) та K562 (SI = 19,61), сполуки **1.144** та **1.146** - до клітин Jurkat (SI = 5,15 та 10,87 відповідно), а сполука **1.147** була селективною щодо клітин раку молочної залози MCF-7 (SI = 4,76).

Metwally та співавтори синтезували серію 3-заміщених тiazоло-тіопіранових похідних за допомогою реакції Кньювенегеля та *гетеро*-Дільса-Альдера з використанням екологічно чистих розчинників, що відповідає сучасним тенденціям «зеленої хімії» (Схема 34) [51]. *In vitro* скринінг антибактеріальної активності було проведено для сполук **1.150a-c**, **1.152a-d**, **1.152f-i** та **1.152k-n**. Дослідження показали, що сполука **1.150a** виявила найвищу активність проти *E. coli* з MIC = 15,6 мкг/мл, сполуки **1.152b** та **1.152c** проявили дещо нижчу активність (MIC = 62,5 мкг/мл), а сполуки **1.152m** та **1.152n** - MIC = 200 та 500 мкг/мл відповідно. Сполуки **1.150a**, **1.150c**, **1.152f** та **1.152n** виявили однакову активність проти *K. pneumoniae* (MIC = 125 мкг/мл), тоді як сполуки **1.152b**, **1.152c** та **1.152m** з MIC = 250 мкг/мл були менш активними.

Варто зазначити, що сполуки **1.150a**, **1.150c**, **1.152b**, **1.152c**, **1.152d** та **1.152l** проявили селективну активність проти *S. mutans*, причому сполука **1.150a** мала

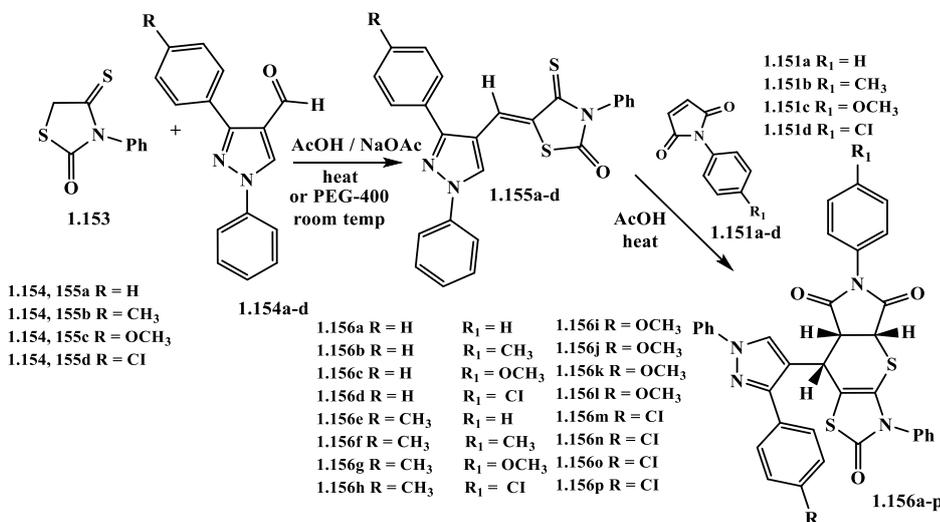
найвищу активність (MIC = 31,25 мкг/мл), а далі йшли сполуки **1.152b**, **1.152c** та **1.152l** (MIC = 62,5 мкг/мл).

Схема 34



Розвиток подальших досліджень реакцій Кньюенагеля та *гетеро*-Дільса-Альдера був здійснений в наступній роботі [52], де Metwally та співавтори продемонстрували отримання нових 3-заміщених тiazоло-тіопіранових похідних (Схеми 35 та 36). Для синтезу сполуки **1.158e** як дієнофіла використовували етил акрилат, що не призвело до очікуваного підвищення активності.

Схема 35

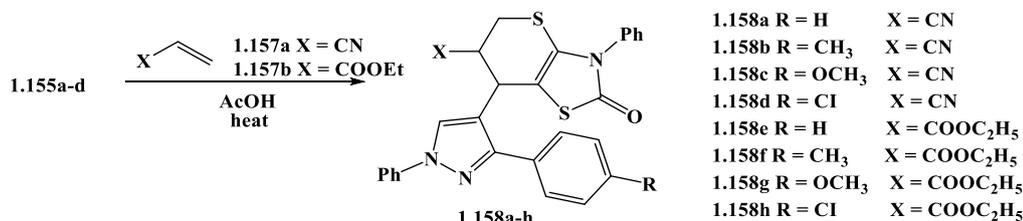


Синтезовані сполуки показали значну протипухлинну активність щодо клітинних ліній раку молочної залози та печінки. Сполука **1.155a** продемонструвала найкращу активність проти обох ліній - IC₅₀ = 19,3 мкг/мл для MCF7 та 10,6 мкг/мл для HEPG2.

Найменш виражену протипухлинну активність щодо обох ліній виявила сполука **1.156d**. Порядок зростання активності проти клітин MCF7 відповідно до

значень IC_{50} : **1.156c** > **1.155a** > **1.156a** > **1.158e** > **1.156d**. Для клітин НЕРG2: **1.155a** > **1.156a** > **1.158e** > **1.156c** > **1.156d**. Наявність електродонорних груп у фенільному заміснику підвищувала активність (сполука **1.156c**), тоді як електроноакцепторні замісники призводили до зниження активності (сполука **1.156d**).

Схема 36



У низці досліджень [53-56] продемонстровано потенціал хіноїдних похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу як перспективних протипухлинних агентів. Деякі представники цього класу проявили виражену цитотоксичну активність щодо клітин колоректального раку, індукуючи накопичення активних форм кисню, зупинку клітинного циклу у фазах S та G₂/M, інгібування біосинтезу ДНК та активацію каспаз 3/7, 8, 9 і 10, що свідчить про ініціацію апоптозу за внутрішнім і зовнішнім шляхами [53]. Інші хіноновмісні похідні тіопіранотіазолів продемонстрували цитотоксичність, порівнянну з біцином ($IC_{50} = 0,60-5,98$ мкМ), але при цьому характеризувалися нижчою токсичністю щодо нормальних клітин і не спричиняли гострої токсичності *in vivo*, що підкреслює їх біосумісність і терапевтичний потенціал [54]. Також встановлено, що деякі молекули цієї групи вибірково діють на епідермоїдні та колоректальні клітини, а їх активність залежить від статусу p53 у клітинах, що свідчить про можливу участь цього білка в механізмі дії [55]. Деякі конденсовані аналоги тіопіранотіазолів проявили помірну селективність щодо клітин меланоми за низької токсичності [28].

У межах досліджень [56-60] було синтезовано та охарактеризовано нові похідні тіазолу, які проявили перспективну протипухлинну активність. Зокрема, тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-они, описані в роботі [58], продемонстрували значне інгібування проліферації клітин лейкемії, легень, товстої кишки, центральної нервової системи, меланоми, простати та молочної залози з показниками GI_{50} у

діапазоні 0,37–0,67 мкМ. Подальше дослідження [50] семи хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолів виявило здатність одного з них індукувати апоптоз у клітинах Т-лейкемії Jurkat та гліобластоми U251 за механізмом, залежним від активних форм кисню та інгібування PARP-1, при збереженні низької токсичності щодо нормальних клітин ($IC_{50} > 100$ мкМ). У попередніх роботах також описано синтез *rel*-(5R,6S,7S)-тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, серед яких було ідентифіковано агенти з помірною цитотоксичністю щодо клітин колоректального раку HT-29, а також із протиексудативною активністю в умовах запального процесу *in vivo* [59].

Окрім виявленої протипухлинної активності, похідні тіазолу та тіопірано[2,3-*d*]тіазолу демонструють широкий спектр біологічної активності, що зумовлено високим потенціалом їх гетероциклічного ядра як фармакофора. Структурна жорсткість, електронна густина та можливість варіабельної функціоналізації цієї системи відкривають перспективи для пошуку нових молекул з іншими типами фармакологічної дії. Зокрема, останнім часом зростає інтерес до дослідження протисудомної [60-62], протипаразитарної [48-63] та протимікробної [28, 68, 69] активності цих сполук, що зумовлено потребою в нових ефективних засобах із покращеним профілем безпеки та селективності. У цьому контексті тіопірано[2,3-*d*]тіазоли розглядаються як перспективний скафолд для розробки мультифункціональних лікарських засобів.

Важливим напрямом у пошуку протисудомних засобів є дослідження хімічного простору та пошук/скринінг потенційних агентів серед нових різноманітних хемотипів малих молекул [70-73]. Систематичні дослідження з пошуку нових протисудомних агентів серед сірко- та нітрогеновмісних гетероциклів показали, що 4-тіазолідинони володіють перспективними властивостями для подальшого дизайну потенційних протиепілептичних агентів із різними механізмами дії [74, 76]. Так, 4-тіазолідиноновий подвійний інгібітор COX-2/5-LOX дарбуфелон та його аналог Les-6296 продемонстрували значний рівень захисту тварин у моделі scPTZ при дозі 100 мг/кг і становлять інтерес для поглиблених досліджень [61]. Крім того, інша хіт-сполука на основі 5-ен-4-

тіазолідинового скарфолду - **Les-6222** - проявила виражену протисудомну активність у моделі кіндлінгу, індукованого PTZ, з ефектом, порівнянним із вальпроатом натрію, впливаючи на циклооксигеназний шлях каскаду арахідонової кислоти та знижуючи рівні COX-1, COX-2, PGF_{2α} і TXB₂ [75].

З іншого боку, похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолу розглядаються як біоізостерні еквіваленти 5-ен-4-тіазолідинонів, які зберігають фармакологічні властивості та профіль активності, але водночас позбавлені ознак PAINS [76, 77].

Реакції Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера (КГДА) зарекомендували себе як одна з найефективніших синтетичних методів для побудови функціоналізованих гетероциклічних систем, зокрема тіопірано[2,3-*d*]тіазолів, які характеризуються високою кількістю фармакофорних елементів і значним потенціалом застосування у медичній хімії.

Методологічне значення підходу КГДА полягає у здатності швидко й стереоконтрольовано генерувати поліфункціональні гетероцикли з високою атомною економічністю, інтегруючи КГДА-етапи у багатокомпонентні, доміно- та каскадні процеси. Така інтеграція підвищує синтетичну ефективність, зменшує кількість операційних стадій, скорочує використання розчинників та утворення побічних продуктів, відповідає принципам зеленої хімії та підвищує промислову привабливість методології. Використання м'яких умов (водні або спиртові середовища, відсутність каталізатора або дешеві каталізатори, твердотільні та безрозчинникові методики) знижує негативний вплив на екологію і спрощує подальшу обробку продуктів. Важливо, що поступовий перехід від класичного каталізу солями Льюїса до органокаталізу забезпечив вищу регіо- та діастереоселективність, тоді як застосування нанокаталізаторів і магнітних носіїв підвищило ефективність процесів та спростило повторне використання каталізаторів.

Важливим досягненням у розвитку цієї методології є розширення структурного різноманіття. Варіювання донорно-акцепторних дієнів та дієнофілів, зокрема алкінів, нітрilів, похідних барбітурату, індолу та кумарину, дало змогу одержати широкий спектр конденсованих O-, N- та S-гетероциклів. Ці каркаси

відтворюють ключові фармакофорні мотиви природних і синтетичних біоактивних молекул та проявляють антипроліферативну, протипухлинну, антимікробну, антитрипаносомну та нейротропну активність, підтверджуючи їх біологічну значущість.

За останні два десятиліття досягнуто значного прогресу в удосконаленні реакцій КГДА - від впровадження безрозчинникових методів одержання та синтезу у мікрохвильових реакторах до інтеграції з процесами відновлення CO₂ - що суттєво розширило можливості контролю каскадів та відкрило нові перспективи для створення складних молекулярних архітектур. Проте залишаються виклики, зокрема прогнозування селективності для структурно складних субстратів, контроль енантімерного надлишку без використання дорогих каталізаторів і забезпечення відтворюваності для високо конденсованих систем.

З прикладної точки зору, послідовність реакцій-КГДА можна розглядати як перспективний «першочерговий» підхід для швидкої генерації та оптимізації гетероциклічних бібліотек, спрямованих на відкриття нових біологічно активних сполук. Майбутні дослідження у цій галузі, ймовірно, будуть зосереджені на раціональному дизайні вихідних матеріалів, розробці стереоселективних варіантів реакції та проведенні комплексної біоорієнтованої оцінки одержаних продуктів з використанням сучасних методів *in silico*-скринінгу, молекулярного докінгу та профілювання ADME.

Огляд [78] простежує еволюцію реакції Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера (КГДА) - від її перших концептуальних формулювань до нинішнього статусу універсальної, надійної та біологічно значущої синтетичної методології. Особливу увагу приділено прогресу, досягнутому за останні двадцять років: удосконаленню умов реакції, розширенню спектра вихідних субстратів, залученню каталізаторів нового покоління, інтеграції з багатокомпонентними та доміно-процесами. Акцент зроблено на зростаючій ролі цього підходу в проектуванні фармакологічно активних сполук, поліпшенні атомної економії, селективності та масштабованості для промислового синтезу.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [78]

РОЗДІЛ 2

СИНТЕЗ ТА ХІМІЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ КОНДЕНСОВАНИХ ХРОМЕНО-ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛІВ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Доміно-реакції належать до найбільш ефективних і методологічно привабливих підходів органічного синтезу, що забезпечують цілеспрямоване одержання молекул складної архітектури, які містять один або кілька фармакофорних центрів, із відносно простих і доступних вихідних реагентів. Як показано в аналітичному дослідженні [78], доміно-реакція Кновенагеля-Дільса-Альдера є потужним інструментом для побудови конденсованих гетероциклічних систем, зокрема тіопірано- та хроменовмісних каркасів, із високим рівнем структурного різноманіття. До ключових переваг цього підходу належать операційна простота, скорочення кількості синтетичних стадій і часу синтезу, а також можливість швидкої генерації серій функціонально заміщених сполук із новим фармакологічним профілем та покращеними біофармацевтичними характеристиками. На даному етапі наших досліджень вивчено та опрацьовано:

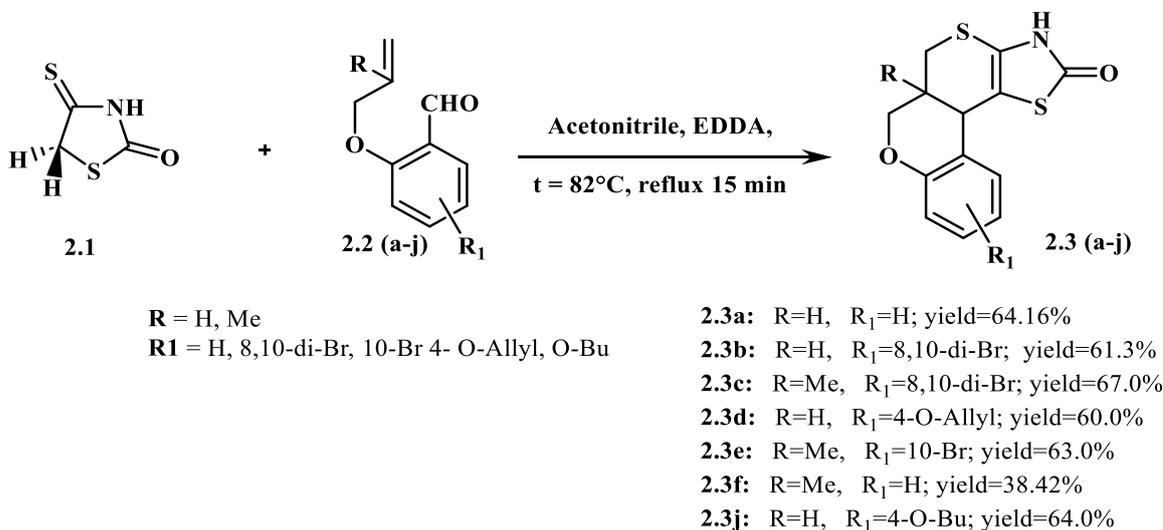
1. Використання 4-тіоксо-2-оксотіазолідинону та похідних 2-аліл(металіл, пропаргіл)оксибензальдегіду для синтезу базових каркасів.
2. Модифікація нуклеофільного центру у площині 3 тіазолідинового циклу.
3. Вивчення біологічної активності синтезованих сполук, встановлення зв'язку «структура-активність», відбір високоактивних молекул як потенційних кандидатів у лікарські засоби.

2.1 Синтез базових тіопірано-тіазолових каркасів

Наша вихідна сполука 4-тіоксо-2-оксотіазолідинон **2.1** була використана як метиленактивна компонента в двостадійній тандемній реакції Кновенагеля-гетеро-Дільса-Альдера з рядом похідних 2-алілоксибензальдегіду **2.2a-d**. Реакцію проводили в середовищі ацетонітрилу з додаванням етилендіаміндіацетату (EDDA), який виконував роль каталізатора конденсації. На першій стадії відбувалося утворення проміжного продукту реакції Кновенагеля внаслідок нуклеофільного приєднання активного метиленового фрагмента 4-тіоксо-2-

оксотіазолідинону до карбонільної групи ароматичного альдегіду. На другій стадії тандемного процесу продукт Кньюенагеля зазнавав внутрішньомолекулярної реакції *гетеро*-Дільса-Альдера з алільним фрагментом у положенні 2, що призводило до утворення нових тіопірано[2,3-*d*]тіазольних систем **2.3a-e**. [60]

Схема 2.1. Схема синтезу базових тіопірано-тіазолових каркасів



Сполуки **2.3a**, **2.3e** були ресинтезовані, усі фізико-хімічні параметри, спектральні аналізи наведено за посиланням [60].

Сполуки **2.3b-d,f,j** є кристалічними порошками жовтого кольору, не розчинні в спиртах, **2.3b-d** не розчинні в оцтовій кислоті та розчинні в ДМФА при нагріванні, **2.3f** - розчинна при нагріванні в оцтовій кислоті, **2.3j** - розчинна в етанолі при нагріванні. Структура та чистота синтезованих сполук **2.3b-d,f,j** підтверджена за допомогою ¹H і ¹³C ЯМР-спектроскопії, а також хромато-мас-спектрометрії (табл. 2.1). Для даних похідних спостерігається пара сигналів 3.80-4.04 та 4.16-4.36 м.ч., що відповідає протонам 6-Н хроменового циклу. Для похідного **2.3c** сигнал протона 11b-Н спостерігається у вигляді синглету при 4.09 м.ч. в той час як для похідних **2.3j** і **2.3d** сигнали протона 11b-Н з'являються при 3.80-3.90 м.ч. і перекриваються з іншими сигналами. Крім того, для похідних **2.3j** і **2.3d** спостерігається мультиплет у діапазоні 2.18-2.28 м.ч., який відповідає сигналу протона 5a-Н. Інші протони молекули **2.3c** резонують у відповідних ділянках спектра з характерними спин-спіновими константами. Синтезовані похідні **2.3a-j** були використані нами для подальших хімічних перетворень з метою оптимізації структури наших молекул.

Таблиця 2.1. Фізико-хімічні параметри тіопірано-тіазолів **2.3 b-j**

Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
2.3 b	61.3	257-259	C ₁₃ H ₉ Br ₂ NO ₂ S ₂	35.88	2.08	3.22	35.89	2.09	3.30
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	Жовтий порошок, mp 257-259°C ¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): 2.22–2.36 (m, 1H, 5a-H), 3.00–3.08 (m, 1H, 5-H), 3.15 (dd, 1H, J = 3.6, 12.0 Hz, 5-H), 3.82–4.00 (m, 1H, 6-H), 3.97 (d, 1H, J = 10.5 Hz, 11b-H), 4.39 (dd, 1H, J = 3.6, 10.3 Hz, 6-H), 6.85 (d, 1H, J = 7.6 Hz, 8-H), 6.95 (t, 1H, J = 7.8 Hz, 10-H), 7.17 (t, 1H, J = 7.6 Hz, 9-H), 7.43 (d, 1H, J = 7.8 Hz, 11-H), 11.50 (s, 1H, NH). LCMS (ESI+) m/z: 436,8 (M +H)+.							
2.3 c	67.0	274-276	C ₁₄ H ₁₁ Br ₂ NO ₂ S ₂	37.44	2.47	3.12	37.60	2.60	3.40
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	Жовтий порошок, mp 274-276°C (етанол-DMF 2:1). ¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 0.84 (s, 3H, CH ₃), 2.89 (d, J=12.1Hz, 1H, 5 H), 3.10 (d, J=11.8Hz, 1H, 5-H), 4.04 (d, J=10.3Hz, 1H, 6-H), 4.19 (s, 1H, 11b-H), 4.29 (dd, J=10.5, 1.8Hz, 1H, 6-H), 7.58 (s, 1H, arom.), 7.75 (s, 1H, arom.), 11.65 (s, 1H, NH). ¹³ C NMR (100MHz, DMSO-d ₆ , δ): 16.0 (CH ₃), 32.7, 34.1, 41.0, 74.8, 102.5 (5-C), 111.4, 111.6, 121.9, 125.3, 129.1, 133.4, 149.9, 169.6 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 449,0 (M +H)+.							
2.3 d	60.0	203-205	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃ S ₂	57.64	4.53	4.20	57.80	4.70	4.40
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	Жовтий порошок, mp 203-205°C (етанол-DMF 4:1). ¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 2.18-2.28 (m, 1H, 5a-H), 3.02 (td, J=11.9, 5.8 Hz, 1H, 5-H), 3.13 (dd, J=12.1, 3.3Hz, 1H, 5-H), 3.80-3.90 (m, 2H, 6-H+11b-H), 4.36 (dd, J=10.6, 3.7Hz, 1H, 6-H), 4.51 (d, J = 5.2Hz, 2H, CH ₂), 5.23 (d, J=10.6Hz, 1H), 5.36 (d, J = 17.3Hz, 1H, =CH ₂), 6.00 (ddt, J=16.1, 10.8, 5.3Hz, 1H, =CH), 6.42 (s, 1H, arom.), 6.55 (d, J=8.0Hz, 1H, arom.), 7.29 (d, J=8.7Hz, 1H, arom.), 11.48 (s, 1H, NH). ¹³ C NMR (100MHz, DMSO-d ₆ , δ): 27.1, 36.7, 37.9, 68.2, 68.5, 102.8 (5-C), 105.3, 107.6, 114.8, 117.4, 120.5, 127.7, 133.6, 155.2, 157.9, 170.1 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 333,0 (M+H)+.							
2.3f	38.42	220-222	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S ₂	57.71	4.50	4.81	57.73	4.52	4.83
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.48 (d, J = 2017.8 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.38 (s, 0H), 4.36 (dd, J = 10.2, 4.0 Hz, 1H), 3.90 (qd, J = 8.1, 3.9 Hz, 3H), 3.81 (dd, J = 14.2, 7.6 Hz, 1H), 3.12 (dt, J = 14.2, 4.5 Hz, 1H), 3.01 (td, J = 11.5, 5.9 Hz, 1H), 2.29 - 2.18 (m, 1H), 1.71 - 1.59 (m, 2H), 1.40 (h, J = 7.4 Hz, 2H), 0.91 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (ESI+) m/z: 292,04 (M +H)+.							
2.3j	64.0	190-192	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ S ₂	58.43	5.48	4.01	58.60	5.70	4.10
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	(етанол-DMF 4:1). ¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 0.91 (t, J=7.2Hz, 3H, CH ₃), 1.40 (h, J = 7.4, 7.0Hz, 2H, CH ₂), 1.59-1.71 (m, 2H, CH ₂), 2.18-2.28 (m, 1H, 5a-H), 3.01 (td, J=11.5, 5.9Hz, 1H, 5-H), 3.12 (dt, J=14.2, 4.5Hz, 1H, 5-H), 3.81 (dd, J=14.2, 7.6Hz, 1H, 6-H), 3.84-3.91 (m, 3H, CH ₂ +11b-H), 4.36 (dd, J=10.2, 4.0Hz, 1H, 6-H), 6.38 (s, 1H, arom.), 6.53 (d, J = 6.9Hz, 1H arom.), 7.28 (d, J=8.3Hz, 1H arom.), 11.48 (s, 1H, NH). ¹³ C NMR (100MHz, DMSO-d ₆ , δ): 13.7 (CH ₃), 18.7, 27.2, 30.7, 36.7, 38.0, 67.2, 68.5, 102.6 (5-C), 105.4, 107.4, 114.6, 120.5, 127.7, 155.3, 158.6, 170.2 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 349,0 (M+H)+.							

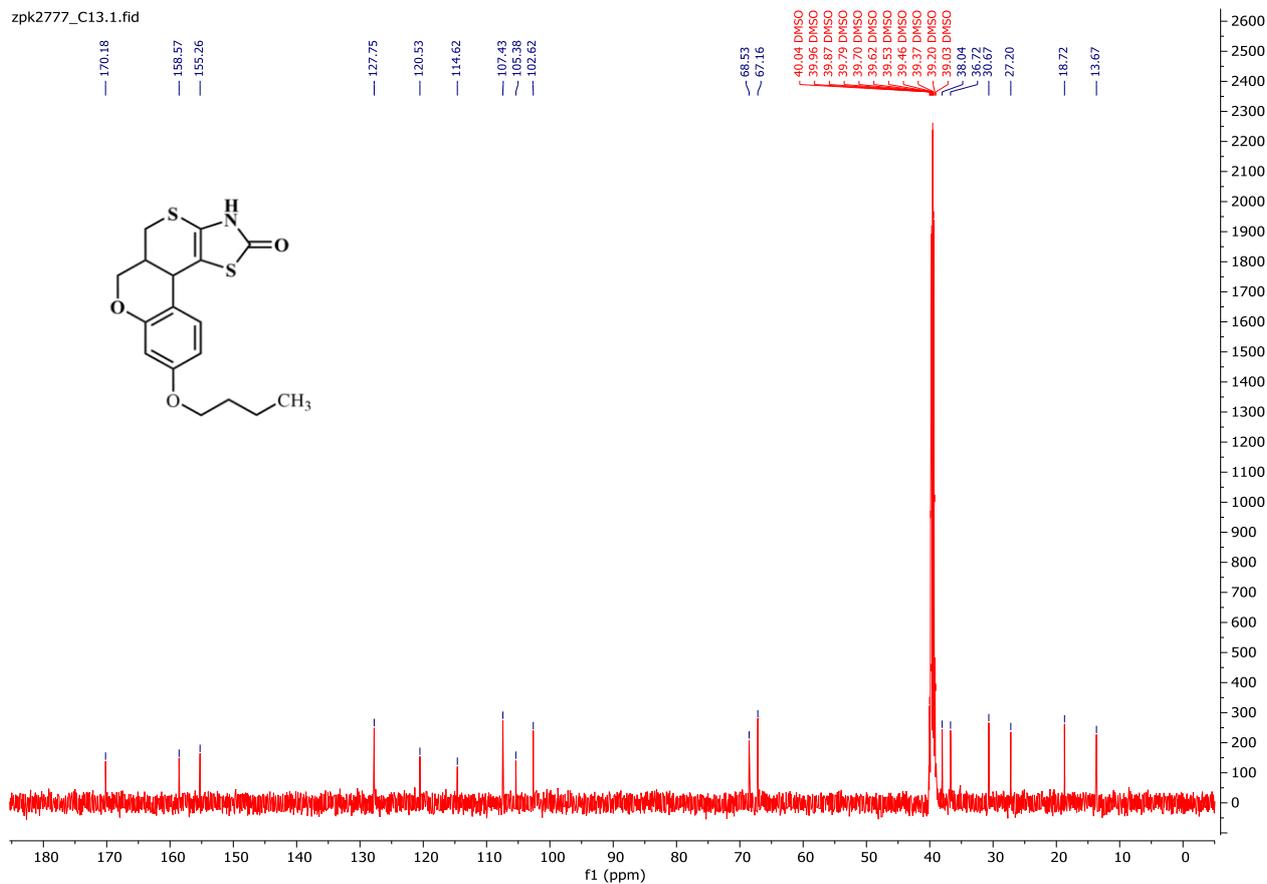
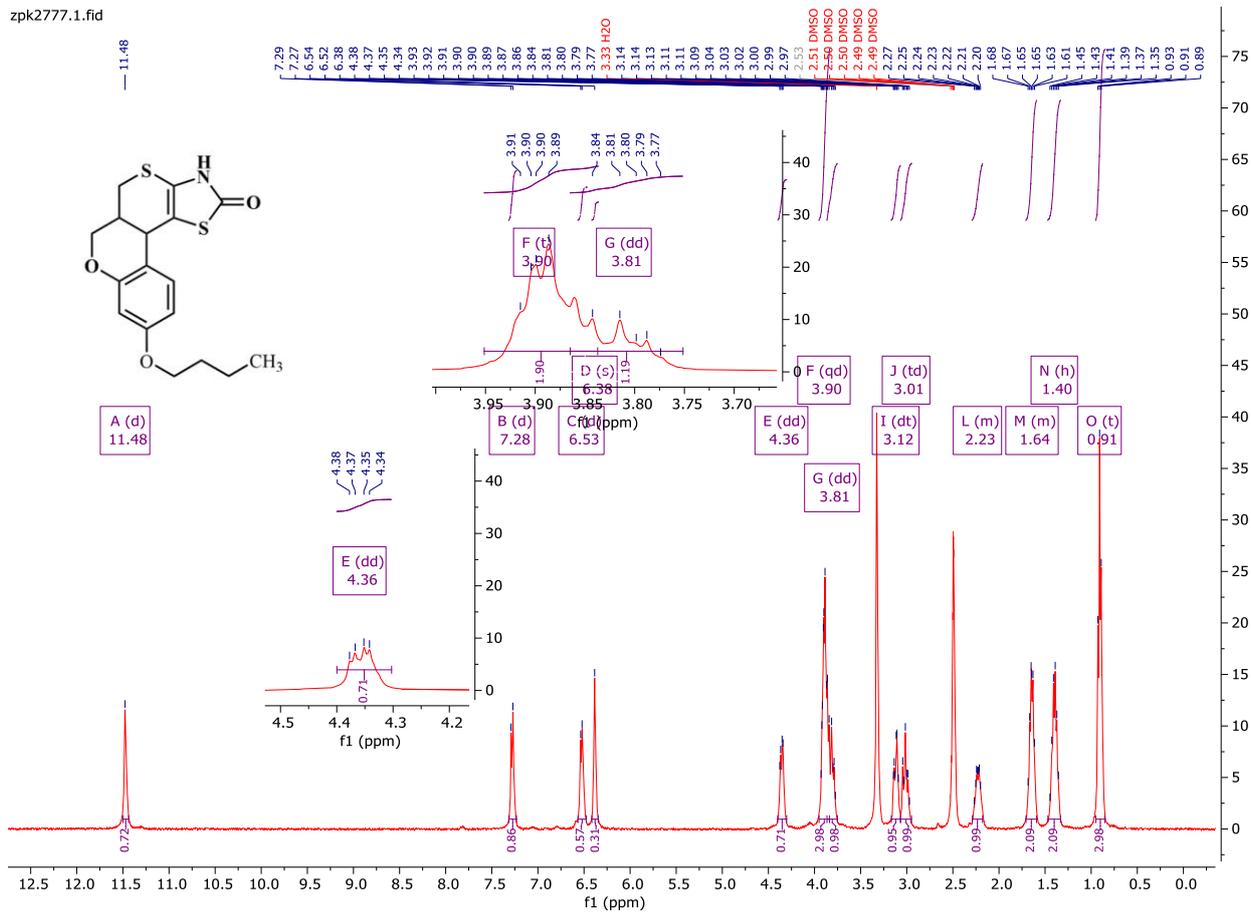


Рис. 2.1. Спектри ^1H та ^{13}C ЯМР 9-бутокси-3,5а,6,11в-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-д]тіпзол-2-ону **2.3j**.

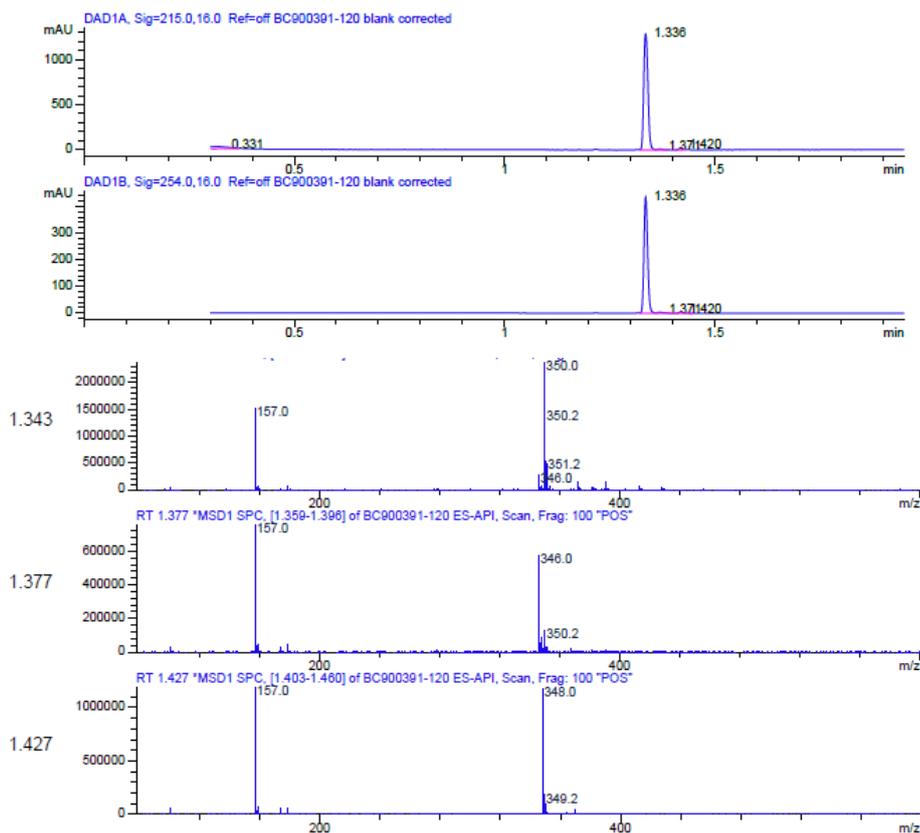


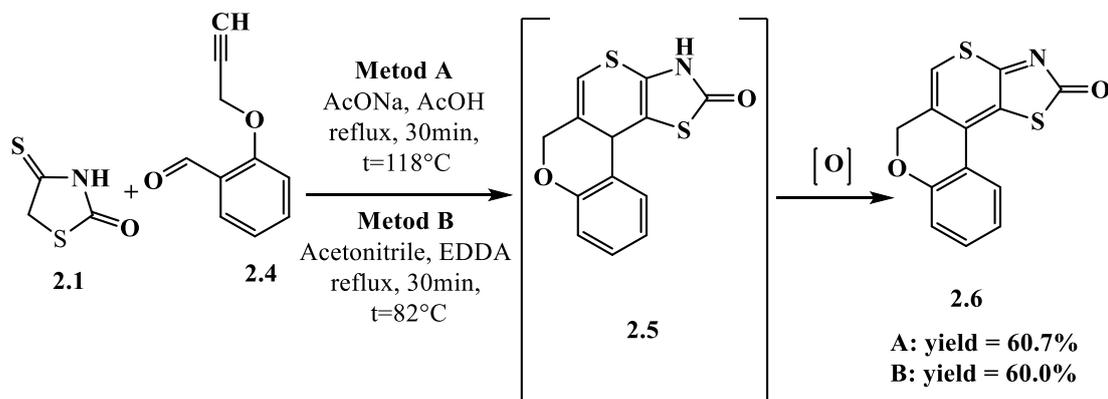
Рис. 2.2. Спектр LC-MS 9-бутокси-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.3j**.

2.1.1 Синтез 2Н,6Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону

При взаємодії вихідної сполуки 4-тіоксо-2-оксотіазолідинону **2.1** з 2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегідом відбувається тандемна реакція типу Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера, у результаті якої утворюється проміжний циклічний продукт **2.5**. Ймовірно, початковий етап реакції включає утворення сполуки Кньюенагеля шляхом нуклеофільного приєднання активного метиленового фрагмента **2.1** до альдегідної групи бензальдегіду з подальшою дегідратацією. Отриманий проміжний продукт далі зазнає внутрішньомолекулярної циклоконденсації за механізмом гетеро-Дільса-Альдера, що супроводжується формуванням нової тіопірано-тіазольної системи. Реакцію проводили у середовищі оцтової кислоти в присутності ацетату натрію як каталізатора Метод А. Суміш нагрівали під зворотним холодильником при помірному кипінні протягом 30 хвилин, що забезпечувало повне перетворення вихідних реагентів у проміжну сполуку **2.5**. Подальше окиснення цього проміжного продукту

приводило до утворення стабільної конденсованої системи - 2H,6H-хромено[4',3':4,5]-тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.6**. [34] Також дана реакція була проведена з використанням ацетонітрилу як реакційного середовища в присутності EDDA з метою оптимізації виходу продукту реакції, проте дана маніпуляція не призвела до очікуваного результату Метод В.

Схема 2.2. Схема синтезу 2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.6**



Синтезований 2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **2.6** порошок жовтого кольору нерозчинний в етанолі, оцтовій кислоті, ацетонітрилі та діоксані, розчинний в ДМФ при нагріванні. Очистку одержаного похідного проводили шляхом перекристалізації з суми рочинників ДМФ\етанол (1:2).

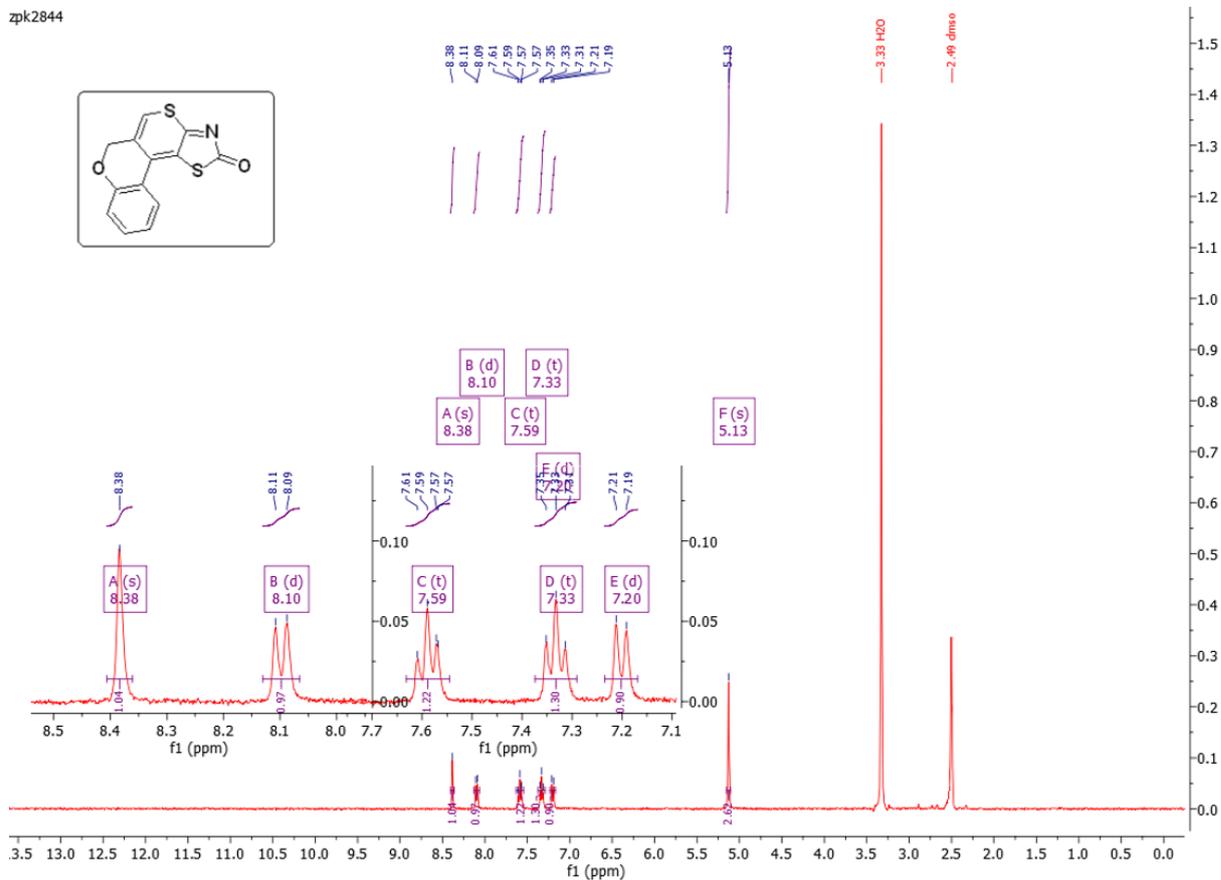
Одержаний 2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **2.6** ідентифіковано на основі елементного аналізу та спектрів LC-MS, ¹H та ¹³C ЯМР (Рис. 2.3. та 2.4.).

Протони 6-Н хроменого циклу похідного **2.6** резонують у вигляді синглету при 5.13 м.ч. спостерігається зсув сигналу 5-Н у ароматичну область, де він проявляється як синглет при 8.38 м.ч.

Таблиця 2.2. Фізико-хімічні параметри 2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.6**

Сполука	Вихід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
2.6	60.7	273-275	C ₁₃ H ₇ NO ₂ S ₂	57.13	2.58	5.12	58.00	3.70	5.30
	Спектр ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 5.13 (s, 2H, CH ₂ , 2*6-H), 7.20 (d, J=8.2Hz, 1H, arom.), 7.33 (t, J=7.7Hz, 1H, arom.), 7.59 (t, J=7.5Hz, 1H, arom.), 8.10 (d, J=8.1Hz, 1H, arom.), 8.38 (s, 1H, 5-H). ¹³ C NMR (100MHz, DMSO-d ₆ , δ): 68.5, 108.4 (5-C), 116.6, 118.2, 121.1, 123.1, 126.3, 128.2, 134.1, 137.9, 159.3, 166.5, 170.7 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 273,0 (M+H)+.							

zpk2844



zpk2844_C13.1.fid

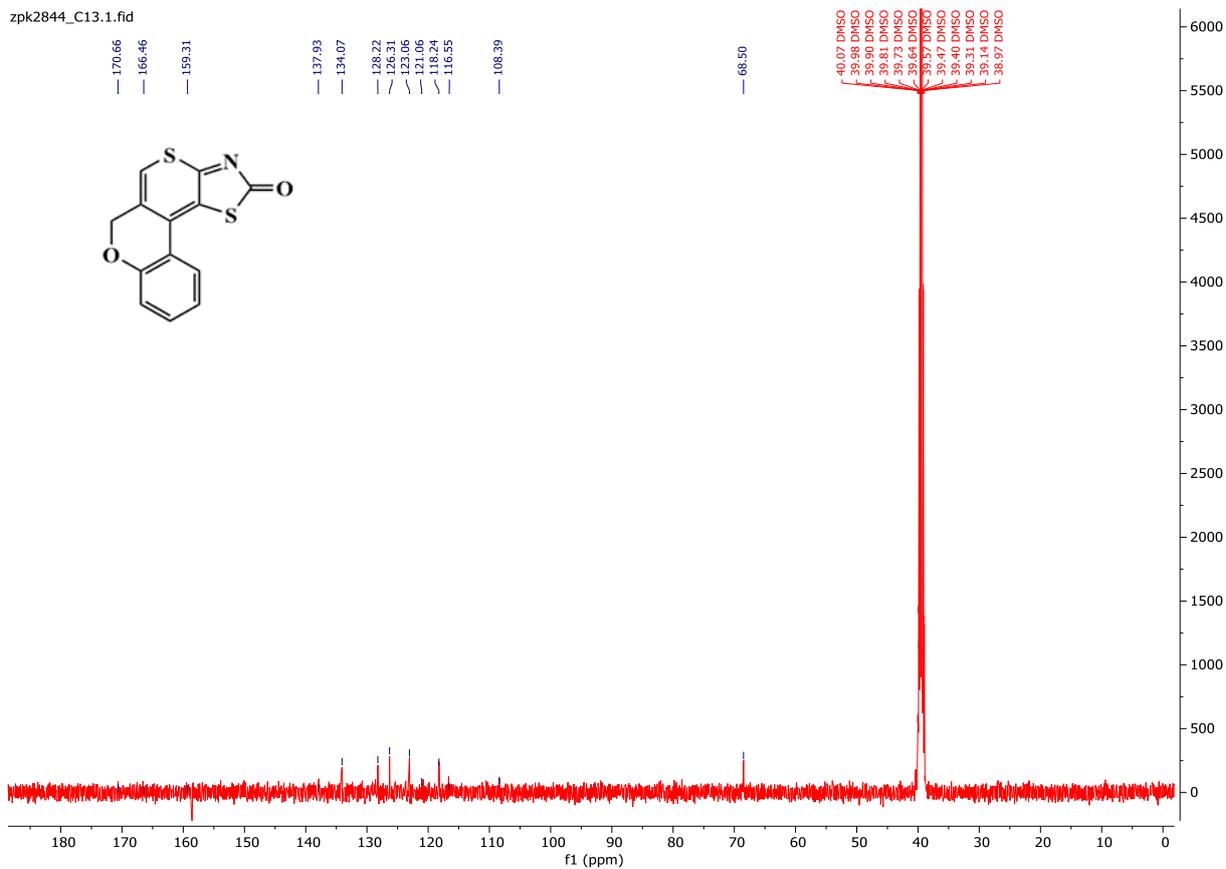


Рис. 2.3. Спектри ¹H та ¹³C ЯМР сполуки 2.6.

MaxPeak: 100.00%
Ret_Time: 1.242 min

Mol Wt
Exact Mass
Time Area#

1 1.242 100.00

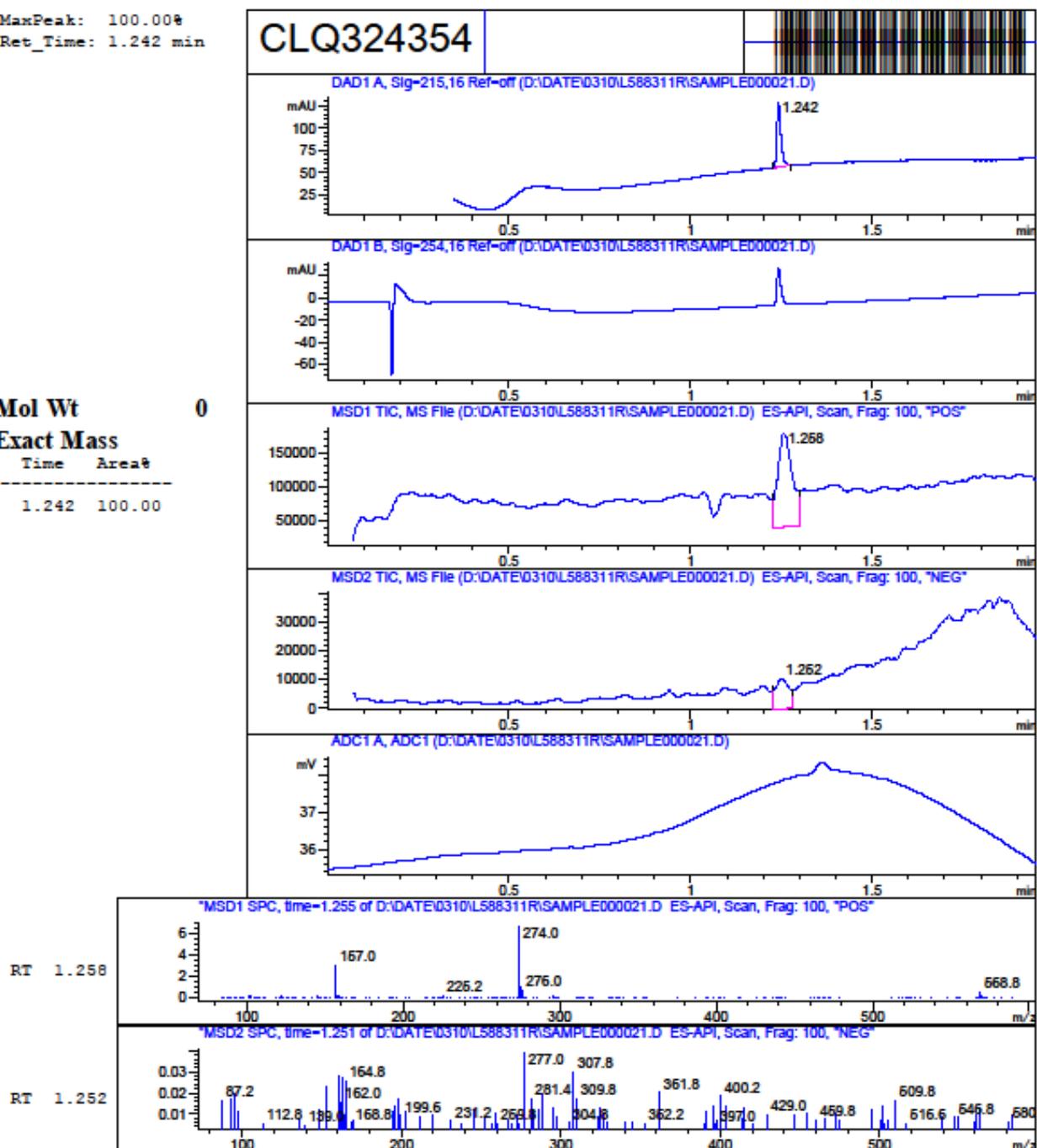


Рис. 2.4. Спектр LC-MS 2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону 2.6.

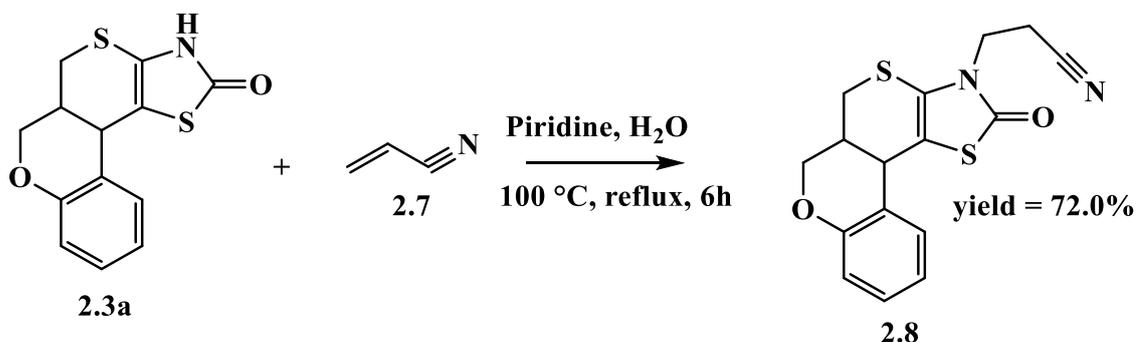
2.1.2 Синтез 3-(2-оксо-5*a*,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)пропанонітрилу

Сполука 2.3*a*, що містить реакційноздатний нуклеофільний центр у положенні 3, була введена в реакцію з акрилонітрилом, у результаті чого утворювався 3-(2-оксо-5*a*,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)пропанонітрил 2.8. Реакцію проводили в гетерогенному

середовищі піридину та води, що забезпечувало як активацію акрилонітрилу внаслідок протонного обміну, так і стабілізацію проміжного аніонного комплексу, який утворюється при приєднанні нуклеофільного центру сполуки **2.3a** до подвійного зв'язку акрилонітрилу.

Реакційна суміш кип'ятили під зворотнім холодильником протягом 6 годин. Після завершення реакції сполуку осаджували водою та виділяли продукт, який очищували методом перекристалізації з етанолу. Отриманий пропанонітрил **2.8** являє собою стабільну сполуку з добре вираженими електрофільними властивостями нітрильної групи, що робить його придатним для подальших хімічних модифікацій.

Схема 2.3. Схема синтезу 3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу **2.8**



Одержаний похідне **2.8** ідентифіковане на основі елементного аналізу та спектрів LC-MS, ¹H та ¹³C ЯМР

Таблиця 2.3. Фізико-хімічні параметри 3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу **2.8**

Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
2.8	72.0	115-120	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	58.16	4.27	8,48	58.20	4.32	8,43
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): 2.18-2.30 (m, 1H, 5aH), 2.88 (t, 2H, CH ₂ CH ₂ CN), 3.05 (t, 1H, J = 10.6 Hz, 5-H), 3.30 (dd, 1H, J = 3.8, 10.6 Hz, 5-H), 3.90 (t, 1H, J = 10.4 Hz, 6-H), 3.92 (t, 2H, CH ₂ CH ₂ CN), 4.10 (d, 1H, J = 10.4 Hz, 11b-H), 4.42 (dd, 1H, J = 3.7, 10.4 Hz, 6-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 8-H), 6.94 (t, 1H, J = 8.0 Hz, 10-H), 7.17 (t, 1H, J = 7.6 Hz, 9-H), 7.40 (d, 1H, J = 7.6 Hz, 11-H). ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆): 17.3, 28.6, 38.1, 38.7, 39.5, 68.7, 106.5, 117.7, 118.4, 121.2, 122.8, 124.1, 127.7, 128.9, 154.9, 169.4. ESI-MS m/z: 331,0 (M+H) ⁺							

Дані наведені в таблиці 2.3 відповідають літературним джерелам [58].

Зокрема, сполука **2.8** була використана нами як ключовий проміжний продукт у ряді подальших хімічних перетворень, спрямованих на побудову конденсованих гетероциклічних систем, потенційно здатних проявляти біологічну активність. Очистку одержаного похідного проводили шляхом перекристалізації з суми рочинників ДМФ\етанол (1:2).

2.1.3 Синтез N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено [4',3':4,5] тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду

Синтез цільової сполуки **2.14** було здійснено за двома альтернативними методами, що відрізнялися кількістю стадій та умовами проведення реакцій.

Метод А базувався на реакції ціаноетилювання з подальшими послідовними хімічними перетвореннями проміжних сполук. На першому етапі отримували кислоту **2.9** шляхом кип'ятіння розчину похідного **2.8** у суміші оцтової та соляної кислот під зворотним холодильником протягом 3 годин. Утворений продукт після охолодження осаджували, відфільтровували та промивали охолодженою водою для видалення залишків кислот.

Наступним кроком було одержання хлорангідриду **2.10**. Для цього до розчину кислоти **2.9** у діоксані додавали тіонілхлорид і суміш кип'ятили під зворотним холодильником протягом 30 хвилин. Реакція супроводжувалася виділенням діоксиду сірки та хлоридом водню, що свідчило про перебіг процесу хлорування. Отриманий хлорангідрид використовували без додаткового очищення на наступному етапі синтезу.

Для одержання кінцевої сполуки **2.14** до розчину хлорангідриду **2.10** у діоксані додавали *p*-хлоранілін і триетиламін. Суміш кип'ятили під зворотним холодильником протягом 10 хвилин, після чого утворений осад відфільтровували та очищували перекристалізацією з оцтової кислоти.

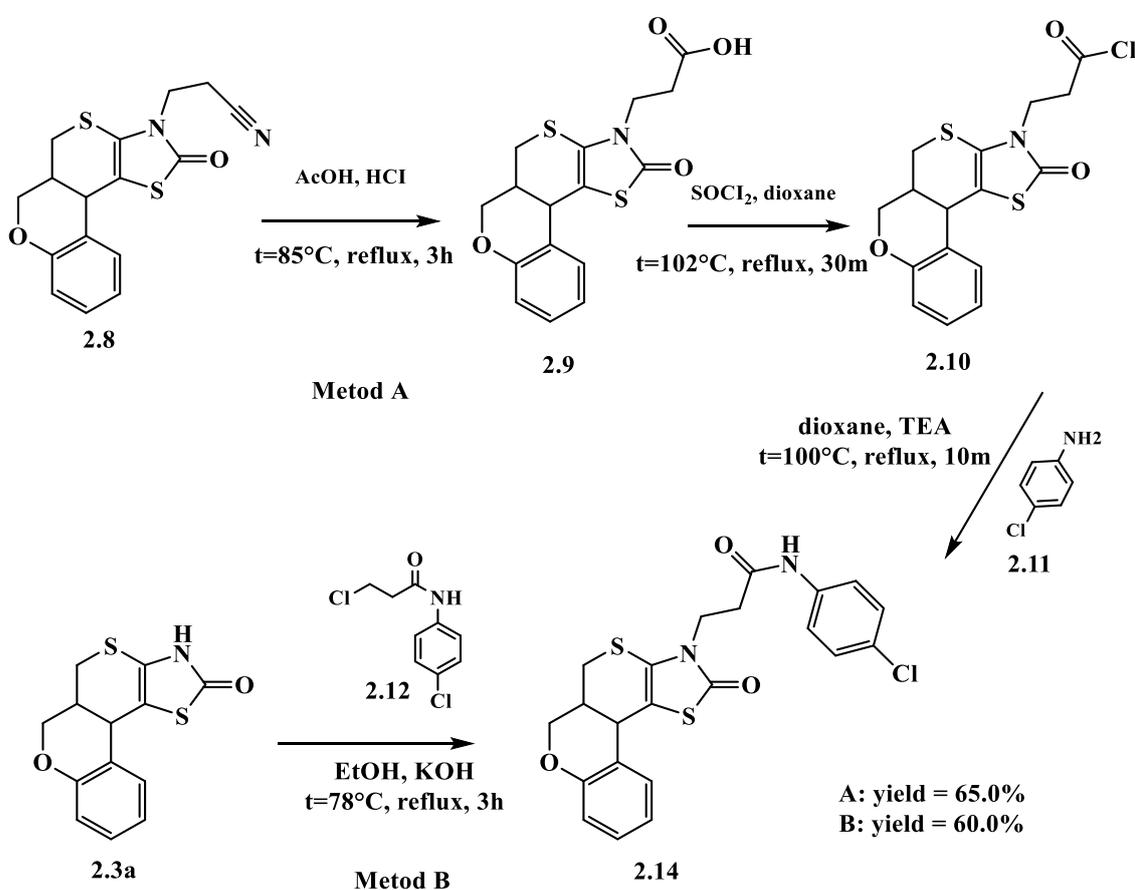
Метод А був здійснений згідно методики розробленої нами раніше [58].

У свою чергу ми здійснили синтез кінцевого 3-заміщеного похідного **2.14** за допомогою методу В, який мав низку переваг, зокрема меншу кількість синтетичних стадій, зменшену потребу у використанні реагентів та розчинників,

а також скорочення тривалості процесу. У цьому випадку вихідна сполука **2.3a** безпосередньо вводилась у реакцію з 3-хлор-N-(4-хлорфеніл)пропанамідом **2.12** у середовищі спиртового розчину KOH. Реакція проходила з утворенням цільового похідного **2.14**, яке було виділено з реакційної суміші після нейтралізації та очищене методом перекристалізації.

Таким чином, обидва методи дозволяють одержати сполуку **2.14** з високим ступенем чистоти, однак метод В є більш економічно вигідним та технологічно спрощеним, що робить його доцільним для подальшого масштабування.

Схема 2.4. Схема синтезу N-(4-хлорфеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду **2.14**



Похідне **2.14** є порошком жовтого кольору, розчиним в етанолі при нагріванні. Очистку одержаного похідного проводили шляхом перекристалізації з етанолу [58].

Одержаний *rel*-N-(4-[хлорофеніл])-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]-тіопірано[2,3-d][1,3]тіазол-3(6H)-іл]пропанамід **2.14** ідентифіковано на основі елементного аналізу та спектрів.

Таблиця 2.4. Фізико-хімічні параметри N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5] тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)-іл)пропанаміду **2.14**

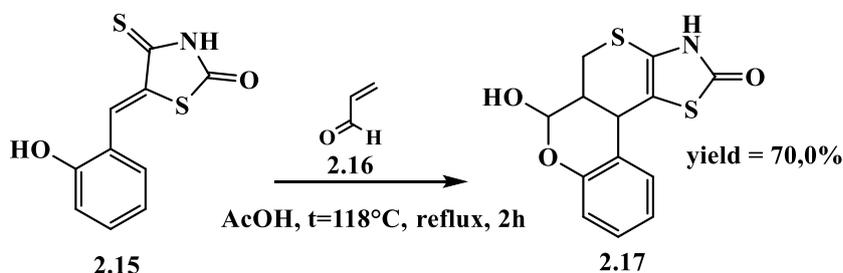
Сполука	Вихід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				С	Н	N	С	Н	N
2.14	65.0	230-232	C ₂₂ H ₁₉ ClN ₂ O ₃ S ₂	57.57	4.17	6.10	57.60	4.13	6.20
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): 2.18-2.30 (m, 1H, 5aH), 2.88 (t, 2H, CH ₂ CH ₂ CN), 3.05 (t, 1H, J = 10.6 Hz, 5-H), 3.30 (dd, 1H, J = 3.8, 10.6 Hz, 5-H), 3.90 (t, 1H, J = 10.4 Hz, 6-H), 3.92 (t, 2H, CH ₂ CH ₂ CN), 4.10 (d, 1H, J = 10.4 Hz, 11b-H), 4.42 (dd, 1H, J = 3.7, 10.4 Hz, 6-H), 6.82 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 8-H), 6.94 (t, 1H, J = 8.0 Hz, 10-H), 7.17 (t, 1H, J = 7.6 Hz, 9-H), 7.40 (d, 1H, J = 7.6 Hz, 11-H). ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆): 17.3, 28.6, 38.1, 38.7, 39.5, 68.7, 106.5, 117.7, 118.4, 121.2, 122.8, 124.1, 127.7, 128.9, 154.9, 169.4. ESI-MS m/z: 331,0 (M+H) ⁺							

Дані наведені в таблиці 2.4 відповідають літературним джерелам [58].

2.1.4 Синтез 6-гідрокси-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5] тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону.

5-(2-Гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-он **2.15** зазнає приєднання по типу *гетеро*-Дільса-Альдера з акриловим альдегідом у середовищі оцтової кислоти, що приводить до формування цільової конденсованої гетероциклічної системи **2.17**. Реакція відбувається за класичним механізмом механізмом [4+2]-циклоприєднання з утворенням тіопірано[2,3-*d*]тіазольного циклу, який забезпечує формування конденсованої гетероциклічної системи. Очистку одержаного похідних проводили шляхом перекристалізації з етанолу, що дозволило отримати продукт у високому ступені чистоти.

Схема 2.5 Схема синтезу 6-гідрокси-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **2.17**.



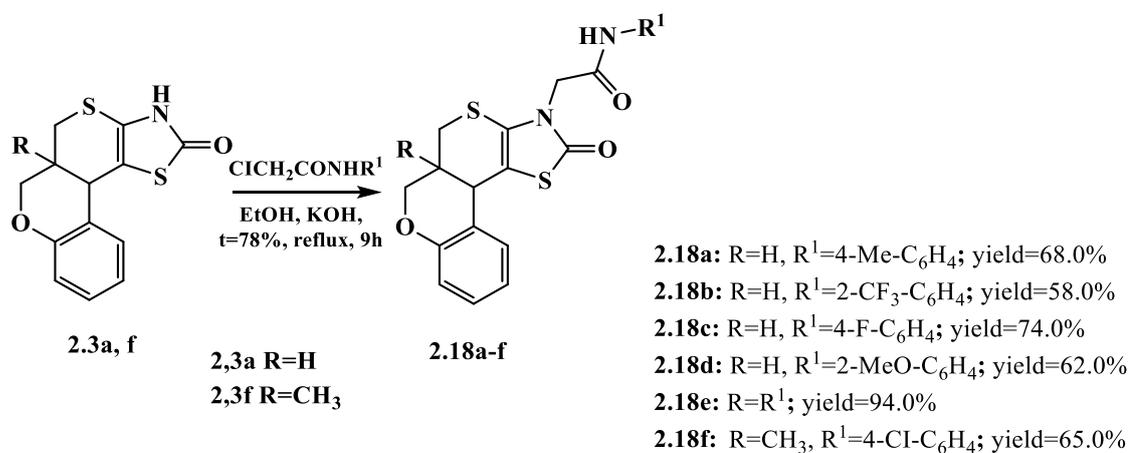
Похідне **2.17** – порошок жовтого кольору, реакція *гетеро*-Дільса-Альдера проходила при температурі кипіння розчинника 118 °C, під зворотнім холодильником протягом 60 хвилин. Після проходження реакції продукт

охолоджували, фільтрували висушували та перекристалізували. Усі фізико-хімічні параметри, спектральні аналізи наведено за посиланням [79].

2.1.5 Синтез деяких 3-заміщених похідних з ацетамідними замісниками.

Вихідні сполуки **2.3a** та **2.3f**, що належать до ряду конденсованих тіопірано[2,3-*d*]тіазольних систем, вводились в реакцію з похідними феніламіду монохлороцтової кислоти. Реакція перебігала в умовах лужного середовища, створеного спиртовим розчином гідроксиду калію. Проведення реакції у таких умовах забезпечувало ефективну активацію нуклеофільного центру N-H в положенні 3 тіазолідинового фрагмента, що у свою чергу, ініціювало проходження процесу нуклеофільного заміщення. Активованій атом Нітрогену гетероциклу здійснював нуклеофільну атаку на електрофільний центр - хлорметильну групу феніламіду монохлороцтової кислоти, що призводило до поступового формування нового C-N зв'язку та утворення відповідних 3-заміщених похідних **2.18a-f**.

Схема 2.6. Схема синтезу 3-заміщених похідних з ацетамідними замісниками.



Ряд 3-заміщених Тіопірано[2-3*d*]Тіазолів **2.18a-e** синтезовано згідно літературної методики, усі фізико-хімічні параметри, спектральні аналізи сполук **2.18a-e** наведено за посиланням [58].

Синтезований *rel*-(5*a*R,11*b*R)-N-(4-хлорфеніл)-2-(5*a*-метил-2-оксо-5*a*,11*b* дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)іл)ацетамід **2.18f** є порошком білого кольору, не розчинним в етанолі та оцтовій кислоті, розчинний в диметилформаміді при нагріванні. Очистку одержаного похідного проводили шляхом перекристалізації з суми рочинників ДМФ/етанол (1:4). [60]

Одержаний *rel*-(5aR,11bR)-N-(4-хлорфеніл)-2-(5а-метил-2-оксо-5а,11b дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)іл)ацетамід **2.18f** ідентифіковано на основі елементного аналізу та спектрів LC-MS, ¹H та ¹³C ЯМР (Рис. 2.5. та 2.6.).

Таблиця 2.5. Фізико-хімічні параметри *rel*-(5aR,11bR)-N-(4-хлорофеніл)-2-(5а-метил-2-оксо-5а,11b-дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)іл)ацетаміду **2.18f**

Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
2. 18f	65.0	186-188	C ₂₂ H ₁₉ ClN ₂ O ₃ S ₂	57.57	4.17	6.10	57.60	4.20	6.21
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 0.80 (s, 3H, CH ₃), 2.88 (d, J=11.3Hz, 1H, 5-H), 3.05 (d, J=11.4Hz, 1H, 5-H), 3.92 (d, J=10.3Hz, 1H, 6-H), 4.09 (s, 1H, 11b-H), 4.16 (d, J=10.5Hz, 1H, 6-H), 4.53 (d, J=4.6Hz, 2H, CH ₂), 6.89 (d, J=8.1Hz, 1H, arom.), 7.00 (t, J=7.5Hz, 1H, arom.), 7.21 (t, J=7.7Hz, 1H, arom.), 7.40-7.33 (m, 2H, arom.), 7.44 (d, J=7.7Hz, 1H, arom), 7.59 12 of 14 Davydov et al. (d, J=8.8Hz, 2H, arom.), 10.51 (s, 1H, NH). ¹³ C NMR (100MHz, CDCl ₃ , δ): 18.5 (CH ₃), 36.3, 37.7, 43.7, 48.0, 75.5, 106.4 (5-C), 119.2, 123.0, 123.1, 123.2, 127.0, 129.5, 130.0, 130.7, 131.0, 139.7, 156.0, 166.8, 171.5 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 459,0 (M +H)+.							

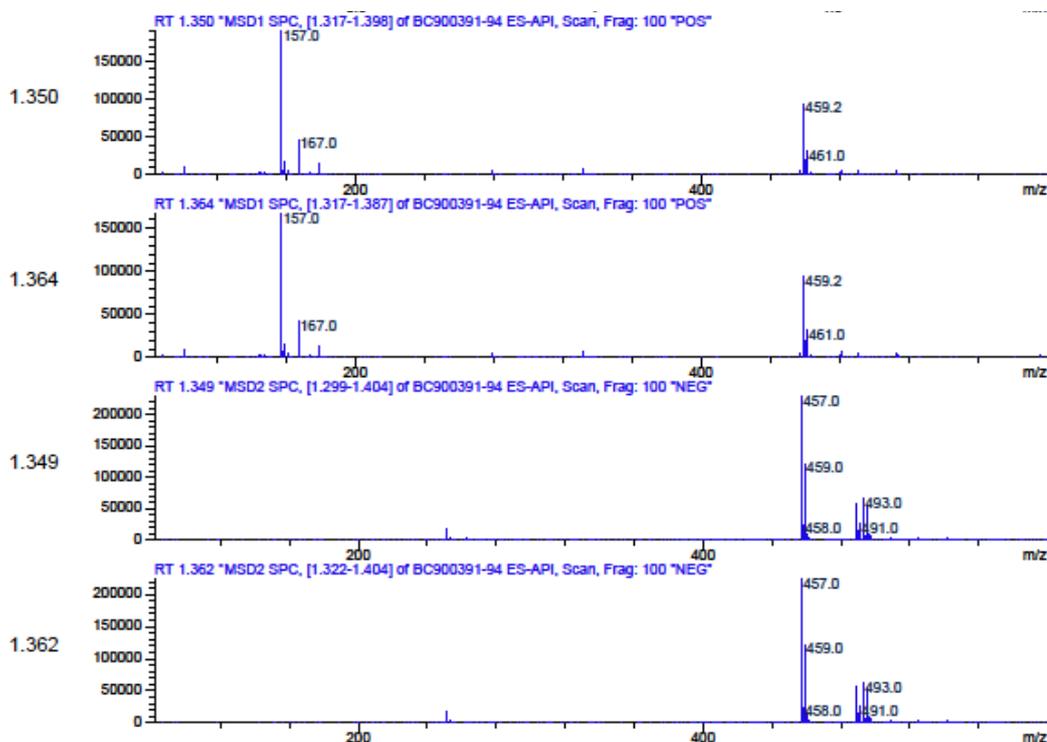


Рис. 2.5. Спектр LC-MS *rel*-(5aR,11bR)-N-(4-хлорфеніл)-2-(5а-метил-2-оксо-5а,11b дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)іл)ацетаміду **2.18f**.

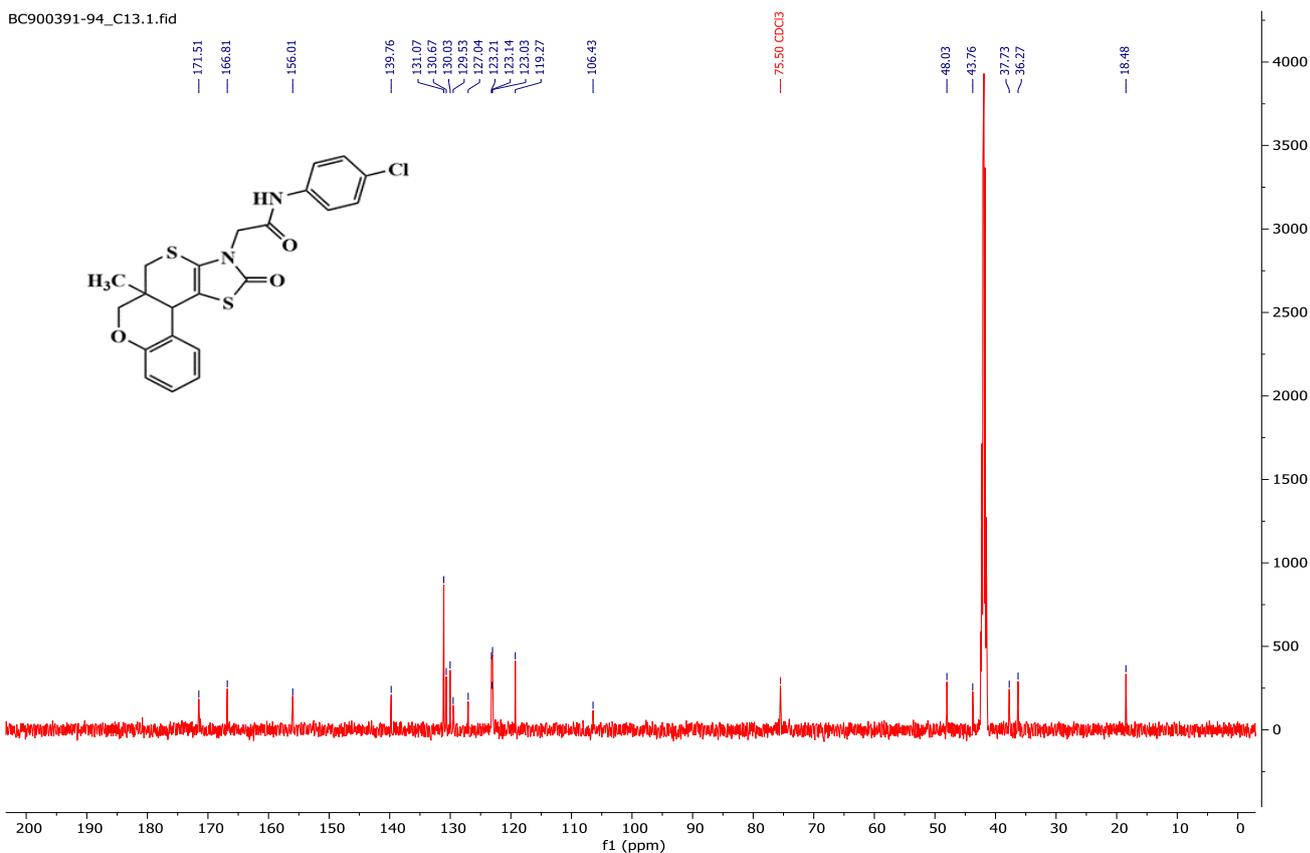
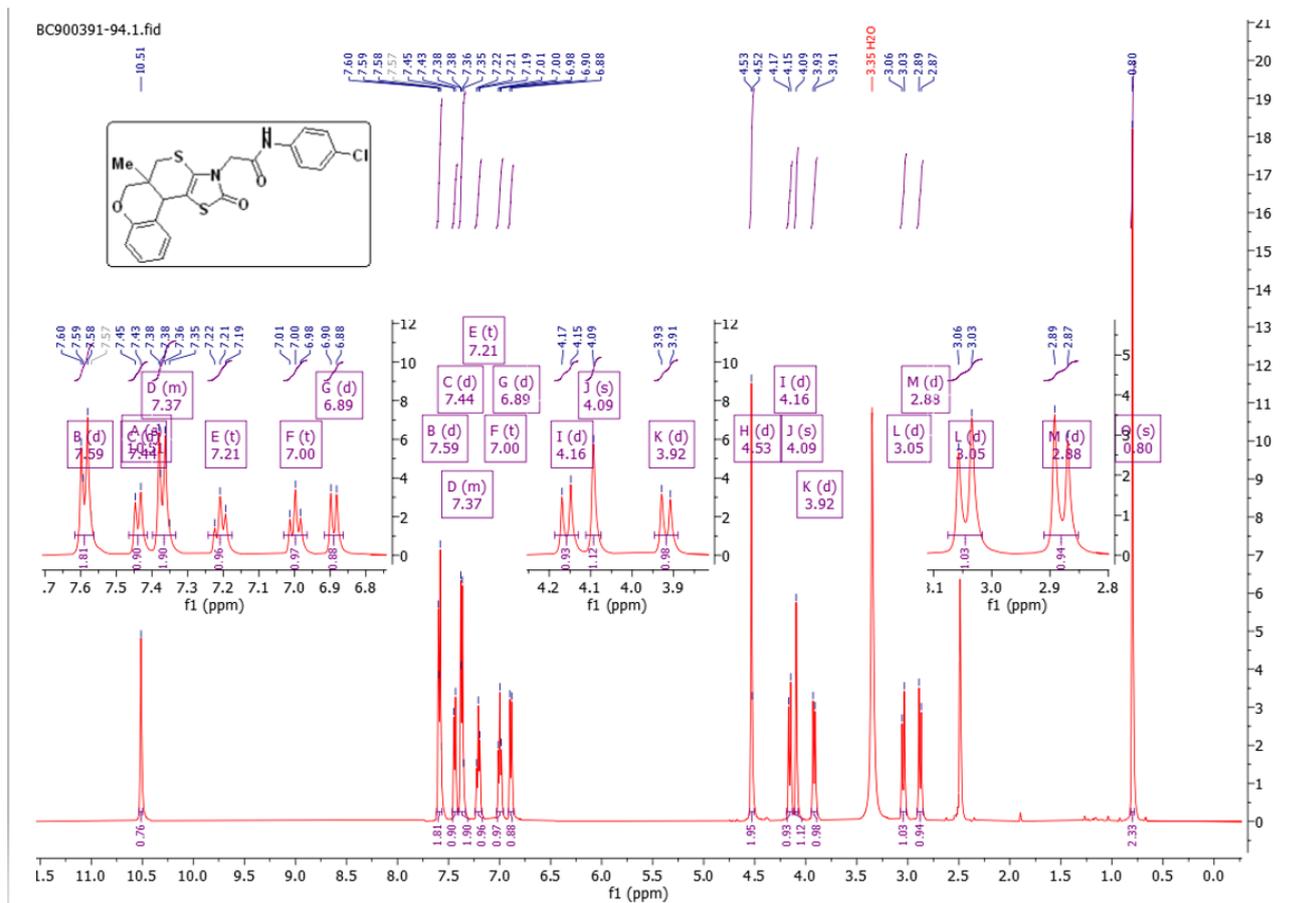
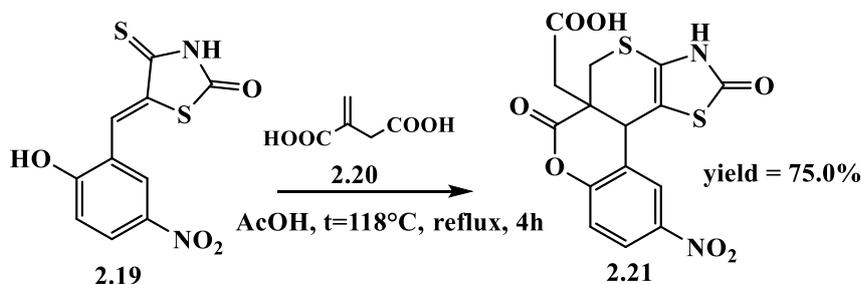


Рис. 2.6. Спектри ^1H та ^{13}C ЯМР *rel*-(5aR,11bR)-N-(4-хлорфеніл)-2-(5a-метил-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)іл) ацетаміду **2.18f**.

2.1.6 Синтез 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5a(6H)-іл)оцтової кислоти.

Синтез цільового продукту **2.21** відбувався згідно літературної методики [79-80]. 5-(2-Гідрокси-5-нітробензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-он в якості гетеродієна був апробований в реакції *гетеро*-Дільса-Альдера з ітаконовою кислотою, що призвело до утворення 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5a(6H)-іл)оцтової кислоти **2.21**. Похідне **2.21** є порошком білого кольору, не розчинним в етанолі та оцтовій кислоті, розчинний в диметилформаміді при нагріванні. Очистку одержаного похідного проводили шляхом перекристалізації з суміші рочинників ДМФ\етанол (1:2). [60]

Схема 2.7. Схема синтезу 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5a(6H)-іл)оцтової кислоти **2.21**



Таблиця 2.6. Фізико-хімічні параметри 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5a(6H)-іл)оцтової кислота **2.21**

Сполука	Вихід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
2.21	75.0	264-267	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₇ S ₂	45.68	2.56	7.10	45.80	2.80	7.30
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 2.70 (d, J=11.6Hz, 1H, 5-H), 2.80-2.87 (m, 1H, 5-H), 3.33-3.40 (m, 2H, CH ₂), 4.64 (s, 1H, 11b-H), 7.41 (d, J=8.8Hz, 1H, arom.), 8.25-8.33 (m, 2H, arom.), 11.64 (s, 1H, COOH), 12.51 (s, 1H, NH). ¹³ C NMR (100MHz, DMSO-d ₆ , δ): 21.4, 30.5, 38.1, 42.1, 100.4 (5-C), 118.7, 121.2, 124.9, 125.8, 125.9, 144.6, 154.0, 167.0, 170.7 (C=O), 171.1 (C=O), 172.6 (C=O). LCMS (ESI+) m/z: 395,0 (M+H) ⁺ .							

Для похідного **2.21** протони 5-H прописуються дублетом при 2.70 м.ч. та мультиплетом у діапазоні 2.80-2.87 м.ч. Сигнал протона 11b-H спостерігається у

вигляді синглету при 4.64 м.ч. Інші протони резонують у відповідних ділянках спектра з характерними константами спін-спінової взаємодії (Рис. 2.7.).

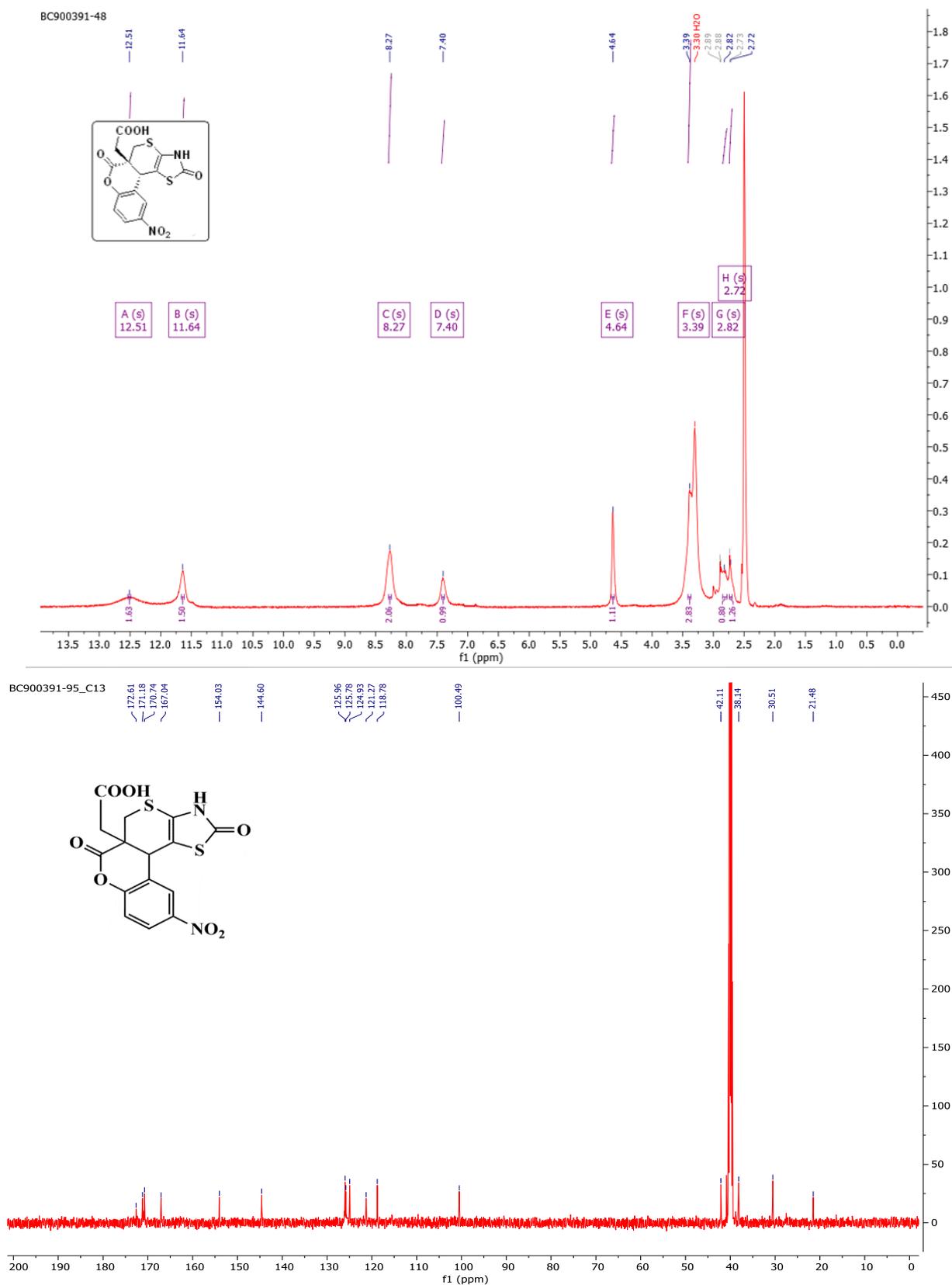


Рис. 2.7. Спектри ^1H та ^{13}C ЯМР 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11в-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5а(6*H*)-іл)оцтової кислоти **2.21**.

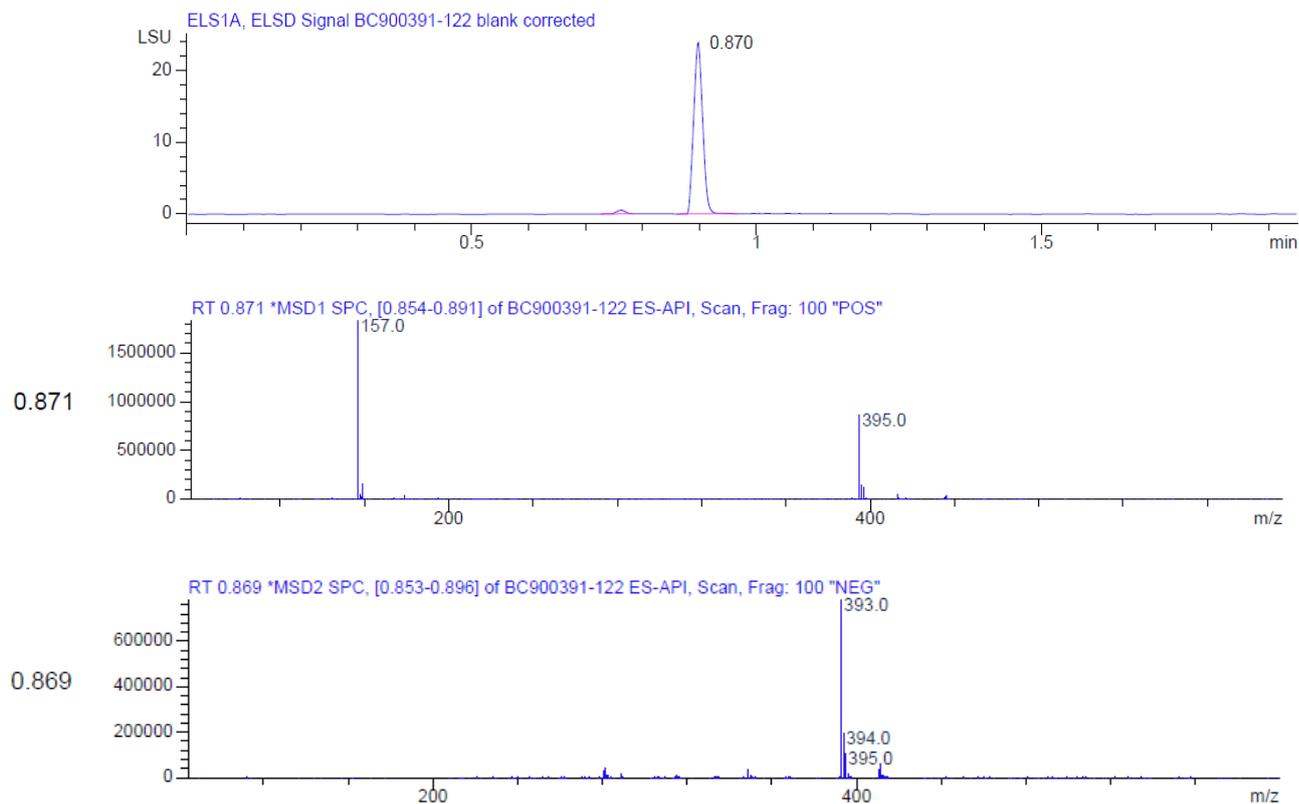


Рис. 2.8. Спектр LC-MS 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5а(6*H*)-іл)оцтової кислоти **2.21**.

2.2 Вивчення протисудомної активності синтезованих похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу.

Епілепсія уражає 50-70 млн людей у всьому світі та становить близько 0,75 % глобального тягаря хвороб. Щороку приблизно у 5 млн осіб уперше діагностують епілепсію [81]. Однак, попри надзвичайно значні досягнення сучасної медицини й фармації у розробці підходів і лікарських засобів для лікування епілепсій, частка фармакорезистентних пацієнтів протягом останніх 100 років залишається практично незмінною [82]. Останні десятиліття були відзначені схваленням близько тридцяти протиепілептичних препаратів третього покоління, у деяких випадках - з інноваційними механізмами дії [83]. Це досягнення є суттєвим, проте воно не дозволило остаточно подолати проблему судом, а низка схвалених препаратів знайшла обмежене застосування через недостатню ефективність та/або несприятливий профіль безпеки, або навіть була виведена з ринку, як у випадку

ретігабіну [82]. Таким чином, розробка протиепілептичних лікарських засобів і надалі залишається складним завданням із незадоволеними медичними потребами.

На сьогодні одним із основних напрямів у медичній хімії потенційних протисудомних агентів є пошук нових біологічних мішеней і патологічних шляхів, здатних впливати на розвиток або запобігати виникненню судомного процесу [84].

Протягом останніх десятиліть докладалися значні зусилля для розуміння патофізіології епілептичних нападів [85], що зумовило дослідження модуляторів GABA_A-рецепторів [86, 87], потенціалкерованих іонних каналів [88, 89], білка SV2A [90], сигнального шляху mTOR [91- 92], ферменту COX-2 [93, 94] та карбоангідази [95, 96] як потенційних протисудомних засобів. Також апробовано та запропоновано для лікування судом застосування поліфармакологічних агентів [82, 97], а також раніше схвалених препаратів із різних фармакологічних груп [84, 98-100].

Протисудомну активність тіопірано[2,3-*d*]тіазолів **2.3a, c, d, j, 2.6, 2.8, 2.14, 2.17, 2.18a-f, 2.21** оцінювали за допомогою моделі судом, індукованих пентилентетразолом (scPTZ-тест). Експерименти проводилися на білих лабораторних мишах-самцях (загалом 98 тварин) масою 18-22 г, отриманих з віварію Центральної науково-дослідної лабораторії Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету (НФаУ, м. Харків, Україна). Тварин утримували групами по 10 у стандартних пластикових клітках при кімнатній температурі 20 ± 2 °C, за 12-годинного світло-темного циклу, з вільним доступом до стандартного корму та води. Усі експерименти проводили з 9:00 до 15:00. Дослідні групи по 6 мишей формували за принципом рандомізації. Усі процедури, що проводилися з тваринами, відповідали етичним стандартам установи, в якій здійснювалися дослідження, та були схвалені Локальним етичним комітетом НФаУ (дозвіл № 10/2023).

2.2.1 Пентилентетразолова модель судом scPTZ.

Судоми, індуковані пентилентетразолом (PTZ), викликали шляхом підшкірного введення PTZ у дозі 90 мг/кг. Тварин розміщували у прозорі

пластикові циліндричні контейнери та безперервно спостерігали протягом 60 хв. Мишей було розподілено на 18 груп з приблизно однаковою кількістю самців і самок:

- **Група 1 (контрольна група)** - тварини отримували очищену воду інтрагастрально (і.г.) через зонд у кількості 0,1 мл/10 г, а через 30 хв - PTZ підшкірно.
- **Група 2 (референтний препарат)** - тварини отримували вальпроат натрію (Depakine, Sanofi-Aventis) і.г. у дозі 300 мг/кг, через 30 хв вводили PTZ підшкірно.
- **Групи 3-18** - тварини отримували досліджувані сполуки (**2.3a, c, d, j, 2.6, 2.8, 2.14, 2.17, 2.18a-f, 2.21**) і.г. одноразово у вигляді водної суспензії, стабілізованої Твіном-80, у дозі 100 мг/кг за 30 хв до індукції судом.

Дозу 100 мг/кг для тестованих сполук було обрано на основі попередніх досліджень ряду похідних 4-тіазолідинону, які продемонстрували виражену протисудомну активність [61, 74]

Таблиця 2.7. Протисудомна активність препарату порівняння та похідних тіопірано [2,3d]тіазолу на пентилентетразоловій моделі судом.

Група тварин (n)	Доза (мг/кг)	Кількість клоніко-тонічних судом на одну мишу		Миші з судомами (%)		Тяжкість судом, бали		Смертність (%)
				Клонічні	Тонічні			
Контрольна група (PTZ) (12)	90	9.25±3.19	5 [2.00; 11.00]	100	83.33	5.50±0.53	6.00[5.50;6.00]	83.33
SV (6)	300	1.50±1.66	0.50 [0; 3.00]	50	16.70	2.50±1.59	2.00[1.00;0.3.00]	16.70
2.3a	100	2.80±0.74	2.00 [1.00; 3.00]	80	100.00	6.00±0.87	6.00 [6.00;6.00]	100.00
2.3e	100	7.60±2.64	7.00 [7.00; 10.00]	80	80	5.00±0.17	6.00[6.00;6.00]	80.00

2.3c	100	3.80±0 .04	3.00 [2.00; 4.00]	100	80	5.40± 0.45	6.00 [6.00;6.0 0]	80.00
2.3j	100	3.20±0 .46	2.00 [2.00; 3.00]	100	40	4.60± 0.11	4.00[4.0 0;6.00]	40.00
2.3d	100	5.20±0 .95	3.00 [3.00; 6.00]	100	100	5.60± 0.59	6.00 [5.00;6.0 0]	100.00
2.6	100	4.20±0 .24	3.00 [1.00; 3.00]	100	100	6.00± 0.88	6.00# [6.00;6.0 0]	100.00
2.18f	100	5.60±1 .23	4.00 [4.00; 5.00]	100	100	6.00± 0.88	6.00# [6.00;6.0 0]	100.00
2.18e	100	2.20±1 .17	2.00 [1.00; 2.00]	80	60	4.80± 0.03	5.00[4.0 0;6.00]	60.00
2.18a	100	2.40±1 .03	2.00 [1.00; 3.00]	80	60	5.00± 0.17	6.00[4.0 0;6.00]	60.00
2.18c	100	1.60±1 .59	0 [0; 3.00]	40	60	4.60± 0.11	6.00[4.0 0;6.00]	60.00
2.18d	100	2.60±0 .88	2.00 [1.00; 2.00]	80	60	4.60± 0.11	6.00[4.0 0;6.00]	60.00
2.18b	100	2.20±1 .17	2.00 [1.00; 2.00]	100	20	3.80± 0.67	3.00[3.0 0;4.00]	20.00
2.8	100	7.60±2 .65	5.00 [5.00; 8.00]	80	100	6.00± 0.88	6.00 [6.00;6.0 0]	100.00 #
2.14	100	2.00±1 .31	0 [0; 3.00]	40	20	2.60± 1.52	1.00[1.0 0;4.00]	20.00
2.17	100	3.40±0 .32	2.00 [2.00; 4.00]	100	60	4.80± 0.03	6.00[3.0 0;6.00]	60.00
2.21	100	2.20±1 .17	1.00 [0; 4.00]	60	20	2.80± 1.38	3.00*[1. 00;3.00]	20.00

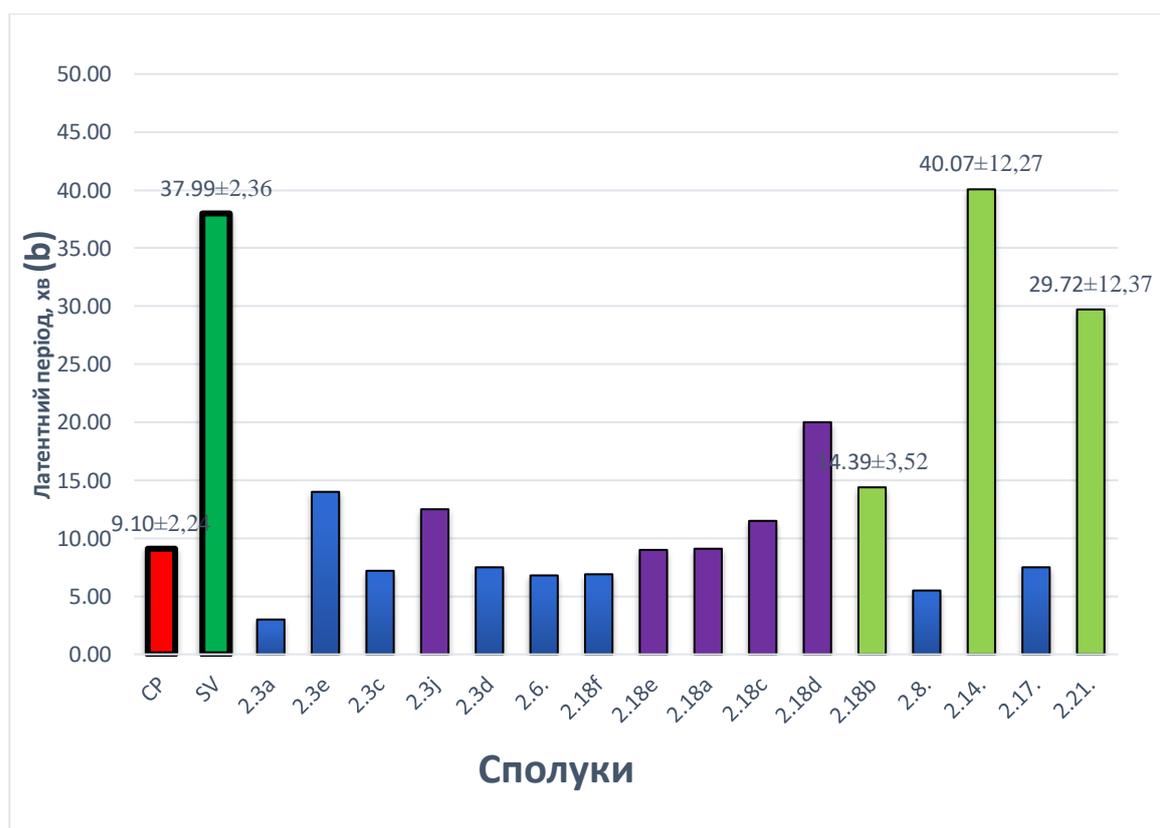
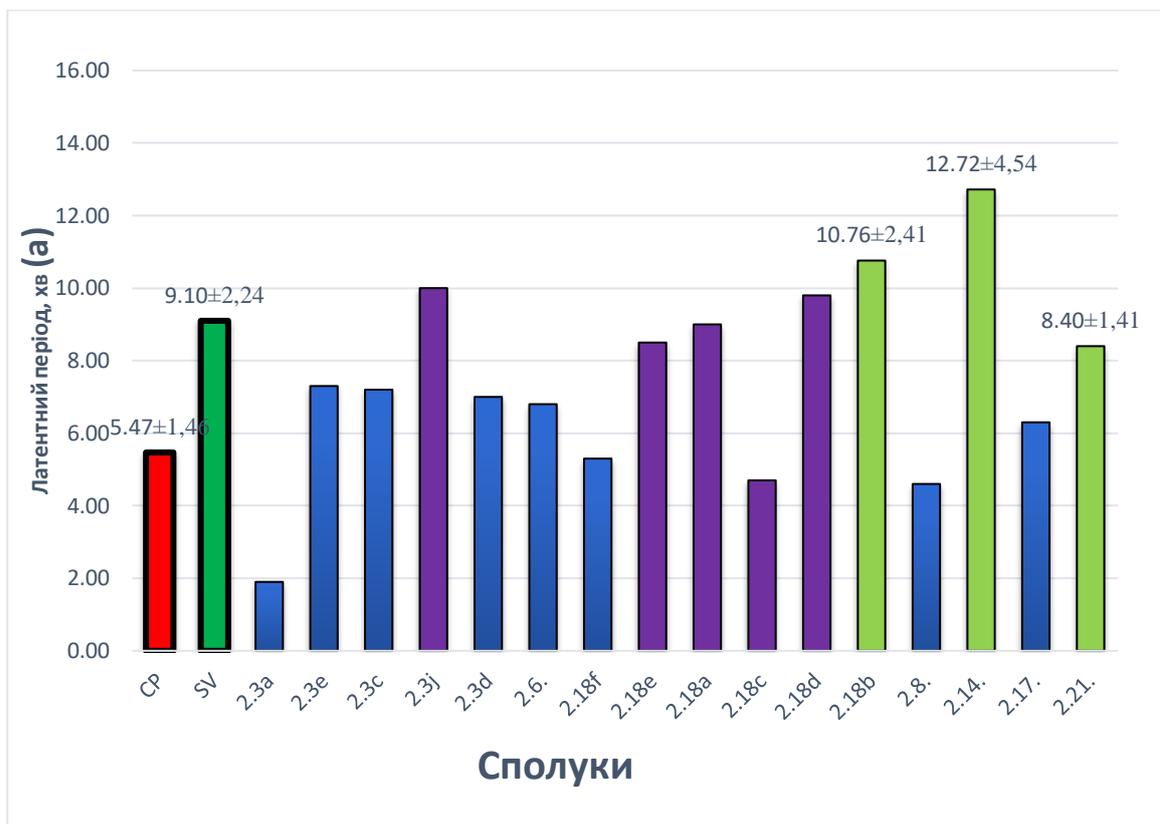


Рисунок 2.9 Антиконвульсанта активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на пентилентетразоловій моделі судом. Латентний період: (а) поодинокі судоми; (b) клонічні судоми. Кожне значення подано як середнє ± SEM. cp(PTZ) - контрольна патологія; SV - натрію вальпроат; * $p < 0,05$; $p < 0,01$ порівняно з групою cp(PTZ).

Ефективність усіх речовин оцінювали за такими показниками: латентний період до появи перших судом; кількість клонічно-тонічних нападів на одну мишу; відсоток тварин із клонічними та тонічними судомами; ступінь тяжкості судом у балах (1 - поодинокі посмикування; 2 - «манежне» бігання або позиція «кенгуру»; 3 - клонічні судоми без бокового положення; 4 - клонічно-тонічні судоми з боковим положенням; 5 - тонічне розгинання; 6 - тонічне розгинання, що призводило до загибелі тварини), тривалість судомного періоду; середній час виживання тварин до смерті; летальність (%). Якщо протягом 1 год судоми не спостерігалися, латентний період вважали рівним 60 хв.

У контрольній патологічній групі за експериментальних умов спостерігався типовий тяжкий судомний синдром із високою летальністю (83,33%) (Табл. 2.7). Клонічні судоми виникали у 100% тварин, тонічні - у 83,33%, і всі миші з тонічними судомами загинули. Лікування тварин референтним препаратом - натрію вальпроатом - продемонструвало виражену протисудомну дію, що максимально запобігало розвитку судом у піддослідних тварин.

Під впливом натрію вальпроату спостерігалось значне зниження ключових параметрів судомного синдрому:

- кількість тоніко-клонічних судом на одну мишу зменшилася у 6,17 разів;
- кількість тварин із клонічними судомами - у 2,00 раза, а з тонічними - у 5,00 разів;
- тяжкість судом знизилася у 2,20 разів;
- тривалість судомного періоду скоротилася майже удвічі (8,46 хв порівняно з 15,93 хв у контрольній групі $sp(PTZ)$);
- летальність зменшилася на 66,63% - з 83,33% до 16,70% ($p < 0,01$) порівняно з групою $sp(PTZ)$ (Табл. 2.7; Рис. 2.9a,b; Рис. 2.10a,b).

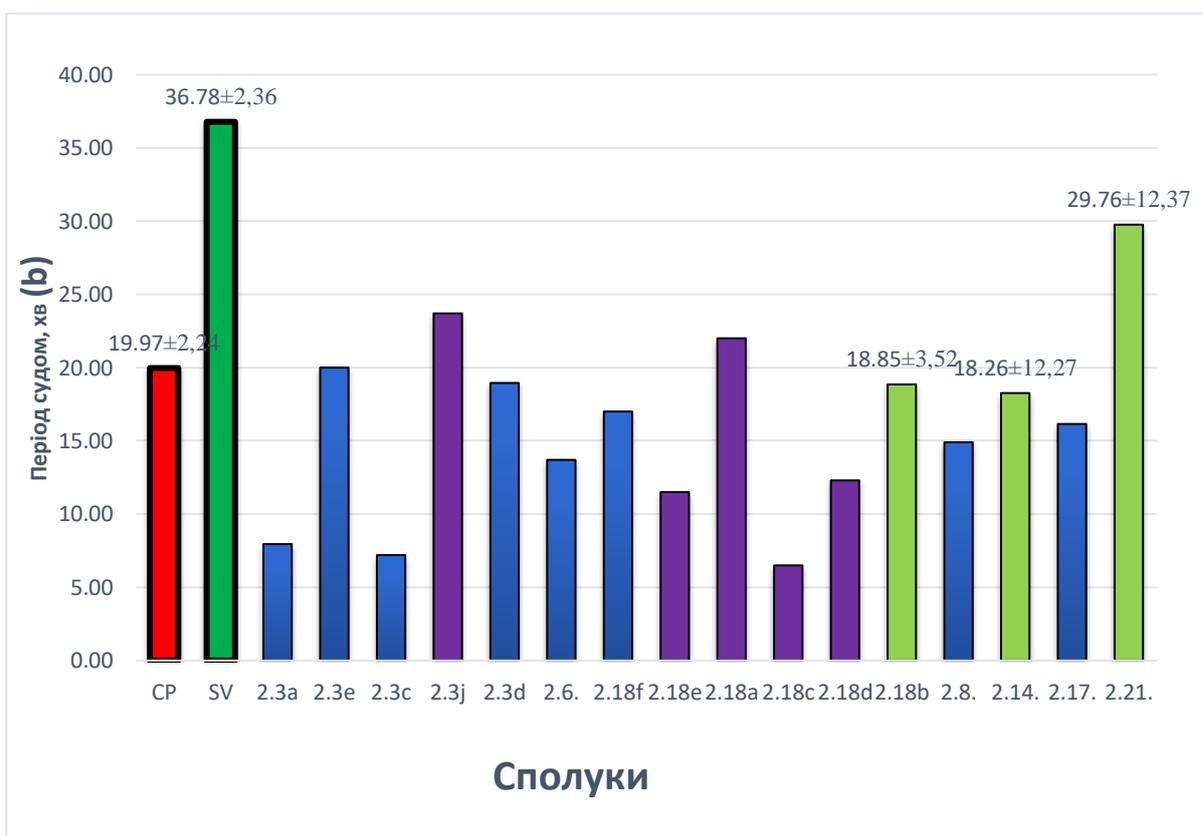
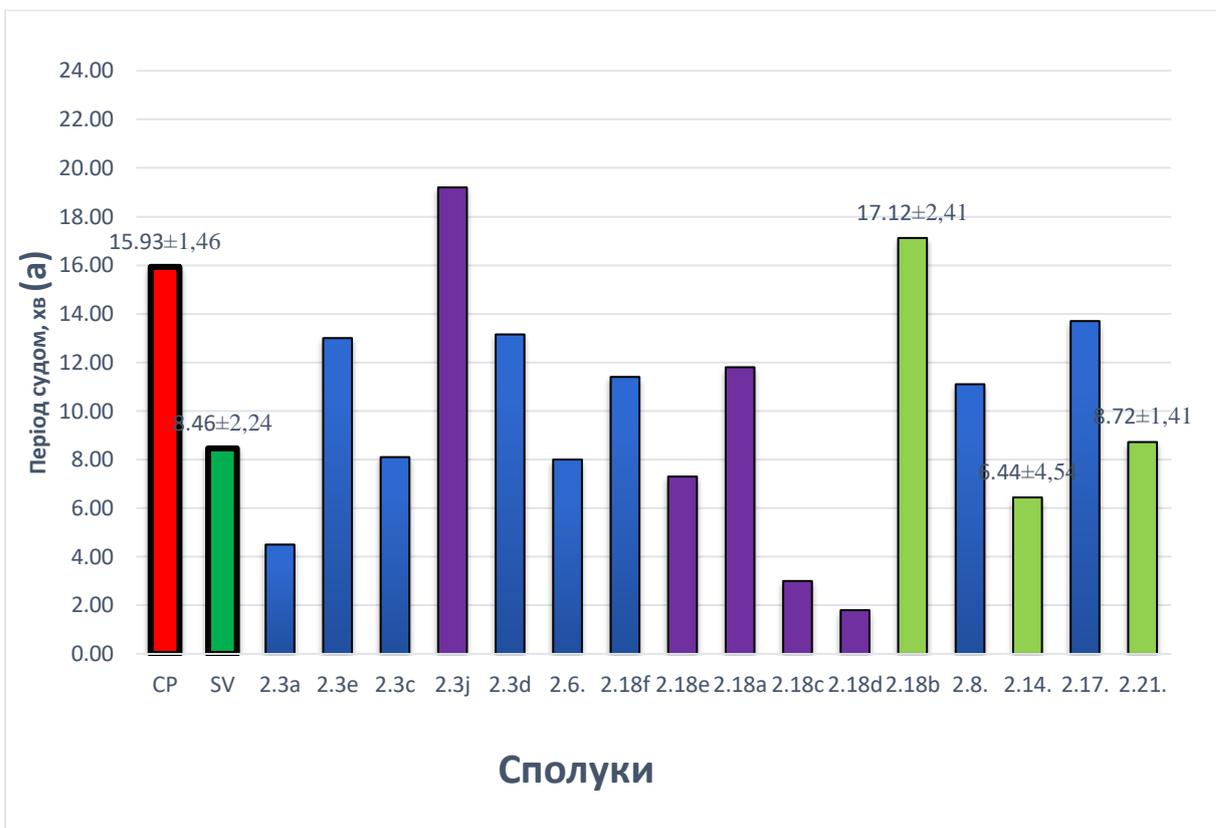


Рисунок 2.10 Антиконвульсанта активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолів на пентилентетразоловій моделі судом. (а) Період судом; (б) час до настання смерті. Кожне значення подано як середнє ± SEM. cp(PTZ) - контрольна патологія; SV - натрію вальпроат; * $p < 0,05$; $p < 0,01$ порівняно з групою cp(PTZ).

На основі результатів скринінгу протисудомної активності (Табл. 2.7, Рис. 2.9a,b та Рис. 2.10a,b) досліджувані похідні тіопірано[2,3-*d*]тіазолу можна розділити на чотири групи відповідно до їхнього впливу на перебіг судомного процесу:

- (A) Похідні, що спричинили не значний вплив на перебіг судом - сполуки **2.3e, 2.3c, 2.3d, 2.6, 2.8 і 2.17, 2.18f** (44% від загальної кількості протестованих сполук);
- (B) Похідні з проконвульсивною дією - сполука **2.3a** (6% від загальної кількості протестованих сполук);
- (C) Похідні з помірними протисудомними властивостями - сполуки **2.3d, 2.18a, 2.18c, 2.18d і 2.18e** (31% від загальної кількості протестованих сполук);
- (D) Похідні, що викликали виражений протисудомний ефект - сполуки **2.18b, 2.14 і 2.21** (19% від загальної кількості протестованих сполук).

Похідні з групи A (сполуки **2.3e, 2.3c, 2.3d, 2.6, 2.8 і 2.17, 2.18f**) не впливали на параметри моделі судомного процесу порівняно з контрольною групою за всіма характеристиками.

Однак введення сполук **2.3e** і **2.8** спричинило статистично достовірне зменшення кількості мишей із клонічними судомами на 20% (до 80%, $p < 0,05$) порівняно з групою *ср*(PTZ), тоді як кількість тварин із найбільш небезпечними тонічними судомами становила 60-100%. Введення сполуки **2.3a** (група B) тваринам викликало проконвульсивний ефект, який проявлявся зростанням кількості мишей із тяжкими тонічними судомами (ступінь 6) та 100% летальністю. Тривалість судомного періоду скоротилася у 3,24 рази ($p < 0,05$), а час життя тварин до загибелі - у 2,58 рази при введенні сполуки **2.3e**.

Сполуки групи C (**2.3d, 2.18e, 2.18a, 2.18c** та **2.18d**) продемонстрували помірні протисудомні властивості. Їх застосування сприяло подовженню латентного періоду розвитку клонічних судом, а також зменшенню їх кількості та тяжкості. Крім того, летальність знизилася від 23,33 до 43,33% порівняно з контрольною групою *ср*(PTZ), де цей показник становив 40-60%.

Похідні з групи **D** (сполуки **2.14**, **2.18b**, і **2.21**) виявили виражений протисудомний ефект. Зокрема, при введенні сполуки **2.21** латентний період розвитку клонічних судом зріс у 3,72 раза ($p < 0,01$), кількість судом на одну мишу зменшилася у 4,20 раза ($p < 0,05$), а кількість мишей із клонічними судомами знизилася на 63,33%, із тонічними - на 40% ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою *ср*(PTZ). Також спостерігалось 1,96-разове зниження індексу тяжкості судом та зменшення смертності на 63,33%, яка становила 20% ($p < 0,01$ порівняно з групою *ср*(PTZ)).

Під дією сполуки **2.18b** відзначено зниження смертності тварин до 20% ($p < 0.01$), хоча зменшення кількості мишей із клонічними судомами не спостерігалось, що може свідчити про певні особливості механізмів її впливу на патогенез судом. Найкращі протисудомні властивості серед досліджуваних сполук в експериментальних умовах продемонструвала сполука **2.14**. Введення даного похідного спричинило п'ятикратне збільшення латентного періоду клонічних судом ($p < 0.01$ порівняно з контрольною групою *ср*(PTZ)) та зменшення кількості мишей із клонічними та тонічними судомами на 60% і 63.33% відповідно. Також смертність знизилась на 63.33-20% ($p < 0.01$), кількість нападів - у 4.62 раза, а вираженість судом - удвічі порівняно з контрольною групою *ср*(PTZ). Протисудомні властивості сполуки **2.14** були еквівалентні до референтного препарату, тоді як показники збільшення латентного періоду настання поодиноких та клонічних судом, зменшення кількості мишей із клонічними судомами та скорочення тривалості судомного періоду були навіть кращими порівняно з натрію вальпроатом.

Варто зазначити, що наявність електронно-акцепторних замісників у фенільному кільці, таких як атом хлору в пара-положенні (сполука **2.14**), підвищувала протисудомну дію, тоді як введення електронодонорних груп (наприклад, метоксигрупи) знижувало активність. Таким чином, оптимальна комбінація структурних фрагментів у похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу, зокрема наявність фенілпропіонамідного замісника при атомі N3, виявилась ключовою для досягнення вираженого протисудомного ефекту.

Ці результати дозволяють зробити висновок, що структурні модифікації в області тіопіранового циклу та замісників у положенні N3 можуть бути перспективним напрямом подальшого дизайну нових потенційних антиконвульсантних агентів серед похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу. Крім того, природа замісників у фенільному кільці фенілацетамідного фрагмента, а також у хроменовому ядрі впливає на рівень активності, і детальне вивчення цих взаємозв'язків становить інтерес для подальшого проектування потенційних протисудомних засобів серед цих гетероциклів. [60]

2.3 Молекулярний докінг.

Молекулярний докінг було проведено з рецептором GABA_A для оцінки можливого механізму дії найбільш активних похідних **2.14**, **2.18b**, і **2.21**, а також для кількісного порівняння їх з референтними лігандами - діазепамом і флумазенілом.

Таблиця 2.8. Спорідненість тестованих сполук **2.14**, **2.18b**, і **2.21** до рецептора GABA_A.

Енергії зв'язування досліджуваних сполук 2.14 , 2.18b , 2.21 та референсних лігандів: діазепаму і флумазенілу.	
Сполуки	GABA _A (PDB 6HUP)
2.14	-10.33
2.18b	-10.41
2.21	-8.708
Diazepam	-9.841
Flumazenil	-8.928

Результати досліджень показали, що сполуки **2.18b** та **2.14** мають високу спорідненість до рецептора GABA_A, з докінг-балами, вищими за показники діазепаму та флумазенілу (Таблиця 2.8). Водночас похідна **2.21** виявила нижчий рівень афінності. Серед усіх досліджуваних сполук найвищу спорідненість у молекулярному докінгу продемонструвала сполука **2.14**.

Накладання позицій діазепаму та сполуки **2.14** показало, що обидві молекули зв'язуються з одними й тими самими амінокислотними залишками. Як відомо, флумазеніл - антагоніст бензодіазепінів, - конкурує за той самий сайт зв'язування, проте утворює з ним міцніший комплекс. Отже, зв'язування сполуки **2.14** вказує на те, що вона імітує дію діазепаму на рецептори GABA_A (Рисунок 2.11).

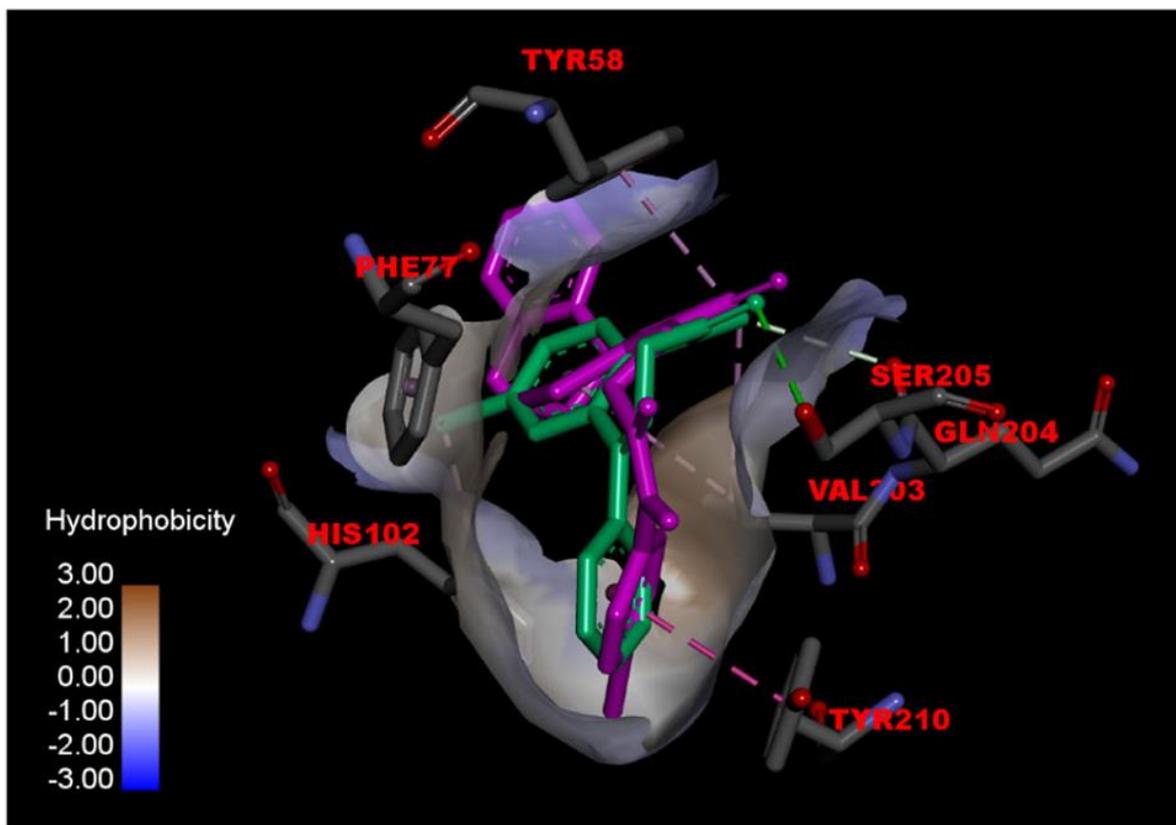


Рисунок 2.11 Порівняння просторових орієнтацій (позицій зв'язування) діазепаму та сполуки **2.14**.

Сполука **2.14** не утворює водневих зв'язків, проте завдяки нековалентним гідрофобним взаємодіям (типу π - π stacking, alkyl та π -alkyl) забезпечує енергію зв'язування, вищу, ніж у референсних лігандів (діазепаму та флумазенілу). Крім того, 2Н,5Н-хроменовий фрагмент молекули формує додаткову Ван-дер-Ваальсову взаємодію, відсутню у комплексі діазепам-GABA_A. Оксогрупа в другій позиції тiazольного кільця утворює слабкий вуглець-водневий зв'язок із Ser205, що сприяє стабілізації сполуки **2.14** у межах сайту зв'язування бензодіазепінів (Рисунок 2.12).

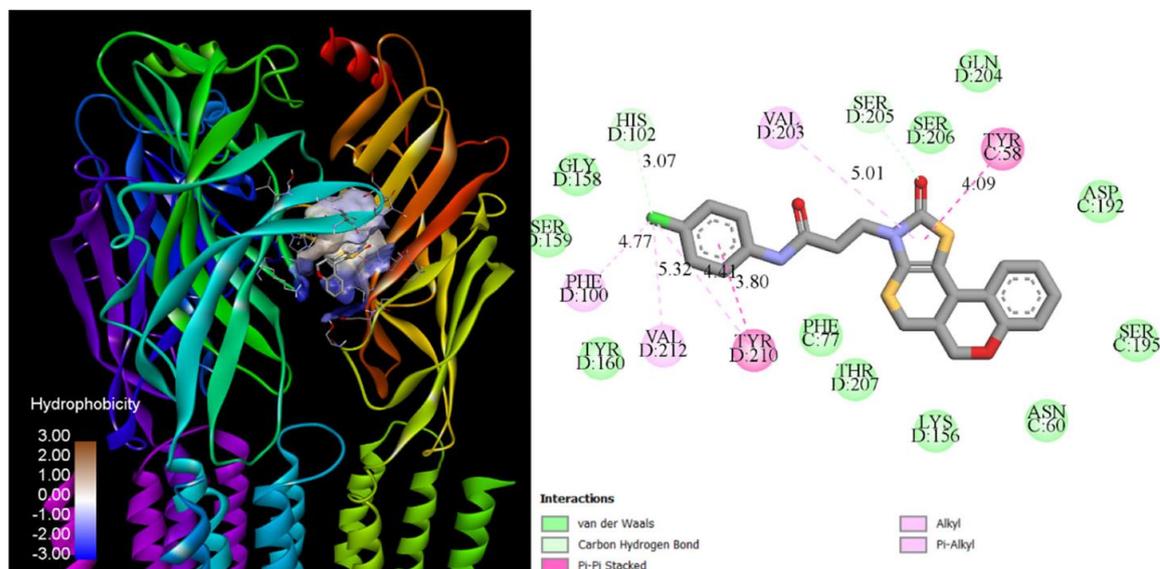


Рисунок 2.12. Тривимірна та двовимірна схеми передбаченої найкращої позиції докінгу сполуки **2.14** (PDB код 6HUP).

2.3.1 Молекулярна динаміка прогнозування стабільності комплексу похідного **2.14** та GABA_A (MD) simulation.

Прогноз стабільності комплексів сполуки **2.14** та діазепаму, отриманих шляхом докінгу з рецепторами GABA_A у межах бензодіазепінового сайту зв'язування, був виконаний із використанням MD-симуляцій у програмі GROMACS. Середньоквадратичне відхилення (RMSD) отриманих комплексів оцінювали на основі згенерованих траєкторій симуляції (Рисунок 2.13).

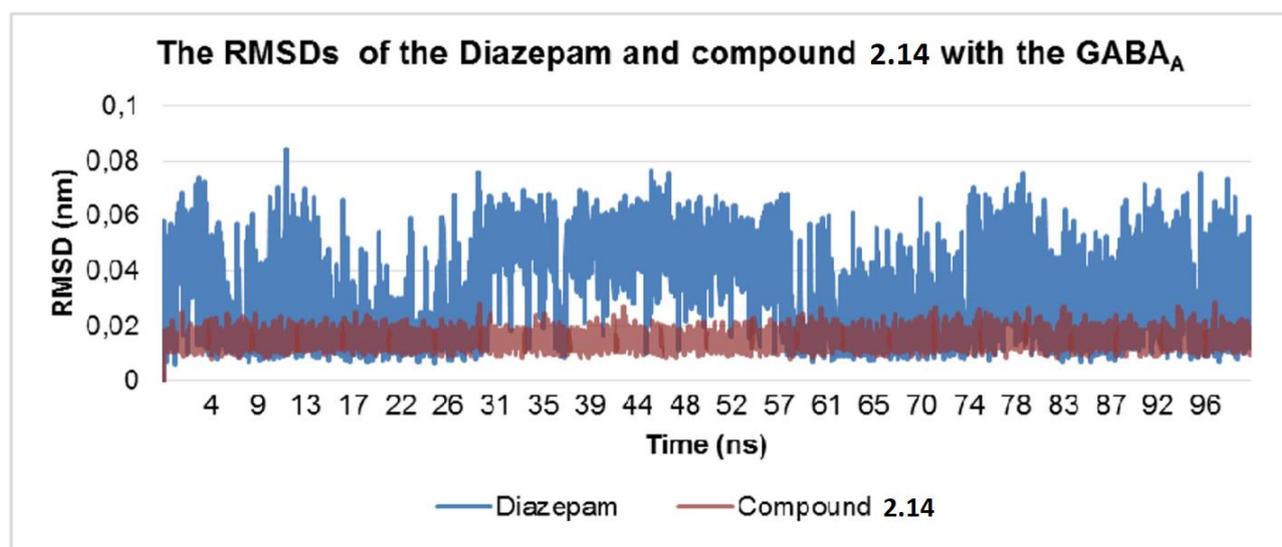


Рисунок 2.13. Середньоквадратичні відхилення (RMSD) комплексів діазепаму та сполуки **2.14**.

Обидва ліганди продемонстрували сприятливі результати, при цьому значення RMSD не перевищували 0.09 нм. Однак сполука **2.14** виявила високу стабільність, оскільки флуктуації в межах бензодіазепінового сайту зв'язування були мінімальними, перевищуючи стабільність діазепаму та зберігаючи відхилення близько 0.02 нм протягом усієї 100-нс симуляції. Взаємодія обох лігандів характеризується переважно ліпофільними зв'язками. Проте сполука **2.14** підтримувала більш стабільну кількість водневих зв'язків під час симуляцій, на відміну від діазепаму, який у більшості випадків їх не утворював (Рисунок 2.14).

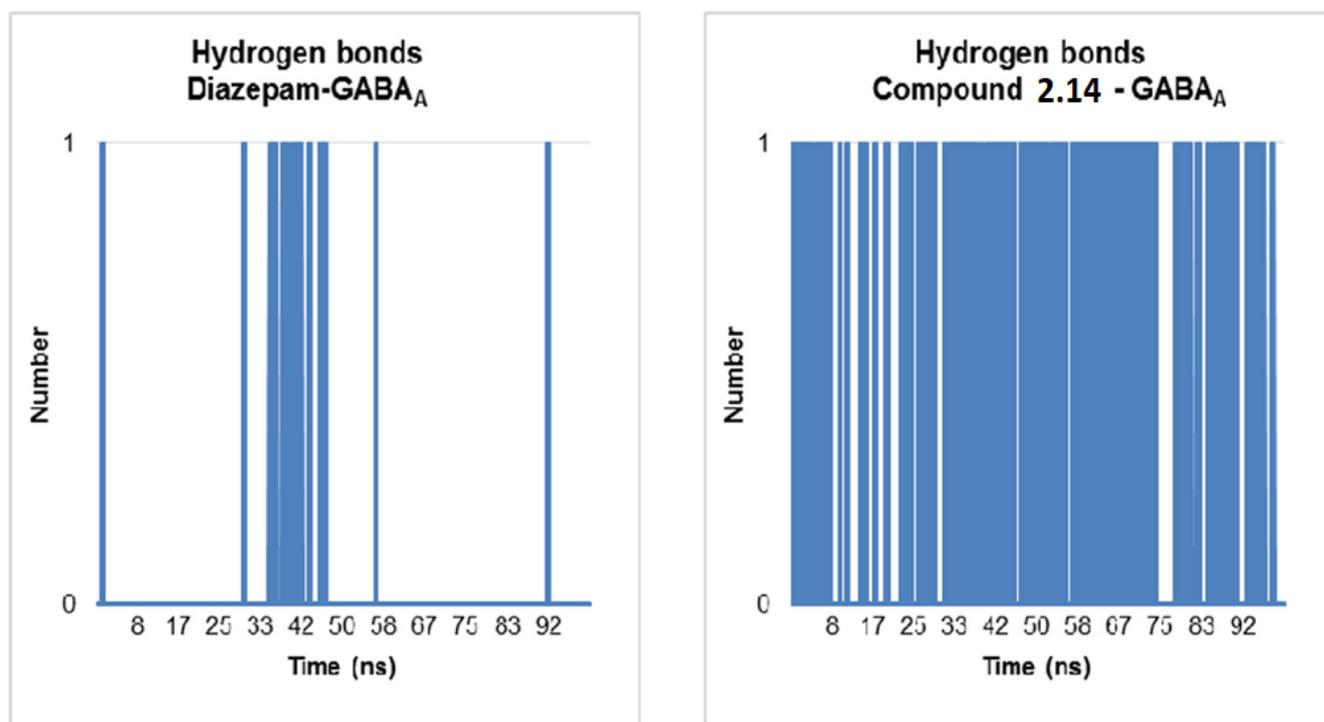


Рисунок 2.14. Середня кількість водневих зв'язків, утворених між діазепамом (ліворуч) та сполукою **2.14** (праворуч) із рецептором GABA_A (PDB 6HUP).

Під час MD-симуляції радіус гірації (R_g) залишався стабільним у обох комплексах - як із діазепамом, так і зі сполукою **2.14**, що свідчить про те, що компактність рецептора GABA_A не змінювалась після зв'язування з лігандами (Рисунок 2.15).

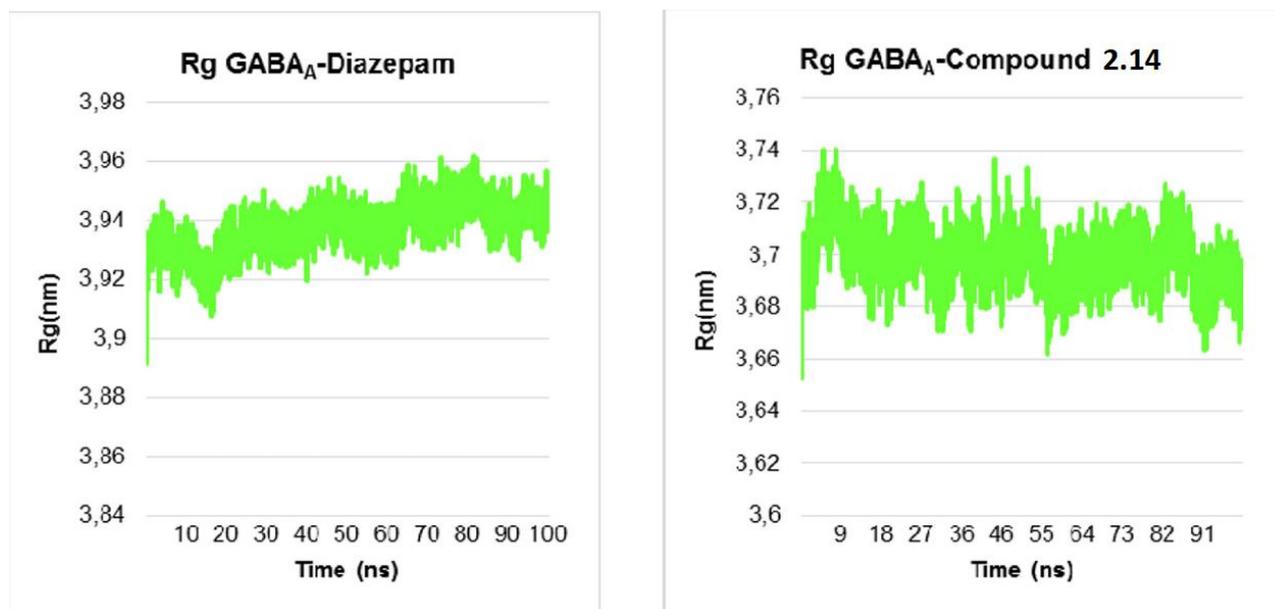


Рисунок 2.15. Радіус гірації (Rg) для діазепаму (ліворуч) та сполуки **2.14** (праворуч) у комплексі з рецептором GABA_A (PDB 6HUP).

MD-аналіз показав, що сполука **2.14** утворює стабільний комплекс із рецептором GABA_A, а прогнозовані властивості цього комплексу є аналогічними або навіть кращими, ніж у референтного ліганду та комерційного препарату діазепаму. Кріоелектронна мікроскопічна структура рецептора GABA_A (роздільна здатність: 3,58 Å; PDB 6HUP) [105] була отримана з Protein Data Bank. Підготовчі процедури виконували з використанням AutoDock Tools v.4.2.6 [132], включно з видаленням усіх лігандів і молекул води, а також додаванням полярних атомів Гідрогену. До амінокислот рецептора GABA_A були також додані заряди Коллмана. Хімічні формули досліджуваних сполук будували за допомогою Biovia Draw, а їхні тривимірні структури оптимізували у програмі Avogadro [101] із застосуванням силового поля MMFF94 та 10 000 кроків геометричної оптимізації.

Для перетворення у відповідний формат симуляції (pdbqt) використовували OpenBabel [102]. Перед проведенням симуляцій до структур сполук **2.18b**, **2.14** та **2.21** додавали заряди Гастейгера, а також дозволяли всі можливі обертальні рухи зв'язків. Для отримання передбачених позицій і докінгових балів (docking scores) використовували програму AutoDock Vina v.1.2.5 [103], із підвищенням параметра exhaustiveness із стандартного значення 8 до 64. Щоб переконатися у коректності передбачених орієнтацій і положень досліджуваних структур, усі методи та

параметри докінгу були валідавані методом редокінгу двох лігандів - Діазепаму та Флумазенілу.

Отримане значення RMSD [104] для нативного ліганду з комплексу 6HUP становило 0,67 Å, що свідчить про надійність та валідність результатів симуляції. Флумазеніл зв'язується у тому ж самому сайті, що й діазепам, але глибше та вище [105], тому було додатково протестовано параметри для їх здатності відтворювати взаємодію Флумазенілу в бензодіазепіновому сайті зв'язування. Розмір ґраткового поля (grid box) становив $60 \times 60 \times 60$, що було достатнім для точного прогнозування положень як агоніста, так і антагоніста. Отримані докінгові бали для діазепаму та флумазенілу використовували як референтні для порівняння з досліджуваними сполуками.

MD-симуляції для сполуки **2.14** та діазепаму проводили із використанням інтегрованого модуля MD Simulation for GROMACS [106] на порталі SiBioLead (<https://sibiolead.com/>). Система симуляції була параметризована із застосуванням силового поля OPLS/AA. Комплекс білок-ліганд поміщали у триклінну коробку, заповнену водою моделі SPC з додаванням NaCl як контрйонів. Для імітації фізіологічних умов до системи додавали 0,15 М розчин NaCl. Після цього систему урівноважували за допомогою методів NVT і NPT протягом 300 нс, а далі проводили MD-запуск тривалістю 100 нс із використанням інтегратора leap-frog. Кадри траєкторії симуляції зберігали кожні 20 нс протягом 100 нс, отримуючи загалом 5000 кадрів. Отримані траєкторії аналізували за допомогою вбудованих інструментів GROMACS та Microsoft Excel.

2.4 Поглиблене вивчення протисудомної активності похідного 2.14 на шести моделях судом.

Оскільки rel-N-(4-[хлорофеніл]-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл]пропанамід **2.14** володіє показниками протисудомної активності близькими показникам натрію вальпроату на пентилентетразоловій моделі судом, було проведене поглиблене дослідження даної молекули.

Експериментальний дизайн включав шість моделей судом - п'ять моделей передбачали хімічне індукування судом, в якості проконвульсантів виступали такі речовини як: пікротоксин, тіосемікарбазид, стрихнін, кофеїн та камфора. Одна модель передбачала індукування судом за допомогою електрошоку (максимальний електрошок, MES). Для кожної моделі тварин випадковим чином розподіляли на три групи: контрольна група (VC) - неліковані судоми; референтна група - тварини, яким вводили препарат порівняння, дослідна група - тварини, які отримували сполуку **2.14** у вигляді суспензії, стабілізованої Tween-80, внутрішньошлунково (i.g.) у дозі 100 мг/кг.

У дослідженні використано 120 білих самців мишей віком 2-2,5 місяці з масою тіла 15-20 г. Критерії за якими тварини включались у експеримент були: здоровий зовнішній вигляд гладка шерсть, інтактні шкіра та слизові оболонки, нормальна активність, маса тіла в межах норми, відсутність респіраторних і шлунково-кишкових порушень. Тварин, які не відповідали цим критеріям, виключали з експерименту. З метою уникнення статевозумовленої варіабельності використовували лише самців.

Кількість тварин у групі становила від 5 до 9 особин, що ґрунтувалося на даних попередніх досліджень [107] та оцінках величини ефекту ($D = 2,0-2,5$) за Festing & Altman [179]. Для моделей хімічно індукованих судом $n = 6-7$; для тесту MES - $n = 5$ (дослідна та референтна групи) і $n = 9$ для контрольної групи носія (включно з тваринами, використаними для валідації методу).

Дослідження протисудомної активності. Усі експерименти проводили в період з 9:00 до 15:00. У моделях хімічно індукованих судом після введення проконвульсанта кожну мишу розміщували в окремий прозорий пластиковий циліндричний контейнер об'ємом 5 дм³. Досліджувану речовину **2.14** вводили одноразово внутрішньошлунково (i.g.) у вигляді водної суспензії, стабілізованої Твіном-80, у дозі 100 мг/кг в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла за 30 хв до індукції судом [60]. У контрольних групах (VC) тваринам замість сполуки **2.14** вводили очищену воду (0,1 мл/10 г).

Хемоконвульсанти та MES (максимальні електрошокові судоми):

- **Пікротоксин** (CAS 124-87-8, Sigma-Aldrich™ USA) вводили підшкірно (s.c.) у ділянку холки в дозі 3 мг/кг у вигляді водного розчину [108, 109]
- **Тіосемікарбазид** (CAS 79-19-6, Sigma-Aldrich™, USA) вводили внутрішньоочеревинно (i.p.) у дозі 25 мг/кг у вигляді водного розчину [107, 110]
- **Стрихнін** (CAS 57-24-9, Sigma-Aldrich, USA) вводили підшкірно (s.c.) у дозі 1,2 мг/кг у вигляді водного розчину [111, 112]
- **Кофеїн** (бензоат натрію кофеїну, Darnitsa™, Україна, ін'єкційний розчин 100 мг/кг) вводили у дозі 650 мг/кг внутрішньоочеревинно (i.p.) [107] у вигляді ампульного розчину в об'ємі 0,065 мл/10 г.
- **Камфору** (CAS 76-22-2, Sigma-Aldrich™, USA) вводили внутрішньоочеревинно (i.p.) у дозі 1000 мг/кг у вигляді олійного розчину [113, 114] в об'ємі 0,1 мл/10 г.
- **Максимальний електрошок (MES):** застосовували струм силою 50 мА з частотою 50 Гц та тривалістю імпульсу 0,2 с [115]. Скреневі електроди зволожували 0,9% розчином NaCl.

Для кожної моделі судом підбирали відповідні референтні препарати. Вальпроат натрію (Depakine, Sanofi-Aventis, Франція, пероральний сироп 57,64 мг/мл) у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково (i.g.) для моделей, індукованих пікротоксином, тіосемікарбазидом, стрихніном та камфорою [107]. Інозин (Рибоксин, Arterium, Україна, ін'єкційний розчин 20 мг/мл) у дозі 1000 мг/кг внутрішньоочеревинно (i.p.) для кофеїн-індукованих судом [107]. Карбамазепін (Finlepsin, TEVA, Польща, таблетки 200 мг) у дозі 40 мг/кг внутрішньошлунково (i.g.) для тесту максимального електрошоку (MES). Таблетки подрібнювали та суспендували в Tween-80 перед введенням [75].

Кінцеві точки - спостереження перебігу судом та критерії оцінки їх тяжкості. У моделях хімічно індукованих судом після введення проконвульсанта кожну мишу розміщували в пластиковий контейнер. Тварин безперервно спостерігали протягом 60 хв у разі судом, індукованих пікротоксином,

стрихніном, кофеїном і камforoю; для моделі судом в якій роль проконвульсанта відігравав тіосемікарбазид, тривалість спостереження становила 180 хв [116]. Для оцінки впливу на перебіг судом використовували стандартні показники: латентний період до розвитку судом, середню кількість клоніко-тонічних судом на одну тварину, відсоток мишей з клонічними та тонічними судом, тяжкість судом у балах (1 бал - поодинокий ривок; 2 - «манежний» біг або «поза кенгуру»; 3 - клонічні судом; 4 - клоніко-тонічні судом з бічним положенням; 5 - тонічне розгинання задніх кінцівок; 6 балів - тонічне розгинання, що призводить до загибелі тварини), тривалість судомного періоду, тривалість життя до смерті та летальність [60]. У випадках, коли судом не виникали протягом перших 1-3 годин, латентний період умовно приймали за 60 хв для судом, індукованих пікротоксином, стрихніном, кофеїном і камforoю, та 180 хв - для судом, індукованих тіосемікарбазидом. У тесті MES протисудомну активність оцінювали за такими показниками: відсоток мишей із клонічними та тонічними судом, наявність тонічного розгинання, тяжкість судом (відповідно до вищенаведеної шкали), тривалість тонічного розгинання, тривалість періоду відновлення (постіктальне бокове положення), час до загибелі та відсоток летальності.

2.4.1. Пікротоксин-індуковані судом.

Результати дослідження впливу сполуки **2.14** на перебіг пікротоксин-індукованих судом з особливим акцентом на механізм дії, що пов'язаний з інгібуванням хлоридних каналів у складі ГАМК-барбітурат-бензодіазепінового комплексу [108, 109] наведені в таблиці 2.9.

Перебіг судомного синдрому у контрольній групі (VC) можна охарактеризувати як відносно легкий, що не супроводжувався летальними наслідками; максимальна оцінка важкості судом становила 4 бали. Під впливом сполуки **2.14** латентний період до появи першого посмикування ($35,04 \pm 8,91$ хв проти $16,34 \pm 1,19$ хв) та клонічних судом ($37,55 \pm 8,06$ хв проти $17,52 \pm 0,97$ хв) збільшувався у 2,14 раза порівняно з групою контролю VC. Середня кількість судом на одну тварину також зменшувалася у 3,51 раза ($0,57 \pm 0,20$ проти $2,00 \pm$

0,38; $p < 0,05$), відсоток мишей із клонічними та тонічними судомами - на 42,86% ($p < 0,01$), тяжкість судом - у 1,92 раза ($1,86 \pm 0,67$ бала проти $3,57 \pm 0,20$ бала; $p < 0,05$), а тривалість судомного періоду - у 3,62 раза ($4,43 \pm 2,51$ хв проти $16,02 \pm 4,82$ хв; $p < 0,05$) порівняно з контрольною групою VC.

Таблиця 2.9. Вплив сполуки **2.14** на судоми, індуковані пікротоксином, у мишей ($M \pm m$, $Me [Q25; Q75]$).

Група тварин		Контрольна група (пікротоксин)	Натрію Вальпроат	2.14
n		7	7	7
Доза, мг/кг		2.5	300+2.5	100+2.5
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	16.34 ± 1.19 16.17 [13.02;20.10]	28.70 ± 8.20 16.13 [15.67;60.00]	35.04 ± 8.91 19.95 [15.73;60.00]
	Клонічні судоми (3 бали)	17.52 ± 0.97 17.75 [16.17;20.10]	35.44 ± 8.81 24.10 [16.13;60.00]	37.55 ± 8.06 28.17 [19.46;60.00]
Середня кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу		2.00 ± 0.38 2 [1;3]	1.14 ± 0.46 1 [0;2]	0.57 ± 0.20 1* [0;1]
% мишей з судомами	Клонічні	100	57.14**	57.14**
	Тонічні	57.14	42.86	14.28*
Бали тяжкості судом		3.57 ± 0.20 4 [3;4]	2.29 ± 0.71 3 [0;4]	1.86 ± 0.67 3* [0;3]
Тривалість судомного періоду, хв		16.02 ± 4.82 20.92 [2.33;27.07]	11.59 ± 3.40 10.12 [8.53;18.90]	4.43 ± 2.51 4.16* [0.1;8.77]
Час до смерті, хв		-	-	-
Летальність, %		0	0	0

Референтний препарат натрію вальпроат подовжував латентний період до першого посмикування у 1,75 раза, до розвитку клонічних судом - у 2,02 раза та достовірно знижував (на 42,86%) відсоток мишей із проявами клонічних судом ($p < 0,01$). Сполука **2.14** у моделі пікротоксин-індукованих судом продемонструвала захисний ефект на рівні натрію вальпроату. Більше того, за здатністю зменшувати тяжкість судом і тривалість судомного періоду вона перевищувала ефективність класичного протисудомного засобу.

2.4.2. Судоми, індуковані тіосемікарбазидом.

Механізм індукції судом тіосемікарбазидом зумовлений пригніченням утворення ГАМК та накопиченням глутамату внаслідок інгібування глутаматдекарбоксилази [94, 95]. Результати дослідження в цій моделі наведено в таблиці 2.10.

Таблиця 2.10. Вплив сполуки 2.14 на перебіг судом, індукованих тіосемікарбазидом, у мишей ($M \pm m$, $Me [Q25; Q75]$)

Група тварин		Контрольна група (тіосемікарбазид)	Натрію Вальпроат	2.14
n		6	6	6
Доза, мг/кг		25	300+25	100+25
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	53.56±8.92 52.82 [31.93;66.25]	47.35±2.67 48.30 [42.50;51.62]	50.74±3.72 51.45 [40.78;57.00]
	Клонічні судоми (3 бали)	59.64±7.82 64.28 [42.73;67.48]	51.17±1.55 51.52 [49.33;53.88]	62.87±4.54 60.39 [#] [55.13;69.52]
Середня кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу		7.00±1.77 6 [4;12]	6.33±1.26 6.5 [3;9]	3.37±0.80 3.5 [3;4]
% мишей з судомами	Клонічні	100	100	100
	Тонічні	100	100	100
Бали тяжкості судом		5.83±0.17 6 [6;6]	6 6 [6;6]	5.67±0.21 6 [5;6]
Тривалість судомного періоду, хв		56.40±14.42 40.70 [36.00;96.00]	65.36±19.68 57.44 [21.07;117.92]	53.74±11.25 59.42 [28.72;64.00]
Час до смерті, хв		109.96±11.29 111.41 [85.90;127.18]	112.71±18.33 106.62 [70.10;155.42]	104.40±13.93 104.86 [80.97;120.50]
Летальність, %		100	100	100

У судом індукованих тіосемікарбазидом є свої відмінності. Однією відмінністю є повільний розвиток судомного синдрому (у групі VC середній час появи перших посмикувань становив 53,56±8,92 хв, клонічних судом - 59,64±7,82 хв, що відображає поступове пригнічення ГАМК-ергічного гальмування). Друга

відмінність - це надзвичайно тяжкий перебіг, у всіх мишей розвивалося тонічне розгинання з апное, що призводило до 100% летальності.

Введення як **2.14**, так і натрію вальпроату не забезпечувало вираженого протиепілептичного ефекту щодо судом, індукованих тіосемікарбазидом. Водночас досліджувана сполука **2.14** демонструвало помірні переваги порівняно з вальпроатом, зокрема статистично значуще збільшення латентного періоду до розвитку перших клонічних судом на 22,8% ($p < 0,05$), тенденцію до зменшення кількості судом ($3,37 \pm 0,80$ проти $6,33 \pm 1,26$) та подовження інтервалів між судомними нападами. Попри незначний протиепілептичний ефект тривалість судомного періоду не змінювалася, а у 100% тварин спостерігалися тонічне розгинання та летальний кінець. Статистично значущих відмінностей показників порівняно з контрольною групою групою VC на **2.14** не виявлено; відзначалася лише тенденція до зниження кількості судом ($3,37 \pm 0,80$ проти $7,00 \pm 1,77$).

2.4.3. Судоми, індуковані стрихніном.

Модель судом, індукованих стрихніном, ґрунтується на пригніченні гліцинергічних гальмівних процесів [111, 112, 117] Результати дослідження в цій моделі наведено в таблиці 2.11. Перебіг судом у моделі зі стрихніном характеризується максимальною швидкоплинністю та значною тяжкістю. У контрольній групі (VC) перші прояви судом спостерігались в середньому через $6,29 \pm 0,52$ хв, після чого майже одразу клонічні судоми переходили у типову летальну тонічну екстензію у всіх тварин. Тривалість судомного періоду становила приблизно 1 хв і завершувалася загибеллю 100% тварин. Як натрію вальпроат, так і, зокрема, сполука **2.14** мали тенденцію до подовження (у середньому в 1,3 раза) латентного періоду до появи перших проявів судом, при цьому більш виражений вплив спостерігався на тривалість першого судомного нападу, яка збільшувалася у 2,3 та 3,5 раза відповідно. Водночас вплив **2.14** та натрію вальпроату на подальший перебіг судом суттєво відрізнявся. Було встановлено, що сполука **2.14** статистично достовірно знижувала частоту клонічних і тонічних судом на 28,57% порівняно з контрольною групою VC

($p < 0,05$). Інтегральний захисний ефект характеризувався значним зменшенням летальності на 28,6% ($p < 0,05$ порівняно з контрольною групою VC), збільшенням тривалості судомного періоду та тенденцією до подовження тривалості життя тварин. Натрію вальпроат у свою чергу знижував частоту клонічних судом у мишей на 14,3%, а тонічних судом - на 71,4% ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою VC. Введення натрію вальпроату призводило до зниження важкості судом у 1,6 раза ($p < 0,05$), що сприяло суттєвому зниженню летальності (на 71,4% порівняно з контрольною групою VC, $p < 0,01$). Одночасно кількість судом зростала у 3,6 раза порівняно з контрольною групою VC ($p < 0,05$), а тривалість судомного періоду - у 20,1 раза ($p < 0,01$).

Таблиця 2.11. Вплив сполуки 2.14 на перебіг судом, індукованих стрихніном у мишей ($M \pm m$, $Me[Q25;Q75]$)

Група тварин		Контрольна група (стрихнін)	Натрію Вальпроат	2.14
n		n	7	7
Доза, мг/кг		Доза, мг/кг	300+1.2	100+1.2
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	6.29±0.52 6.25 [5.18;6.90]	8.11±0.82 8.00 [6.28;8.88]	8.29±1.46 6.5 [5.50;13.70]
	Клонічні судоми (3 бали)	6.57±0.40 6.25 [5.80;6.90]	15.28±7.47 9.13 [6.28;9.60]	22.08±9.80 7.58 [6.60;60.00]
Середня кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу		1.14±0.14 1 [1;1]	4.14±1.2 3* [3;8]	1.43±0.48 1 [0;3]
% мишей з судомами	% мишей з судомами	100	85.71	71.43*
	Тонічні	100	28.57**	71.43*#
Бали тяжкості судом		6 6 [6;6]	3.71±0.61 3* [3;6]	4.43±0.89 6 [1;6]
Тривалість судомного періоду, хв		0.50±0.19 0.1 [0.1;1.02]	10.07±2.41 9.22** [5.35;15.65]	1.15±0.36 0.92## [0.1;1.97]
Час до смерті, хв		6.74±0.45 6.25 [5.8;8.03]	11.23±2.77 11.23 [8.46;14.00]	8.13±0.8 8.11 [7.02;10.10]
Летальність, %		100	28.57**	71.43*#

Це явище можна пояснити тим, що в контрольній групі VC смерть швидко наставала після перших важких судом, тоді як значне зниження їх тяжкості за умов застосування натрію вальпроату, ймовірно, підвищувало судомний поріг і призводило до зменшення тяжкості наступних клонічних нападів після первинного судомного прояву. Наприкінці періоду спостереження виживаність у групі вальпроату становила 2 із 6 мишей (33%), а для 4 мишей (66%), які загинули внаслідок судом, час до настання смерті був у 1,7 раза довшим, ніж у контрольній групі VC, що свідчить про потенційно сприятливий ефект натрію вальпроату в моделі судом, індукованих стрихніном. У даному дослідженні сполука **2.14** виявляла помірний протисудомний ефект, статистично достовірно нижчу здатність запобігати розвитку тонічних судом поступаючись ефекту натрію вальпроату на 42,9% ($p < 0,05$).

2.4.4. Судоми, індуковані кофеїном

Виникнення судом, спричинених кофеїном, зумовлене антагонізмом щодо аденозинових рецепторів, що призводить до усунення інгібувального впливу аденозину [118]. Результати дослідження впливу сполуки **2.14** на перебіг кофеїн-індукованих судом наведено в таблиці 2.12.

Перебіг судомного процесу викликаного кофеїном характеризувався значною тяжкістю. У контрольній групі (VC) перші прояви судом з'являлися в середньому через $2,83 \pm 0,62$ хв після введення проконвульсанта, а клонічні судоми - приблизно через $3,27 \pm 0,48$ хв. У цій групі у всіх мишей спостерігалися як клонічні, так і тонічні судоми, однак у багатьох випадках тварини не гинули внаслідок тонічної екстензії. Летальність, пов'язана із судомами, становила 57,14%. Особливістю моделі була значна кількість судом на одну тварину (в середньому $8,28 \pm 2,33$) та велика варіабельність тривалості судомного періоду (в середньому $28,10 \pm 9,11$ хв) порівняно із судомами, індукованими іншими хемоконвульсантами.

Таблиця 2.12. Вплив сполуки **2.14** на перебіг судом, індукованих кофеїном у мишей ($M \pm m$, $Me[Q25;Q75]$)

Група тварин		Контрольна група (кофеїн)	Інозин	2.14
n		7	7	7
Доза, мг/кг		650	1000+650	100+650
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	2.83±0.62 2.58 [1.72;4.10]	8.86±1.99 6.90** [4.53;12.97]	7.97±2.35 6.28** [4.68;7.97]
	Клонічні судоми (3 бали)	3.27±0.48 2.78 [2.33;4.10]	10.97±2.19 8.17** [6.63;17.22]	29.39±8.00 22.07** [11.52;46.78]
Середня кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу		8.28±2.33 6 [4;11]	8.57±1.73 9 [4;12]	4.28±1.46 4 [1;8]
% мишей з судомами	Клонічні	100	100	85.71
	Тонічні	100	57.14**	14.28***#
Бали тяжкості судом		4.86±0.34 5 [4;6]	3.86±0.34 4 [3;5]	3.00±0.22 3** [3;3]
Тривалість судомного періоду, хв		28.10±9.11 16.17 [3.52;53.83]	23.30±5.40 14.13 [10.67;38.47]	31.71±5.86 33.65 [25.23;45.35]
Час до смерті, хв		11.68±3.57 11.95 [5.51;17.84]	20.29±6.03 14.50 [14.02;32.35]	33.32
Летальність, %		57.14	42.86	14.28*

Вплив сполуки **2.14** на перебіг судом у кофеїновій моделі проявився здатністю подовжувати латентний період настання перших судом у 2,8 раза ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою VC, а також дев'ятикратним збільшенням латентного періоду розвитку клонічних судом ($p < 0,01$). Кількість мишей з клонічними судомами зменшувалася на 14,3%, а з тонічними судомами - на 85,7% ($p < 0,01$). Частота судом на одну тварину знижувалася майже вдвічі; водночас ці події виникали значно рідше, ніж у контрольній групі VC та групі препарату порівняння інозину. При цьому тривалість судомного періоду достовірно не відрізнялася від відповідних показників у зазначених групах. Зменшення тяжкості судом з $4,86 \pm 0,34$ бала у контрольній групі VC до $3,00 \pm 0,22$

під впливом **2.14** ($p < 0,01$) сприяло статистично значущому зниженню летальності на 42,9% ($p < 0,05$), що підтверджує виражений захисний ефект досліджуваної сполуки в моделі кофеїн-індукованих судом.

Референтний препарат інозин виявляв помірну протисудомну активність. Він статистично значущо ($p < 0,01$) подовжував латентний період виникнення перших посмикувань у 3,13 раза та клонічних судом - у 3,35 раза порівняно з контрольною групою VC. Застосування інозину також супроводжувалось зменшенням кількості мишей з тонічними судомами на 42,9% ($p < 0,01$) та збільшенням часу до загибелі у 1,7 раза. Крім того, тяжкість судом зменшувалася на 1 бал, а летальність - на 14,3%. Таким чином, сполука **2.14** виявилась ефективнішою у моделі судом, індукованих кофеїном, порівняно зі специфічним препаратом порівняння інозином, який є агоністом аденозинових рецепторів.

2.4.5. Судоми, індуковані камфорою.

Точний механізм виникнення судом унаслідок введення камфори наразі до кінця не з'ясований. За даними парієтальної електрокортикограми у щурів, камфорна олія індукує судомну активність, що проявляється поодинокими та множинними високоамплітудними судомними посмикуваннями. Ці посмикування можуть бути пов'язані з підвищенням секреції моноамінів [113]. Результати дослідження впливу сполуки **2.14** на перебіг судом, спричинених камфорою, наведені в таблиці 2.13.

Перебіг судом викликаних за допомогою камфори був важким. Після відносно короткого латентного періоду - $3,55 \pm 0,57$ хв для поодиноких судом та $5,12 \pm 0,20$ хв для генералізованих судом - у всіх мишей контрольної групи VC розвивалися тяжкі судоми, що включали як клонічні, так і тонічні (у тому числі тонічну екстензію) напади з рецидивами кожні 2-3 хв. Рівень летальності становив 83,3% ($n = 5/6$), середній час до загибелі - $14,94 \pm 1,15$ хв. Застосування сполуки **2.14** у моделі камфорно-індукованих судом призводило до 1,6-разового збільшення середнього латентного періоду появи перших судом порівняно з контрольною групою VC ($p < 0,05$), тоді як на інші показники сполука **2.14** не

спричинила суттєвого впливу. Мінімальний позитивний ефект досліджуваної сполуки (зменшення кількості тварин з тонічними судомами на 14,3% та 1,7-разове подовження часу до загибелі порівняно з контрольною групою VC) має лише тенденційний характер і не супроводжується зниженням летальності, яка є ключовим показником захисної ефективності. Виявлена тенденція до збільшення тривалості життя дослідних тварин була пов'язана з відповідним зростанням частоти судомних нападів.

Таблиця 2.13. Вплив сполуки **2.14** на перебіг судом, індукованих камфорою у мишей ($M \pm m$, $Me[Q25;Q75]$)

Група тварин		Контрольна група (камфора)	Натрію Вальпроат	2.14
n		6	7	7
Доза, мг/кг		1000	300+1000	100+1000
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	3.55±0.57 4.06 [2.28;4.70]	5.73±1.05 4.67 [4.00;6.33]	5.57±0.64 5.33* [4.65;6.87]
	Клонічні судоми (3 бали)	5.12±0.20 5.12 [4.75;5.62]	6.68±1.06 6.33 [4.02;9.08]	5.74±0.67 5.33 [4.65;7.00]
Середня кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу		5.33±1.17 4.5 [4;5]	7.43±1.52 6 [4;11]	6.86±1.72 6 [3;10]
% мишей з судомами	Клонічні	100	100	100
	Тонічні	100	57.14**	85.71
Бали тяжкості судом		5.17±0.31 5 [5;6]	3.57±0.20 4** [3;4]	5.14±0.46 6# [4;6]
Тривалість судомного періоду, хв		17.06±5.72 11.82 [9.30;15.05]	48.45±1.09 48.98** [45.58;51.5]	23.15±5.75 24.33## [9.13;37.25]
Час до смерті, хв		14.94±1.15 14.57 [14.00;16.45]	-	20.79±4.88 14.46## [14.00;30.87]
Летальність, %		83.33	0**	85.71##

У порівнянні з похідним **2.14**, референтний препарат натрію вальпроат проявляв виражену протисудомну активність у моделі камфорно-індукованих судом. Насамперед це стосувалося запобігання найбільш небезпечній тонічній

екстензії (статистично значуще зменшення кількості тварин з тонічними судомами на 42,9%, $p < 0,01$, а також зниження тяжкості судом на 1,6 бала, $p < 0,01$ порівняно з контрольною групою VC). Судомний період у цій моделі був у 2,8 раза довшим, ніж у контрольній групі VC ($p < 0,01$), що пояснює 1,4-разове збільшення кількості нападів на одну тварину та поступове зниження тяжкості судом. Отримані результати свідчили про повний захисний ефект - відсутність летальності ($p < 0,01$ порівняно з контрольною групою VC). Отже, у моделі камфорно-індукованих судом сполука **2.14** була істотно менш ефективною, ніж натрію вальпроат, який використовувався як референтний препарат.

2.4.6. Модель електроіндукованих судом (MES).

Електрично індуковані судоми (тест MES) є однією з обов'язкових і базових моделей для дослідження протисудомних засобів. Патогенез судом у моделі MES ґрунтується передусім на поширенні патологічної нейрональної активності з залученням натрієвих і кальцієвих каналів [119, 120] Результати дослідження впливу **2.14** на перебіг судом у тесті MES наведено в таблиці 2.14.

Перебіг електроіндукованих судом у контрольній групі VC характеризувався помірною тяжкістю: у 100% тварин одразу після електрошоку спостерігалися тоніко-клонічні судоми. У вибірці з дев'яти мишей тонічна екстензія виникала у 88,89% тварин ($n = 8/9$), із середньою тривалістю $0,32 \pm 0,10$ хв. Летальність відзначено у 11,11% випадків ($n = 1/9$). Після завершення нападу миші перебували в латеральному положенні в середньому протягом $0,57 \pm 0,20$ хв.

Сполука **2.14** забезпечувала захист від судом у 4 з 5 тварин (80%). Тонічні та клонічні судоми спостерігалися в 1 миші (20%), що на 80% менше порівняно з контрольною групою VC ($p < 0,01$). Тяжкість судом була статистично нижчою у 1,8 раза порівняно з VC-групою ($p < 0,01$). Короткочасна (0,33 хв) постіктальна депресія відзначалася лише в 1 миші; летальних випадків не зафіксовано. Виражений протисудомний ефект також спостерігався при застосуванні препарату порівняння карбамазепіну. Клонічні судоми виникали у 40% мишей (зниження на 60% порівняно з VC-групою, $p < 0,01$), тоді як тонічні судоми

реєструвалися у 20% випадків (зниження на 80% порівняно з VC-групою, $p < 0,01$). Випадків тонічної екстензії та постіктальної депресії не відзначалося. Отже, у тесті MES сполука **2.14** продемонструвала протисудомну ефективність на рівні з карбамазепіном.

Таблиця 2.14. Вплив сполуки **2.14** на перебіг судом, індукованих максимальним електрошоком у мишей ($M \pm m$, $Me[Q25;Q75]$)

Група тварин		Контрольна група (MES)	Карбамазепін	2.14
n		9	5	5
Доза, мг/кг		-	40	100
Латентний період, (хв)	Перші посмикування (1 бал)	100	40**	20**
	Клонічні судоми (3 бали)	100	20**	20**
Кількість тварин із тонічним розтягуванням, %		88.89	0**	20**
Бали тяжкості судом		5.11±0.11 5 [5;5]	1.8±0.8 2** [0;3]	2.8±0.58 2** [2;3]
Тривалість тонічного розтягування, хв		0.32±0.10 0.33 [0.08;0.45]	0 0** [0;0]	0.02 0** [0;0]
Тривалість періоду відновлення (постікальний бічний стан), хв		0.57±0.20 0.45 [0.17;0.67]	0 0* [0;0]	0.33
Час до смерті, хв		0.33	-	-
Летальність, %		11.11	0	0

У результаті дослідження встановлено, що сполука **2.14** володіє досить широким спектром протисудомної дії. Із 7 гострих моделей судомного синдрому сполука продемонструвала значну протисудомну дію на 5 моделях судом, а саме: у моделях хімічно індукованих судом - пентилентетразолових, пікротоксинових, стрихнінових, кофєїнових, а також в електрично індукованій моделі максимального електрошоку (MES). Водночас сполука виявилася неефективною

у двох моделях хімічно індукованих судом, спричинених тіосемікарбазидом і камфорою.

2.5. Молекулярний докінг.

Для підтвердження *in silico* біологічного потенціалу сполуки **2.14** було проведено молекулярне докінгове дослідження із використанням кристалічної структури людського гліцинового рецептора $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$; PDB ID: 5CFB) [121], отриманої у комплексі з відомим антагоністом - стрихніном. З метою комплексної оцінки взаємодії з аденозиновими рецепторами було обрано чотири кристалічні структури, зокрема людський аденозиновий A₁-рецептор (A₁R) у комплексі з селективним інгібітором (PDB ID: 5N2S) [122] та з позитивним алостеричним модулятором MIPS521 (PDB ID: 7LD3) [123], а також людський аденозиновий A_{2A}-рецептор, зв'язаний із селективним антагоністом (PDB ID: 3EML) [124]. Потенційну протизапальну активність сполуки оцінювали *in silico* методом молекулярного докінгу до COX-1 (PDB ID: 4O1Z) [125], COX-2 (PDB ID: 3LN1) [126], 5-LOX (PDB ID: 3V99) [127] та FLAP (PDB ID: 6VGI) [128]. Мінімізацію енергії та генерацію тривимірних структур проводили за допомогою програмного забезпечення Avogadro із застосуванням силового поля молекулярної механіки MMFF94s [129] та 20 000 кроків оптимізації [130].

Докінг-симуляції виконували з використанням останньої доступної версії AutoDock Vina (v. 1.2.7) [131]. Амінокислотні залишки у сайтах зв'язування вибраних ферментів розглядали як гнучкі з використанням відповідних модулів AutoDock Tools. Підготовлені структури з визначеними торсійними ступенями вільності зберігали в окремих файлах формату pdbqt [132]

Протокол підготовки до докінгу включав видалення молекул води, кофакторів та іонів із кристалічних структур, додавання полярних атомів Гідрогену, а також призначення та розподіл зарядів Гастейгера по всіх амінокислотних залишках. Валідацію обраних параметрів докінгу здійснювали шляхом повторного докінгу нативних лігандів у відповідні білкові структури з подальшою оцінкою точності отриманих комплексів. У зв'язку з відсутністю

кристалічної структури 5-LOX з ко-кристалізованим інгібітором як референтний ліганд використовували лікофелон [133]. Моделі зі значенням середньоквадратичного відхилення (RMSD) менше ніж 2 Å (рис. 2.16) вважали придатними для подальшого моделювання [134].

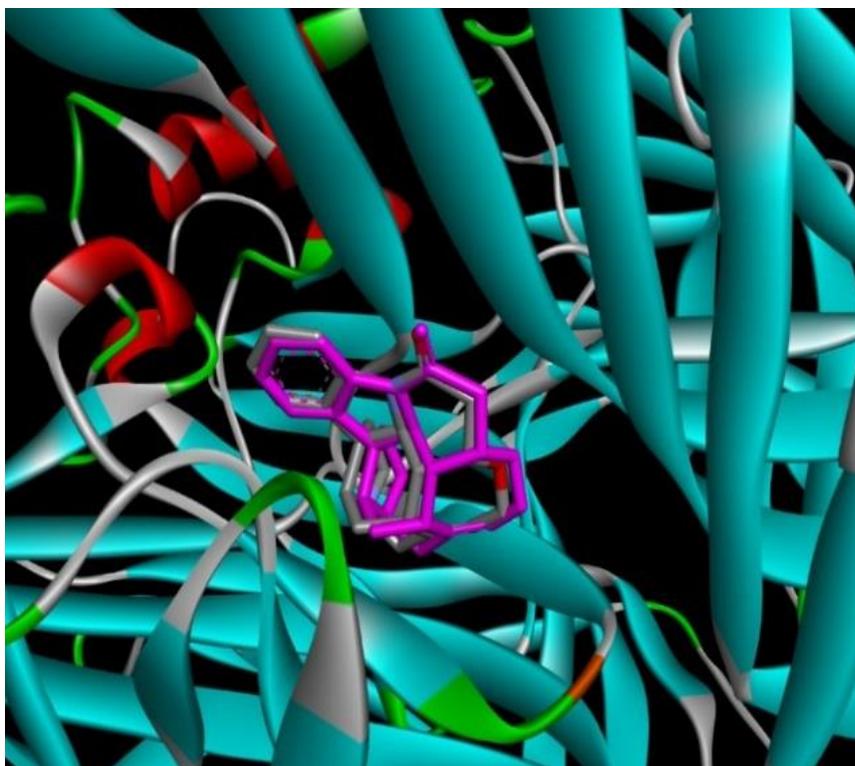


Рисунок 2.16 Реальне розміщення (сірий колір) та передбачене положення стрихніну (рожевий колір) (PDB SY9) у сайті зв'язування GlyR α 3 (PDB ID: 5CFB); RMSD = 0,956.

Отримані значення енергії зв'язування для нативних лігандів використовували як референтні точки для кількісної оцінки потенціалу досліджуваної сполуки порівняно як з нативними, так і з експериментально підтвердженими лігандами вибраних ферментів і рецепторів.

Зв'язування стрихніну з рецептором GlyR α 3 індукує значні конформаційні перебудови в ортестеричному сайті, що характеризуються розширенням зв'язувального сайту та відкритою конформацією петлі С. Така структурна адаптація контрастує зі станом, індукованим агоністом, за якого петля С згортається над лігандом, ефективно «закриваючи» сайт і стабілізуючи активну конформацію рецептора. Зв'язування стрихніну також спричиняє структурні зсуви у напрямку інтерфейсу між позаклітинним та трансмембранним доменами,

де внутрішній рух петлі M2-M3 зумовлює нахил спіралей M2 у бік осі сайту, що призводить до закриття каналу та стабілізації рецептора в непровідному стані.

Подібні принципи ліганд-індукованих конформаційних змін спостерігаються й для аденозинових рецепторів A1 та A2A, які, попри структурну гомологію, демонструють ключові відмінності в архітектурі петель і топології зв'язувальних сайтів. Структурні дослідження показали, що один і той самий ліганд, зокрема кофеїн, може займати кілька орієнтацій у рецепторі A2A, а селективні антагоністи, такі як PSB36, взаємодіють з кожним підтипом по-різному. Ці результати підкреслюють важливість гнучкості рецептора для розпізнавання лігандів і забезпечення селективності. Жорсткі (rigid) підходи до докінгу можуть не враховувати такі варіації, тоді як гнучкий (flexible) докінг дозволяє адаптацію бічних ланцюгів амінокислот і петель, підвищуючи точність прогнозування зв'язування. Це є особливо критичним для моделювання взаємодій із ксантиновими сполуками, зв'язування яких є високочутливим до тонких структурних відмінностей, зокрема до природи залишку 7.35 (T270 у A1R проти M270 у A2AR). З огляду на задокументовану структурну пластичність цих рецепторів, гнучкий докінг постає як раціональний і необхідний підхід для коректного моделювання зв'язування таких лігандів, як **2.14**, особливо в динамічних або алостеричних ділянках, де конформаційна адаптивність визначає функцію.

Слід зазначити, що протисудомний профіль досліджуваної сполуки значною мірою перетинається з раніше отриманими результатами для іншого похідного 4-тіазолідинону - **Les-6222**, яке проявляло протизапальні властивості [114]. Зважаючи на те, що низка похідних 4-тіазолідинону демонструє протизапальну активність - а така дія може робити внесок у протисудомний профіль цих сполук, - для поточного дослідження було обрано раніше вивчений набір потенційних протизапальних мішеней [135-139]. Дослідження молекулярного докінгу підтвердили афінність досліджуваної сполуки до рецепторів GlyR α 3, A1R та A2AR (табл. 2.15).

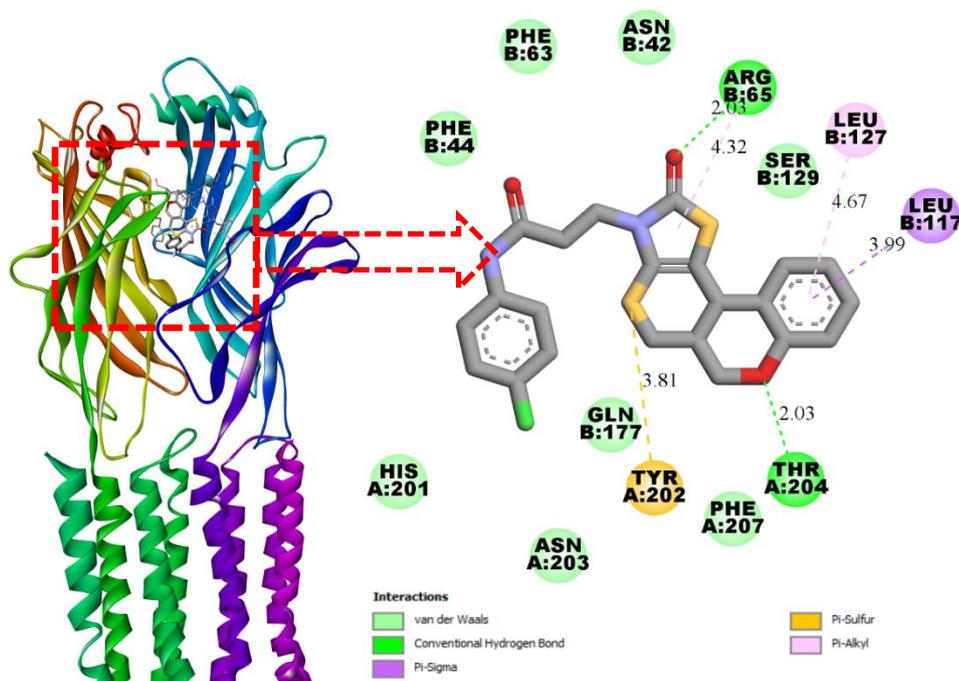


Рисунок 2.17 3D- та 2D-схеми комплексу **2.14** - GlyR α 3 (PDB 5CFB).

Спостережувана спорідненість до рецептора GlyR α 3 є порівнянною з такою для референтного ліганду стрихніну. У межах сайту зв'язування стрихніну рецептора GlyR α 3 залишок **2.14** утворює короткі водневі зв'язки з Arg65 (2,03 Å) та Thr204 (2,03 Å), стабілізуючи положення ліганду на межі між суміжними субодинацями, що відповідає ортостеричному сайту зв'язування нейромедіаторних агоністів. Thr204 є одним із ключових амінокислотних залишків, що формують «клапан» сайту зв'язування разом із Tyr202 та Phe207 з петлі С. Ліпофільні взаємодії представлені різними типами нековалентних гідрофобних контактів за участю залишків Leu127, Leu117 та Tyr202 (рис. 2.17).

В результаті проведення дослідження молекулярного докінгу встановлено, що сполука **2.14** володіє високою спорідненістю до рецепторів A1R та A2AR, причому енергії зв'язування були нижчими, ніж у референтних лігандів. Крім того, на підставі значень енергії взаємодії можна зробити висновок, що зв'язування **2.14** є неселективним щодо цих підтипів рецепторів. Усередині ортостеричного сайту A1R сполука **2.14** утворює три водневі зв'язки з залишками Asn1175, Phe1276 та Tyr1117. Основні ліпофільні взаємодії зосереджені на 4-хлорофенільному заміснику та відповідають взаємодіям із Val1192, Ile1379, Ile1174 і Ala1171 (рис. 2.18).

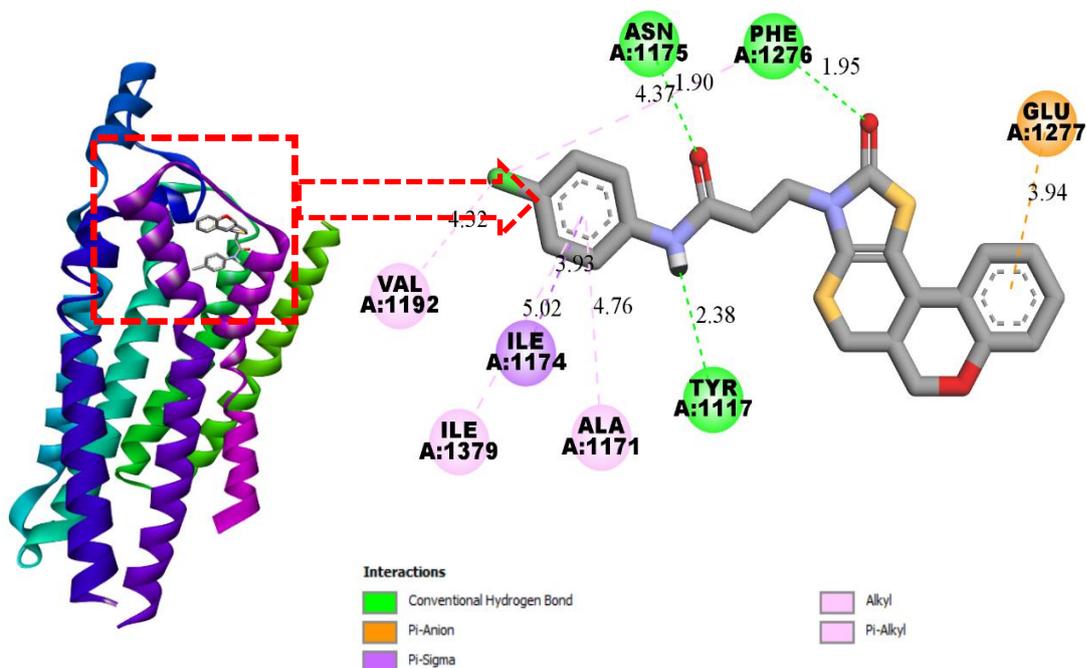


Рисунок 2.18 3D- та 2D-схеми комплексу **2.14** - A1R (PDB 5N2S).

Сполука **2.14** також виявляє високу афінність до рецептора A2AR. Вона утворює два слабкі водневі зв'язки з Phe168 та His278, що зумовлено відносно великими відстанями взаємодії - 5,07 Å та 5,54 Å відповідно (рис. 2.19). Стабілізація положення ліганда в межах сайту зв'язування забезпечується переважно ван-дер-ваальсовими силами, різними типами нековалентних ліпофільних взаємодій (зокрема π -аніонними, алкільними, π -алкільними, π -сірковими тощо), а також слабкими вуглецево-водневими зв'язками. Незважаючи на відсутність сильних водневих зв'язків, сумарна енергія зв'язування та сприятлива геометрична конформація ліганда забезпечують високий докінговий бал. Це свідчить про потенційно вищу афінність до цільового рецептора порівняно з референтним лігандом.

Таблиця 2.15 Афінності зв'язування (ккал/моль) сполуки **2.14** з вибраними рецепторами, спрогнозовані за допомогою AutoDock Vina.

Сполука	GlyRsa3 (5CFB)	A1R (5N2S)	A2AR (3EML)	A1R(alost.) (7LD3)
2.14	-10.461	-9.213	-9.875	-5.758
Стрихнін (PDB SY9)	-11.357	-	-	-
MIPS521 (PDB XTD)	-	-	-	-6.816
PSB36 (PDB 8K8)	-	-8.161	-	-
ZM241385 (PDB ZMA)	-	-	-8.819	-

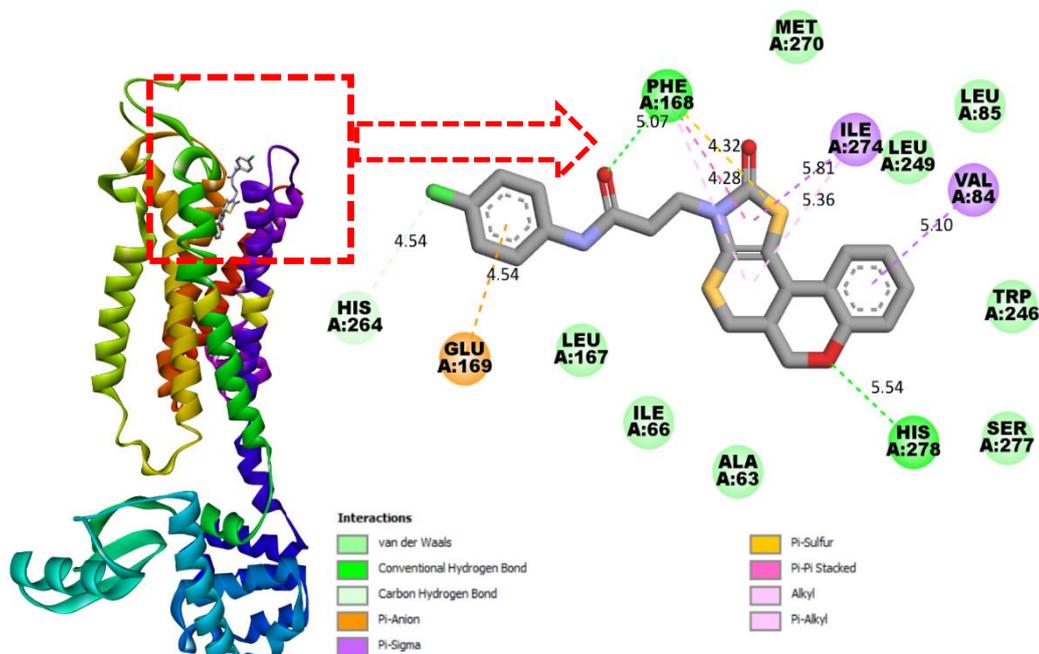


Рисунок 2.19. 3D- та 2D-схеми комплексу **2.14** - A2aR (PDB ELM).

Крім того, отримані дані чітко свідчать, що сполука **2.14** проявляє слабку взаємодію з алостеричним сайтом рецептора A1R, на який спрямований референтний ліганд MIPS521. Отже, можна зробити висновок, що інгібуючий ефект **2.14** опосередковується переважно його взаємодією з ортостеричним сайтом зв'язування рецепторів. Результати щодо потенційної протизапальної активності сполуки викликали особливий інтерес. Згідно з отриманими даними молекулярного докінгу, сполука не виявила значної афінності до циклооксигеназ (COX-1 та COX-2). Водночас **2.14** продемонструвала високі докінгові бали щодо 5-ліпоксигенази (5-LOX) та білка FLAP, які перевищували відповідні показники референтних лігандів. Можлива протизапальна активність може синергічно підсилювати загальний протисудомний профіль **2.14** завдяки її дії на рецептори GlyR α 3, A1R та A2AR (табл. 2.16).

Таблиця 2.16. Афінності зв'язування (ккал/моль) сполуки **2.14** з основними протизапальними ферментами, спрогнозовані за допомогою AutoDock Vina.

Сполука	COX1 (4O1Z)	COX-2 (3LN1)	5-LOX (3V99)	FLAP (6VGI)
2.14	-6.136	-7.304	-9.954	-9.258
Мелоксикам	-10.18		-	-
Целекоксиб	-	-12.44		
Лікофелон	-	-	-7.857	-
МК-866				-7.883

Рисунок 2.20 узагальнює порівняльну ефективність сполуки **2.14** за інтегральним показником (летальність) у різних моделях судом, що призводили до загибелі тварин. Як видно з рис. 2.20, досліджувана сполука достовірно знижувала летальність у моделях судом, індукованих стрихніном, і особливо - кофеїном. З урахуванням нейрохімічних механізмів цих моделей це свідчить про участь гліцинергічних та аденозінергічних ланок у механізмі протисудомної дії.

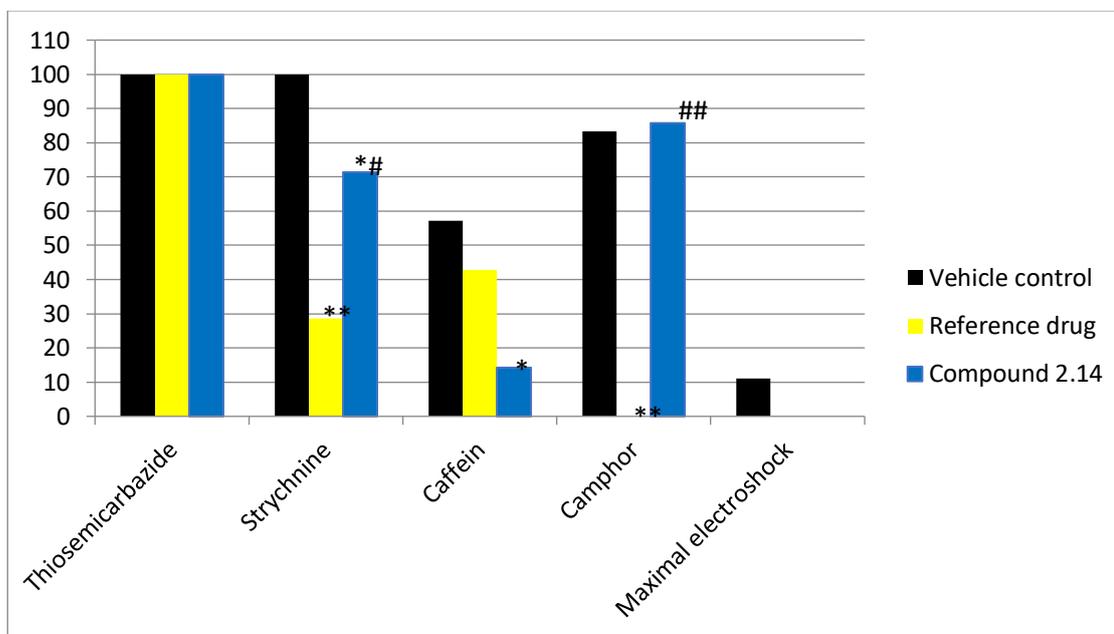


Рисунок 2.20. Вплив сполуки **2.14** (100 мг/кг, внутрішньошлунково) на летальність мишей при судамах, індукованих хімічними конвульсантами та максимальним електрошоком, у порівнянні з референтним препаратом. Статистично значущі відмінності порівняно з групою контролю (носій) (кутове перетворення Фішера): * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; порівняно з відповідною групою референтного препарату: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$.

Ефект сполуки **2.14** відсутній у моделях судом, індукованих тіосемікарбазидом і камфорою, що може бути зумовлено відсутністю впливу відповідно на церебральну глутаматдекарбоксілазу та метаболізм моноамінів. Судоми, індуковані пікротоксином, мали менш тяжкий перебіг і не призводили до загибелі мишей, тому ця модель не представлена на рис. 2.20. Водночас, як зазначено вище (табл. 2.9), у цій моделі сполука **2.14** зменшувала кількість, тяжкість і тривалість судом, що свідчить про залучення ГАМК-ергічних механізмів у реалізацію протисудомного ефекту.

Слід відзначити, що спектр протисудомної активності **2.14** є подібним до спектру протисудомної активності похідного 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-

(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону-тіазолідину **Les-6222**. Сполука 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон **Les-6222** проявляла виражений протекторний ефект у всіх п'яти моделях судом, у яких була ефективною **2.14**. Водночас вона не виявляла протисудомної активності в моделях, індукованих тіосемікарбазидом і камфорою [75]. Це свідчить про можливу подібність механізмів дії обох сполук. Крім того, 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон **Les-6222** ефективно пригнічував нейрозапалення [136], і, з огляду на подібність спектра протисудомної дії, можна припустити, що протизапальні властивості також можуть бути притаманні **2.14**.

2.6 *In vitro* дослідження цитотоксичності сполук **2.14**, **2.18b**, і **2.21**.

Похідні **2.14**, **2.18b**, і **2.21** були досліджені *in vitro* щодо їх цитотоксичного потенціалу відносно людських лімфоцитів, ізольованих із периферичної крові здорових дорослих донорів, а також клітин нирок людини ембріонального походження лінії HEK293 (Рисунок 2.21).

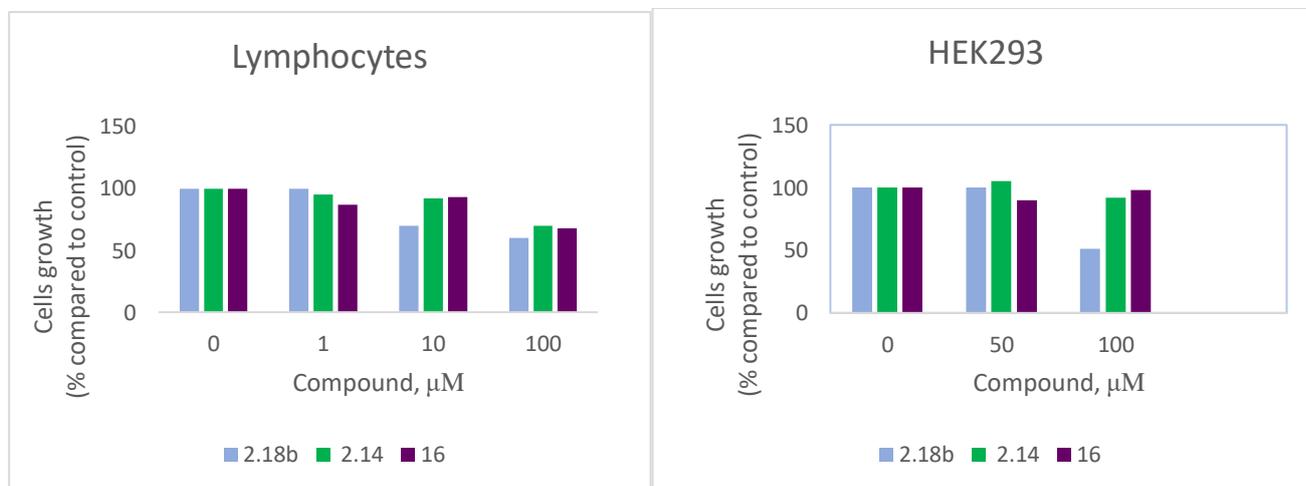


Рисунок 2.21 Дозозалежна відповідь людських лімфоцитів, ізольованих із периферичної крові здорових дорослих донорів, та клітин нирок людини ембріонального походження лінії HEK293 на дію досліджуваних сполук, виміряна за допомогою тесту 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (MTT-тест) після 72 годин експозиції. Дані подано як середнє значення \pm стандартне відхилення (SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем (неліковані клітини).

У ході експериментальних досліджень встановлено, що похідні **2.14**, **2.18b**, і **2.21** виявляють низьку цитотоксичну дію щодо людських лімфоцитів, ізольованих із периферичної крові здорових донорів, і клітин лінії НЕК293 (Рисунок 2.21). Жодна зі сполук не досягла рівня IC_{50} при концентрації 100 мкМ для ізольованих людських лімфоцитів. При концентрації 100 мкМ сполука **2.14** знижувала життєздатність лімфоцитів на 20,86%, похідне 2.21 - на 22,04%, а сполука 2.18b - на 29,94%.

Молекули **2.14**, **2.18b**, і **2.21** також не досягли рівня IC_{50} при концентрації 100 мкМ. Сполука **2.14** при цій концентрації інгібувала життєздатність клітин НЕК293 лише на 8,06%, а сполука **2.21** - на 0,97%, тоді як похідне **2.18b** пригнічувало ріст клітин НЕК293 із $IC_{50} = 100$ мкМ (Рисунок 2.21). Отримані результати свідчать, що похідні **2.14**, **2.18b**, і **2.21** можна розглядати як безпечні перспективні агенти для подальших поглиблених досліджень.

2.8 Опис експериментів.

2.8.1. Хімічні дослідження.

Хімічні назви синтезованих сполук наведені відповідно до номенклатури IUPAC (1979 рік) та рекомендацій IUPAC (2014 рік). Температури плавлення були виміряні відкритим капілярним методом на приладі Buchi B-545 і представлені в некорегованій формі. Елементний аналіз (С,Н,Н) був виконаний з використанням Perkin-Elmer 2400 CHN аналізатора і знаходилися в межах $\pm 0,4\%$ від теоретичних значень. Спектри 1H ЯМР реєстрували на приладі Varian Gemini 400 МГц в $DMCO-d_6$ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. Хімічні зміщення наведені в мільйонних частках з використанням δ шкали.

Синтез 3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]міазол-2-онів **2.3 a-j**. Ізороданін (4-тіоксо-2-оксотіазолідинон) (10 ммоль) вводили в реакцію з відповідним похідним алілсаліцилового альдегіду (10 ммоль) та додавали EDDA в каталітичних кількостях. В якості реакційного середовища використовували ацетонітрил (20 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв і в подальшому кипятили протягом 15 хв.

Утворені продукти 2.3 *a-j* фільтрували і перекристалізували із оцтової кислоти або суміші розчинників ДМФА - етанол (1:2).

Синтез 2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону 2.6. Суміш ізороданіну (4-тіоксо-2-оксотіазолідинон) (15 ммоль), 2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегіду (15 ммоль) та натрію ацетату(15 ммоль) нагрівали під зворотнім холодильником в середовищі оцтової кислоти протягом 30хв Після завершення синтезу реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури. Утворений продукт відфільтровували і перекристалізували із суміші розчинників ДМФА - етанол (1:2).

Синтез 3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу 2.8. До 3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону 2.3a (10 ммоль) додають суміш піридину (50 мл), води (10 мл) та акрилонітрилу (3 мл). Реакційну суміш нагрівають під зворотнім холодильником і синтезують протягом 6 годин, після синтезу охолоджують та осаджують водою. Осад, що утворився відфільтровують висушують та перекристалізовують з етанолу.

Синтез N-(4-хлорофеніл)-3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанаміду 2.14.

A. Розчин 3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу 2.8 (10 ммоль) у 30 мл оцтової кислоти та 15 мл соляної кислоти кип'ятять під зворотнім холодильником протягом 3 годин. Після синтезу реакційну суміш охолоджують та осаджують водою. Через 24 години одержаний осад 3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу хлориду відфільтровують, обробляють толуолом та перекристалізовують з етанолу.

До розчину 3-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанової кислоти (10 ммоль) у 20 мл безводного діоксану додають тіонілхлорид (57 ммоль) та кип'ятять під зворотнім холодильником протягом 30 хв. Після синтезу реакційну суміш охолоджують і розводять гексаном.

Отриманий хлорангідрид використовують для подальших хімічних перетворень без додаткової очистки.

До розчину 3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропаноїл хлориду додають суміш п-хлороаніліну (10 ммоль) і триетиламіну в 10 мл діоксану. Одержану реакційну суміш нагрівають 10 хв при 100°C і розводять водою. Утворений осад відфільтровують та перекристалізують з оцтової кислоти.

Б. До розчину гідроксиду калію (5 ммоль) в етанолі (10 мл) додавали 3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он (5 ммоль) і перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Після цього однією порцією вносили 3-хлор-N-(4-хлорофеніл)пропанамід **2.12** (5.5 ммоль). Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2,5 години. Після завершення реакції та охолодження продукт відфільтровували, висушували та перекристалізували з ацетонітрилу.

Синтез 6-гідрокси-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.17**. Суміш 5-(2-Гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону **2.15** (3.7 ммоль), акрилового альдегіду **2.16** (4 ммоль) та оцтової кислоти 15 мл та кип'ятимо 6 годин. Після синтезу реакційну суміш охолоджуємо, утворений осад відфільтровуємо та перекристалізуємо в етанолі.

Синтез 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)ацетамідів **2.18 a-f**. Реакцію проводили аналогічно до синтезу 3-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5] тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)пропанонітрилу **2.8**, (метод Б) використовуючи відповідні хлорацетаміди (12 ммоль) та тіопірано[2-3d]тіазоли **2.3a, f** (10 ммоль).

Синтез 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-5а(6H)-іл)оцтової кислоти **2.21**. Реакцію проводили аналогічно до синтезу 6-гідрокси-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5] тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **2.17** використовуючи 5-(2-гідрокси-5-нітробензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-он **2.19** (10 ммоль) та ітаконову кислоту (10 ммоль).

2.8.2. Вивчення цитотоксичності синтезованих сполук (МТТ тест)

Вплив досліджуваних сполук на життєздатність лімфоцитів людини, ізольованих із периферичної крові здорових дорослих, та клітин НЕК293 вивчали за допомогою тесту МТТ (Sigma).

Перед обробкою досліджуваними речовинами ізольовані лімфоцити активували фітогемаглютиніном-L (1 мкг/мл; Sigma-Aldrich) протягом 24 год і висівали у 96-лункові планшети у 100 мкл суспензії за концентрації 100 000 клітин/лунку. Клітини НЕК293 висівали на ніч у 96-лункові планшети (100 мкл, 5000 клітин/лунку).

До культур додавали по 100 мкл розчинів досліджуваних сполук у концентраційному діапазоні 0-100 мкМ, після чого клітини інкубували протягом 72 год. Потім додавали реагент МТТ (5 мг/мл). Продукти реакції визначали за допомогою спектрофотометра BioTek ELx800 (BioTek Instruments Inc.) [140]. Для статистичного аналізу використовували програму STATISTICA 12.0 для Windows.

Дані подано як середнє \pm стандартна помилка середнього (mean \pm SEM), а також як медіану з нижнім і верхнім квантилями (Me [Q25; Q75]). Рівень статистичної значущості приймали за $p < 0,05$.

Статистичні відмінності між групами аналізували:

- при нормальному розподілі - за параметричним t-критерієм Стьюдента,
- при його відсутності - за непараметричним критерієм Манна-Вітні (U-тест).

Для результатів в альтернативній формі (летальність, відсоток мишей із клонічними або тонічними судомами) застосовували кутове перетворення Фішера (з поправкою Йейтса). [140]

Комітет з біоетики Інституту біології клітини НАН України дозволив проведення дослідження з використанням людських лімфоцитів, ізольованих із периферичної крові здорових дорослих донорів (протокол № 2023-1 від 1 липня 2023 р.) після отримання письмової інформованої згоди донора. Лімфоцити людини відділяли із периферичної крові, що містила антикоагулянт - розчин

гепарину натрію 10 ОД/мл (B. Braun Medical, S.A.), за допомогою градієнта густини Gradisol G (Polfa) [141]

Клітини ембріони нирки людини лінії НЕК293 були отримані як подарунок із Колекції Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (Київ, Україна), який отримав ці клітини від Американської колекції типових культур (АТСС). Клітини культивували у середовищі DMEM, доповненому 10% ембріональної телячої сироватки (обидва - Sigma), у «гуманізованій» атмосфері (37°C, 95% повітря, 5% CO₂) [105].

Висновки до розділу 2

Синтезовано ряд тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3 заміщених похідних в структурі яких поєднуються різні фармакофорні фрагменти, що робить дані молекули привілейованими структурами у пошуку «лікоподібних молекул». Структура синтезованих сполук підтверджена методами спектроскопії ¹H і ¹³C ЯМР та хромато-мас-спектрометрії.

Проведено скринінг біологічної активності синтезованих молекул, які поділено на 4 групи відповідно до їх впливу на перебіг судом:

- (A) Похідні, що слабо впливали на перебіг судом - сполуки **2.3e**, **2.3c**, **2.3d**, **2.6**, **2.8** і **2.17**, **2.18f** (44% від загальної кількості протестованих сполук);
- (B) Похідні з проконвульсивною дією - сполука **2.3a** (6% від загальної кількості протестованих сполук);
- (C) Похідні з помірними протисудомними властивостями - сполуки **2.3d**, **2.18a**, **2.18c**, **2.18d** і **2.18e** (31% від загальної кількості протестованих сполук);
- (D) Похідні, що викликали виражений протисудомний ефект - сполуки **2.18b**, **2.14** і **2.21** (19% від загальної кількості протестованих сполук).

Ідентифіковано сполуки-лідери, які проявили найвищу протисудомну активність, а саме: rel-N-(4-[хлорофеніл]-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-

2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл]пропанамід **2.14**, 2-(2-оксо-5*a*,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)-*N*-(2-(трифторметил)феніл)ацетамід **2.18b** та 2-(10-нітро-2,6-диоксо-3,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-5*a*(6*H*)-іл)оцтова кислота **2.21**.

На основі аналізу «структура-активність» для сполук **2.14**, **2.18b** та **2.21** встановлено, що завдяки 4-хлорофенілпропіонамідному заміснику похідне **2.14** проявляє найвищу активність. Результати досліджень порівнювались з натрію вальпроатом, як препаратом порівняння, протисудомні властивості похідного **2.14** були на рівні показників натрію вальпроату, проте збільшення латентного періоду початку настання поодиноких та клонічних судом, зменшення числа тварин з клонічними судомами були навіть дещо кращими в порівнянні з препаратом порівняння.

Завдяки методам молекулярного докінгу встановлено, що сполуки **2.18b** та **2.14** мають високу спорідненість до рецептора GABA_A, з докінг-балами, вищими за показники діазепаму та флумазенілу. Накладання позицій діазепаму та сполуки **2.14** показало, що обидві молекули зв'язуються з одними й тими самими амінокислотними залишками. Отже, зв'язування сполуки **2.14** вказує на те, що вона імітує дію діазепаму на рецептори GABA_A.

Проведено поглиблений скринінг протисудомної активності для похідного **2.14** на шести моделях судом та встановлено, що на моделях судом індукованих пікротоксином та кофеїном, похідне **2.14** показало перспективні результати, які були еквівалентними і навіть кращими за препарат порівняння.

Використання похідного **2.14** у моделях судом індукованих тіосемікарбазидом та стрихніном супроводжувалось позитивними змінами у перебігу судомного процесу, проте препарат порівняння показав кращі результати.

По відношенню до судом індукованих камфорою **2.14** спричинила зменшення кількості тварин з тонічними судомами лише на 14,3% та 1,7-разове подовження часу до загибелі порівняно з контрольною групою. Використання натрію вальпроату на даній моделі судом було набагато ефективнішим.

На моделі електроіндукованих судом сполука **2.14** продемонструвала активність на рівні з карбамазепіном, забезпечуючи зменшення кількості тварин з тонічними та клонічними судомами на 80% порівняно з контрольною групою, зниження важкості судом у 1,8 раза та відсутність летальності.

Підтверджено, що тіопірано[2,3-*d*]тіазолі є перспективними структурами які володіють високою протисудомною активністю, яка є еквівалентною чи перевищує ефект натрію вальпроату. Сполукою-лідером є *rel-N*-(4-[хлорофеніл]-3-[(5aR,11bR)-2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл]пропанамід (**2.14**), лікування яким призвело до збільшення латентного періоду початку клонічних судом на 60%, зниження числа тварин з клонічними та тонічними судомами на 63.33%, а також також зменшення смертності на 63.33% та числа нападів у 4.62 раза у порівнянні з контрольною групою.

Для сполук **2.14**, **2.18b**, і **2.21** проведено аналіз їх цитотоксичності по відношенню до лімфоцитів ізольованих з периферичної крові дорослих людей та ембріонів нирок людини. Сполуки проявили низьку токсичність в концентрації 100 мкМ інгібування росту лімфоцитів для похідного **2.14** становило 20.86%, для похідного **2.18b** - **29.94%** та для **2.21** - 22.04%, по відношенню до ембріонів нирок похідне **2.14** інгібувало ріст клітин на 8.06%, для похідного **2.21** та **2.18b** цей показник становив 0.97 та 50% відповідно.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [34]

РОЗДІЛ 3

СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛІВ ТА ЇХ 3-ЗАМЩЕНИХ ПОХІДНИХ

Сучасна медична хімія стикається з низкою викликів, зокрема високою ресурсоемністю, багатостадійністю, складністю синтезу кандидатів у лікарські засоби та обмеженими можливостями їх структурної модифікації [142-144]. У відповідь на ці виклики наукова спільнота активно впроваджує енергоощадні та екологічно дружні синтетичні стратегії, засновані на принципах «зеленої» хімії, click-хімії та прискореного молекулярного дизайну [142, 144-146]. Ці підходи формують потужну основу для створення багатомільярдних хімічних просторів із високим потенціалом для медичних застосувань.

Багатокомпонентні реакції [147-149], синтез в одному реакторі [150, 151], каскадні та тандемні реакції [152, 153], а також доміно-послідовності [154, 155] набувають дедалі більшого поширення. Такі реакції істотно зменшують кількість синтетичних стадій, споживання розчинників і утворення відходів, водночас забезпечуючи високу хімічну ефективність, синтетичну гнучкість і структурну різноманітність - ключові чинники у пошуку нових біологічно активних сполук.

У цьому дослідженні було реалізовано ефективний підхід до синтезу нових тіопірано[2,3-*d*]тіазолів шляхом доміно-послідовності реакцій конденсації Кньюенагеля та гетеро-циклоаддиції Дільса-Альдера. У межах цього підходу серію цільових сполук було синтезовано за допомогою діастереоселективної двостадійної доміно-реакції.

3.1 Одержання цільових 3-(2- та 3-хлоробензил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону.

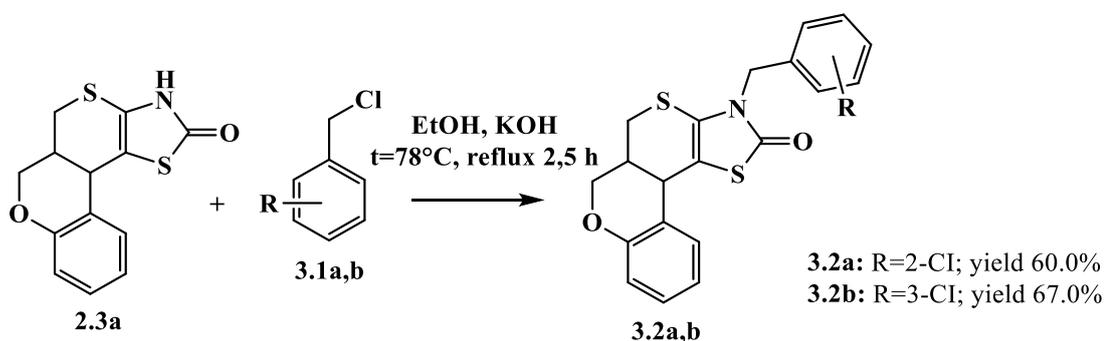
Конденсовані тіопірано-тіазоли є досить привабливими структурами для дослідження, оскільки їх відносно легко одержати з простих, економічно доступних реагентів. Модифікація N-H положення тіазолідинового циклу дозволяє

синтезувати нові похідні, які проявляють високу біологічну активність та мінімальні показники токсикометричних параметрів.

Похідне **2.3a** було обрано як ключовий інтермедіат для подальшої функціоналізації конденсованого тіопірано[2,3-*d*]тіазольного каркасу з огляду на наявність реакційноздатного N-H фрагмента тіазолідинового циклу та його синтетичну доступність. Подальша структурна модифікація здійснювалася шляхом N3-алкілювання, спрямованого на введення ароматичних бензильних замісників, здатних впливати на ліпофільність молекули, її просторову організацію та потенційну взаємодію з біологічними мішенями.

Для реалізації цієї трансформації як алкілюючі агенти використовували 2-хлоро- **3.1a** та 3-хлоробензилхлорид **3.1b**. Реакції проводили при кип'ятінні в етанолі у присутності гідроксиду калію, який забезпечував попереднє утворення калієвої солі вихідного тіопірано[2,3-*d*]тіазолу **2.3a**. Утворення відповідного калієвого похідного є важливим етапом процесу, оскільки призводить до підвищення нуклеофільності атома нітрогену тіазолідинового циклу та створює сприятливі умови для перебігу реакції алкілювання за механізмом SN2. Обрані умови реакції сприяли селективному перебігу N3-алкілювання. Використання етанолу як розчинника забезпечувало добру розчинність реагентів і проміжних сполук, а також відповідало принципам «зеленої» хімії.

Схема 3.1. Схема синтезу 3-(2-хлоробензил)- **3.2a** та 3-(3-хлоробензил)-3,5a,6,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.2b**



Похідні **3.2a,b** порошки світло-жовтого кольору не розчинні в етанолі, ацетонітрилі та діоксані. Розчинні при нагріванні в оцтовій кислоті та диметилформаміді. Очищення даних сполук проводилось методом перекристалізації в суміші розчинників DMF/EtOH (1:2)

У результаті проведених перетворень було одержано N3-бензилзаміщені похідні **3.2a** та **3.2b**, структура яких відрізняється положенням Хлору в ароматичному кільці. Такі відмінності можуть суттєво впливати на електронні та стеричні характеристики молекул, а отже - на їх біологічну активність і фармакокінетичні властивості. Модифікація N-N положення тiazолідинового циклу розглядається як важливий інструмент тонкого налаштування фармакологічного профілю тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних і створює передумови для подальшого дослідження залежностей «структура-активність» у цьому класі сполук. [156]

Одержані тіопірано-тіазоли **3.2a**, **3.2b** ідентифіковано на основі елементного аналізу та спектрів LC-MS, ^1H та ^{13}C ЯМР

Таблиця 3.1. Фізико-хімічні параметри 3-(2-хлоробензил)- **3.2a** та 3-(3-хлоробензил)-3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.2b**

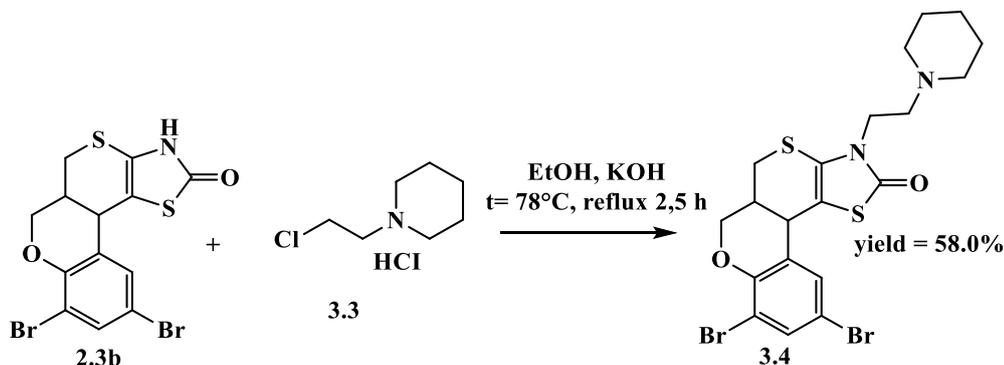
Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
3.2 a	60.0%	189-191	C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₂ S ₂	59.77	4.01	3.48	59.80	4.03	3.49
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ, ppm: 7.49 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.38 - 7.29 (m, 2H, Ar), 7.25 (d, J = 7.3 Hz, 1H, Ar), 7.23 - 7.16 (m, 2H, Ar), 7.00 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 4.87 (s, 2H, CH ₂ benzyl), 4.29 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.15 - 4.05 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.47 (d, J = 13.5 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.23 (dd, J = 13.5, 5.7 Hz, 1H, 5-CH ₂), 2.75 (br.s, 1H, 5a-CH). m/z = 402,0 ([M+H] ⁺).							
3.2 b	67.0%	153-155	C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₂ S ₂	59.77	4.01	3.48	59.81	4.03	3,50
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ, ppm: 7.42 - 7.32 (m, 3H, Ar), 7.29 (s, 1H, Ar), 7.26 - 7.12 (m, 4H, Ar), 6.93 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar), 6.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 4.81 (s, 2H, CH ₂ benzyl), 4.30 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.13 - 3.97 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.49 (d, J = 13.0 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.25 (dd, J = 12.6, 4.1 Hz, 1H, 5-CH ₂), 2.74 (br.s, 1H, 5a-CH). m/z = 402,0 ([M+H] ⁺).							

3.2 Одержання цільового 8,10-дигбромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону.

Для одержання цільового продукту **3.4** проводили функціоналізацію похідного **2.3b** шляхом введення його в реакцію з 1-(2-хлоретил)піперидин

гідрохлоридом **3.3**. Реакція проходила за аналогічним механізмом як у випадку отримання похідних **3.2a** та **3.2b**. Особливістю даної реакції було те, що КОН додавався в двократному надлишку у мольному співвідношенні, для нейтралізації гідрохлориду.

Схема 3.2. Схема синтезу 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **3.4**



Синтезована сполука **3.4** є порошком жовтого кольору не розчинним в етанолі, розчинним в ацетонітрилі при нагріванні.

Таблиця 3.2. Фізико-хімічні параметри 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **3.4**

Сполука	Вихід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
3.4	58.0%	144-146	C ₂₀ H ₂₂ Br ₂ N ₂ O ₂ S ₂	43.97	4.06	4.06	44.00	4.08	4.07
	Спектр ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ, ppm: 7.72 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar), 4.49 (d, J = 9.8 Hz, 1H, CH-11b), 4.27 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 6-CH ₂), 4.14 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 6-CH ₂), 3.69 - 3.57 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -pip.), 3.51 (d, J = 12.9 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.30 - 3.22 (m, 1H, 5-CH ₂), 2.79 (br.s, 1H, 5a-CH), 2.43 (t, J = 6.0 Hz, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -pip.), 2.34 (br.s, 4H, 2CH ₂ pip.), 1.44 (br.s, 4H, 2CH ₂ pip.), 1.34 (br.s, 2H, CH ₂ pip.). m/z = 547.0 ([M + H] ⁺).							

Очищення сполуки проведено перекристалізацією з ацетонітрилу. Дане похідне було використане для подальших синтетичних перетворень. Структура та чистота синтезованої сполуки **3.4** підтверджена за допомогою методів ¹H та хромато-мас-спектрометрії рис. 3.3, 3.4.

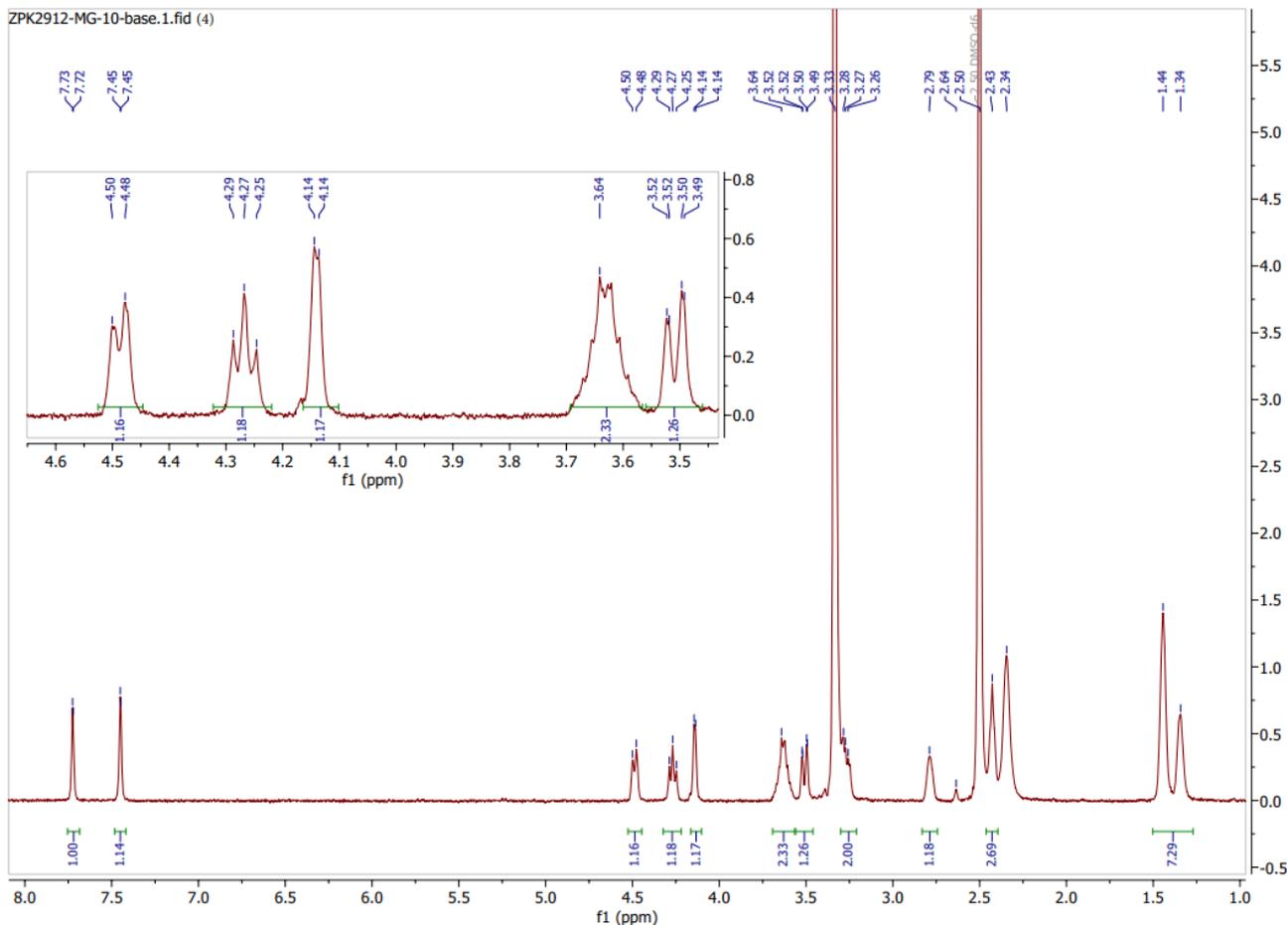


Рис. 3.3. Спектр ^1H ЯМР 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.4**.

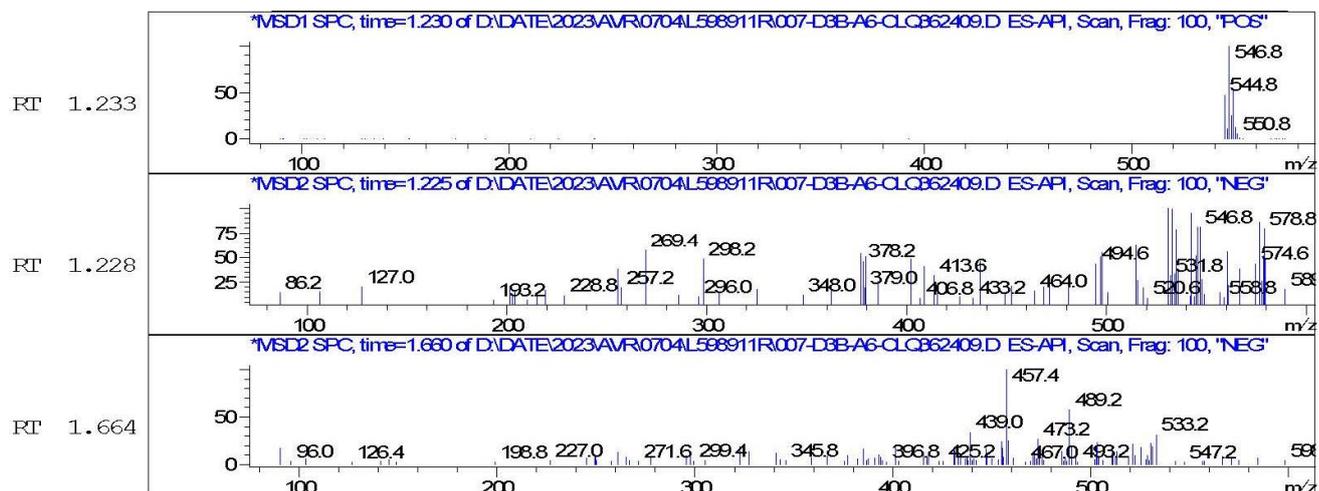


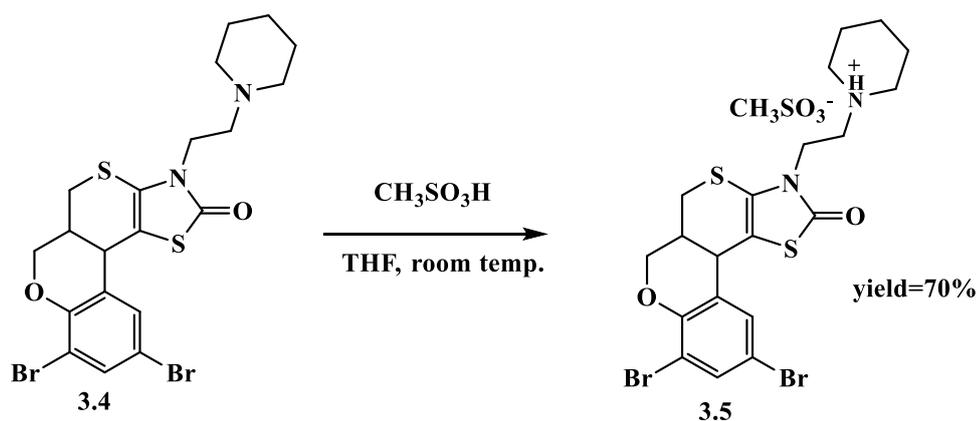
Рис. 3.4. Спектр MS 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.4**.

3.3 Синтез водорозчинної солі 8,10-дибромо-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону.

Наявність піперидинового фрагмента у положенні 3 тіазолідинового циклу похідного **3.4** надає можливість одержання водорозчинної солі за рахунок утворення катіонної структури, що значно підвищує розчинність сполуки у полярних розчинниках. Для цього було проведено реакцію утворення солі із метансульфоною кислотою, яка відбувалася у середовищі тетрагідрофурану (THF) при 40 °С. Такий підхід дозволяє отримати стабільну кристалічну сіль, що характеризується підвищеною гідрофільністю та потенційно кращими фармакокінетичними властивостями. У результаті реакції було синтезовано 1-(2-((5aS,11bS)-8,10-дибромо-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонат **3.5**, який виділявся у вигляді стійкої водорозчинної солі.

Отримання подібних солей є важливим етапом при створенні потенційно біоактивних сполук, оскільки підвищена розчинність у воді полегшує їх застосування у біологічних дослідженнях, а також може позитивно впливати на біодоступність.

Схема 3.3. Схема синтезу 1-(2-((5aS,11bS)-8,10-дибромо-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонату **3.5**



Синтезований 1-(2-((5aS,11bS)-8,10-дибромо-2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)етил)піперидин-1-ію метансуль-

фонат є рожевим порошком. Структура та чистота синтезованої сполуки **3.5** підтверджена за допомогою методів ^{11}H та хромато-мас-спектрометрії (Рис. 3.5.).

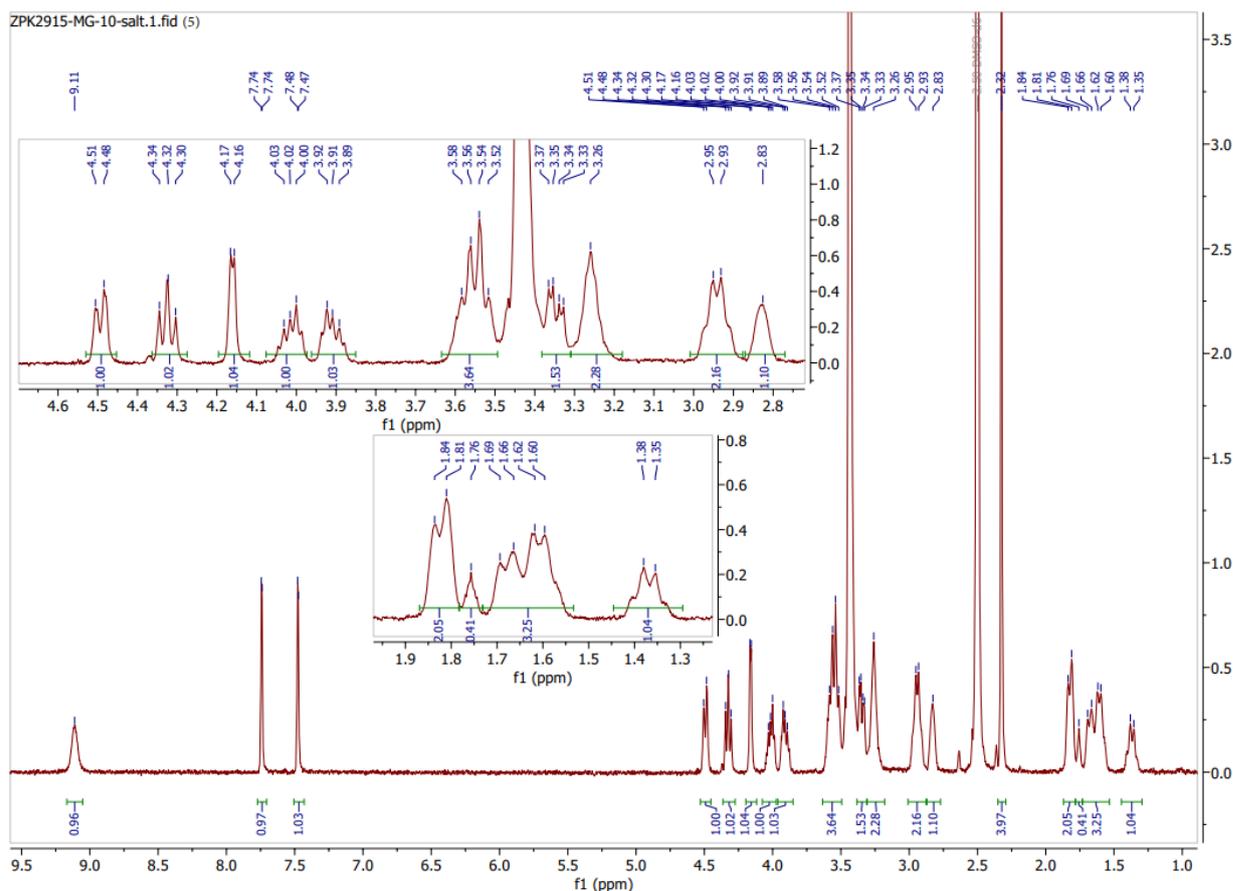


Рис. 3.5. Спектр ^1H ЯМР 1-(2-((5a*S*,11*bS*)-8,10-Дибромо-2-оксо-5a,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонату **3.5**

Таблиця 3.3. Фізико-хімічні параметри 1-(2-((5a*S*,11*bS*)-8,10-Дибромо-2-оксо-5a,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонату **3.5**

Спол. ука	Вихі Д, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				С	Н	Н	С	Н	Н
3.5	70.0%	221-223	C ₂₀ H ₂₃ Br ₂ N ₂ O ₂ S ₂	43.89	4.24	5.12	43.92	4.27	5.14
	Спектр ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ, ppm: 9.11 (s, 1H, N ⁺ H), 7.74 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.47 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 4.49 (d, J = 10.6 Hz, 1H, CH-11 <i>b</i>), 4.32 (t, J = 10.2 Hz, 1H, 6-CH ₂), 4.16 (d, J = 4.3 Hz, 1H, 6-CH ₂), 4.02 (dt, J = 15.0, 7.2 Hz, 1H, -CH ₂ -CH ₂ -pip.), 3.91 (dt, J = 15.0, 7.2 Hz, 1H, -CH ₂ -CH ₂ -pip.), 3.55 (q, J = 11.4, 10.4 Hz, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -pip.), 3.35 (dd, J = 13.5, 5.7 Hz, 2H, pip.), 3.30 - 3.19 (m, 2H, 5-CH ₂), 2.94 (q, J = 11.6 Hz, 2H, pip.), 2.83 (s, 1H, 5a-CH), 2.32 (s, 3H, CH ₃ Ms), 1.82 (d, J = 11.6 Hz, 2H, pip.), 1.72 - 1.53 (m, 3H, pip.), 1.38 (t, J = 13.3 Hz, 1H, pip.). m/z = 547.0 ([M + H] ⁺).							

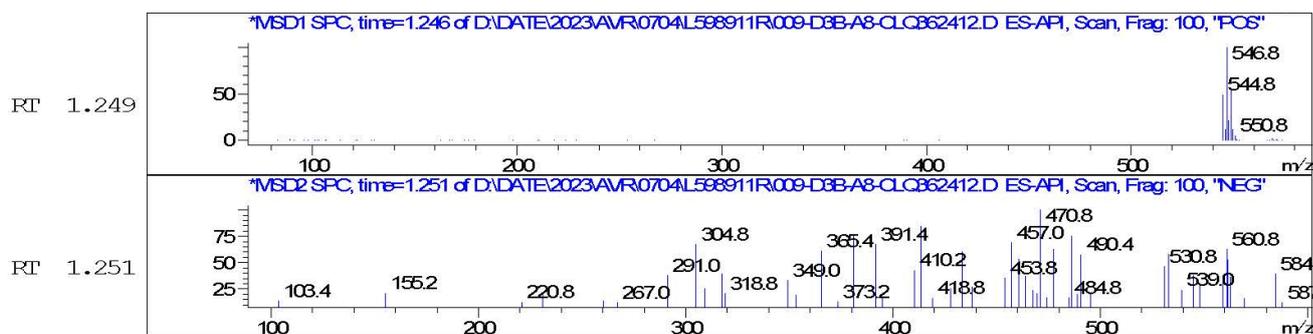
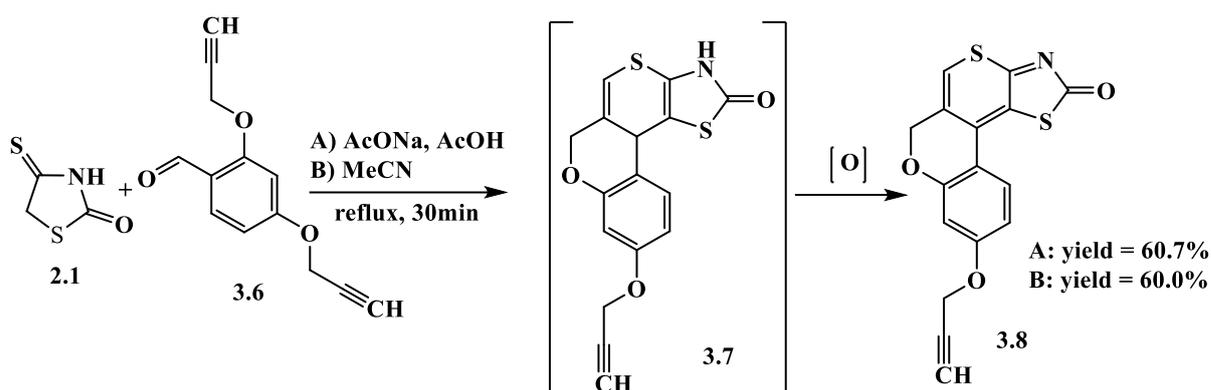


Рис. 3.6. Спектр MS 1-(2-((5a*S*,11b*S*)-8,10-Дибромо-2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонату **3.5**

3.4 Синтез 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано-[2,3-*d*]тіазол-2-ону.

Синтез 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8** здійснювався аналогічним методом, що й синтез 2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **2.6**, із застосуванням відповідного *O*-пропаргілзаміщеного саліцилового альдегіду **3.6** як вихідного реагенту. У процесі реакції відбувалася послідовна конденсація Кньюенагеля з подальшим циклоприєднанням *гетеро*-Дільса-Альдера, що приводило до утворення цільового тіопіранотіазольного конденсованого продукту **3.8**. Для оптимізації умов синтезу була здійснена спроба змінити реакційне середовище з оцтової кислоти на ацетонітрил, проте очікуваного збільшення виходу продукту реакції **3.8** не спостерігалось. Очікуваний продукт **3.7** не було виділено, імовірно, через високу реакційну здатність та нестабільність зазначеної структури на повітрі, що призводило до її негайного окиснення з утворенням більш стабільної ароматичної системи **3.8** з виходом 60,0 %. Реакцію також можна проводити в киплячій оцтовій кислоті у присутності ацетату натрію як каталізатора, при цьому утворення окисненого продукту **3.8** відбувається з практично таким самим виходом (60,7 %), тоді як сполуку **3.8** знову ж таки виділити не вдається.

Схема 3.4. Схема синтезу 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано-[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8**



Синтезований 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **3.8** є порошком жовтого кольору, не розчинний в етанолі, оцтовій кислоті, ацетонітрилі та діоксані, розчинний в ДМФ при нагріванні. Очищення сполуки відбувалось методом перекристалізації в суміші розчинників DMF/EtOH (1:2). Структура та чистота синтезованої сполуки **3.8** підтверджена за допомогою методів ^1H та хромато-мас-спектрометрії рис. 3.7, 3.8.

Таблиця 3.4. Фізико-хімічні параметри 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано-[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8**

Сполука	Вихід, %	$T_{\text{плав.}}$, °C	Брутто-формула	Вираховано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
3.5	60.0%	264-265	$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}_2$	58.70	2.77	4.28	58.73	2.80	4.30
	Спектр ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ , ppm: 8.33 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, Ar), 8.03 (dd, $J = 9.0, 1.6$ Hz, 1H, Ar), 6.97 (ddd, $J = 9.0, 2.6, 1.5$ Hz, 1H, Ar), 6.82 (dd, $J = 2.6, 1.6$ Hz, 1H, -CH=), 5.12 (s, 2H, -CH ₂ -), 4.97 - 4.91 (m, 2H, -CH ₂ -), 3.68 (q, $J = 2.2$ Hz, 1H, $\equiv\text{C-H}$). $m/z = 328.0$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).							

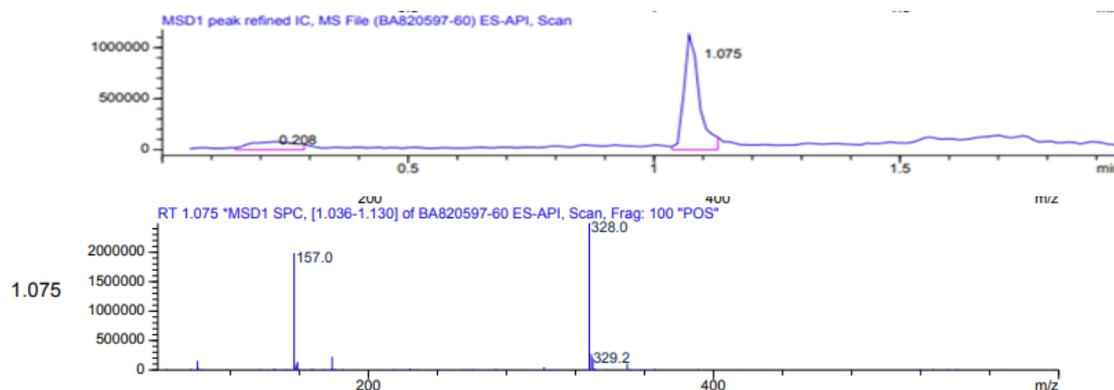


Рис. 3.7. Спектр LC-MS 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано-[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8**

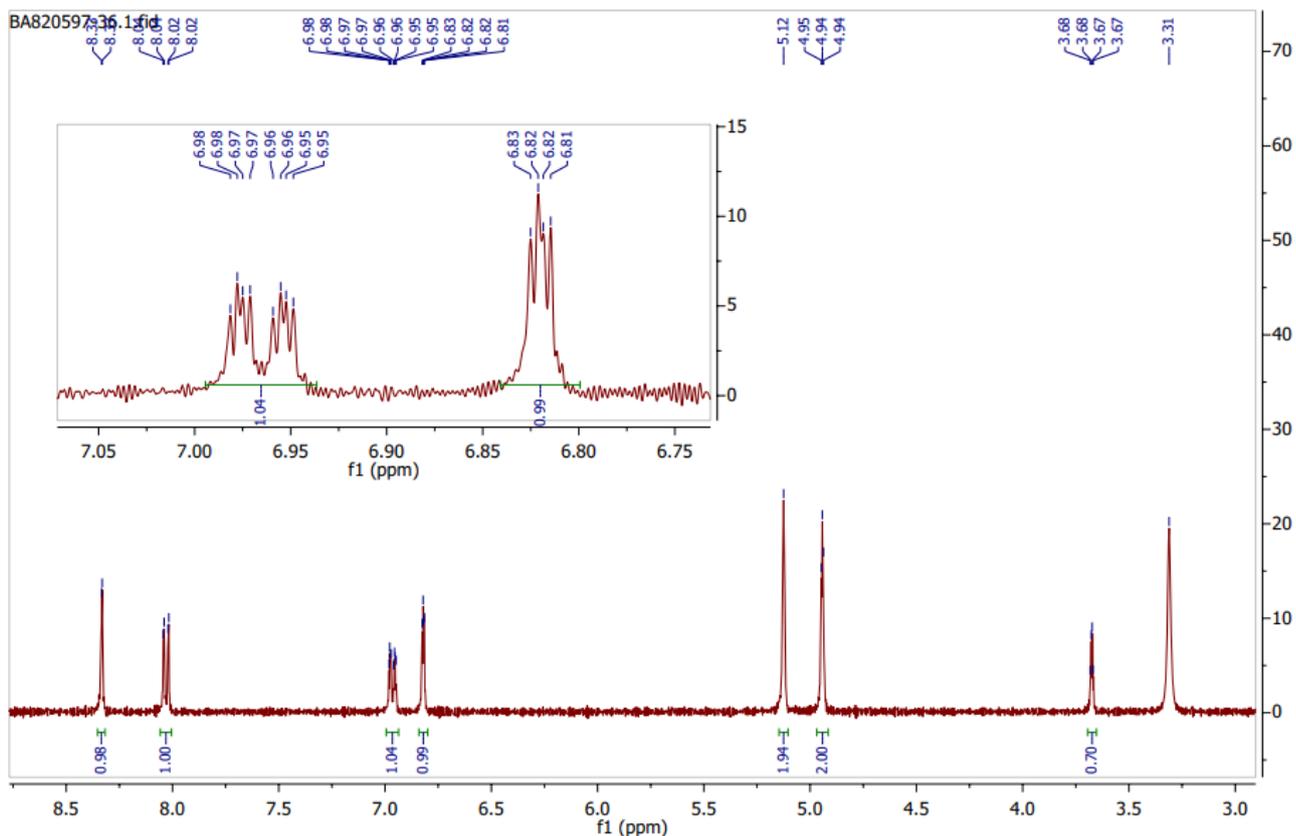


Рис. 3.8. Спектр ^1H ЯМР 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5] тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **3.8**

Ароматизація проміжного продукту **3.7** підтверджується відсутністю у ^1H ЯМР-спектрі виділеного продукту **3.8** очікуваних сигналів протонів насиченого тіопіранового кільця в діапазоні 3,8–4,5 м.д. Натомість спостерігається лише один сигнал протона ненасиченого тіопіранового кільця при $\delta = 6,82$ м.ч., без короткодіапазонних спін-спінових взаємодій (подвійний дублет із $J = 2,6$ та $1,6$ Гц) (Рис. 3.8.). Мас-спектр виділеного продукту (Рис.3.7.) демонструє іон з $m/z = 328,0$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), що також відповідає окисненій ароматичній структурі **3.8**. Сукупність отриманих даних переконливо підтверджує перебіг *in situ* окиснення проміжного продукту з утворенням стабільної ароматичної гетероциклічної системи.

3.5 Дослідження протипухлинної активності

Злоякісні новоутворення й надалі залишаються однією з основних проблем сучасної медицини, оскільки є однією з провідних причин смертності у світі [157-160]. Онкологічні захворювання становлять складну й гетерогенну сукупність

понад 200 патологій, об'єднаних узагальненим терміном «рак», які істотно відрізняються за гістогенезом, етіологією, патогенезом, клінічним перебігом, молекулярними характеристиками та чутливістю до лікування. Згідно з даними Cancer Research Institute (2023), найпоширенішими формами раку у світі залишаються рак легень, рак молочної залози, колоректальний рак, рак передміхурової залози, рак сечового міхура та меланома [161]. Саме ці типи злоякісних пухлин становлять майже 50 % усіх випадків онкологічної захворюваності у США та країнах Європи [161].

У країнах ЄС у 2018 році було зареєстровано приблизно 1,6 млн нових випадків раку серед чоловіків та 1,4 млн - серед жінок. За той самий період близько 790 000 чоловіків і 620 000 жінок померли від онкологічних захворювань [162]. Найвищу захворюваність у регіоні мав рак молочної залози — понад 523 000 нових випадків, що робить його провідною формою раку серед жінок, особливо у віковій групі старше 50 років [161]. Колоректальний рак посів друге місце за поширеністю — 500 000 зареєстрованих випадків і 243 000 смертей, що свідчить про високу летальність цього захворювання [163]. Рак легень був третім за частотою діагностування (470 000 випадків), проте залишався провідною причиною онкологічної смертності з 388 000 летальних випадків у країнах ЄС [163].

Рак передміхурової залози, з 450 000 нових випадків, є четвертим за поширеністю видом раку та щороку призводить до смерті близько 360 000 чоловіків у світі [163]. Меланома шкіри залишається особливо поширеною серед молодих дорослих віком 25–40 років: у США у 2023 році було зареєстровано 97 610 нових випадків, а за даними GLOBOCAN — понад 325 000 випадків у світі у 2020 році [164-167]. Рак сечового міхура у 2023 році мав орієнтовно 82 000 нових випадків лише у США. Це захворювання характеризується високим ризиком рецидивування навіть після радикального лікування, що зумовлює необхідність постійного моніторингу пацієнтів та розробки більш ефективних схем профілактики рецидивів пухлин [168].

Узагальнено наведені дані свідчать про надзвичайно високий рівень онкологічної захворюваності та смертності, що зумовлює нагальну потребу в подальшій розробці ефективних методів профілактики, ранньої діагностики та лікування злоякісних новоутворень [169].

Для оцінки потенційної протипухлинної активності синтезованих сполук тіопірано[2,3-*d*]тіазольного ряду **3.2a,b**, **3.4**, **3.8** було проведено біологічний скринінг на стандартній панелі з 60 ліній пухлинних клітин людини (NCI, США) при концентрації 10^{-5} М (Табл. 2.12). Отримані дані свідчать, що окремі сполуки проявляють значну цитостатичну та цитотоксичну активність, а також різний рівень вибірковості та спектру дії. Це вказує на перспективність досліджуваних тіопірано[2,3-*d*]тіазольних систем як потенційних структурних платформ для подальшої оптимізації та розробки нових протипухлинних засобів.

Таблиця 3.5. *In vitro* протипухлинна активність похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу **3.2a,b**, **3.4**, **3.8** за фіксованої концентрації 10^{-5} М.

Сполука.	Середній ріст, %	Діапазон росту, %	10 найчутливіших клітинних ліній / ріст %	Позитивний цитостатичний ефект	Позитивний цитотоксичний ефект
3.2a	90.78	40.55 - 127.56	CCRF-CEM (Лейкемія) 75.33 K-562 (Лейкемія) 68.93 MOLT-4 (Лейкемія) 69.56 EKVX (Недрібноклітинний рак легень) 60.22 NCI-H226 (Недрібноклітинний рак легень) 75.50 SK-MEL-5 (Меланома) 68.62 SN12C (Рак нирок) 73.95 MCF7 (Рак молочної залози) 74.79 HS 578T (Рак молочної залози) 40.55 T-47D (Рак молочної залози) 46.69	0/52	2/52
3.2b	78.16	21.41 - 132.16	CCRF-CEM (Лейкемія) 49.82 K-562 (Лейкемія) 49.01 MOLT-4 (Лейкемія) 45.81 SR (Лейкемія) 37.91 EKVX (Недрібноклітинний рак легень) 44.68	0/52	8/52

			NCI-H226 (Недрібноклітинний рак легень) 56.17 SK-MEL-5 (Меланома) 49.19 MCF7 (Рак молочної залози) 57.28 HS 578T Рак молочної залози) 22.35 T-47D (Рак молочної залози) 21.41		
3.5	50.25	-84.37 - 94.31	HL-60(TB) (Лейкемія) 21.57 K-562 (Лейкемія) 23.79 SR (Лейкемія) 12.64 NCI-H460 (Недрібноклітинний рак легень) 23.47 HCT-15 (Рак прямої кишки) 28.05 HT29 (Рак прямої кишки) 16.45 SF-539 (Рак ЦНС) 10.42 MALME-3M (Меланома) 16.54 SK-MEL-28 (Меланома) - 84.37 UACC-257 (Меланома) -1.83	2/57	22/57
3.8	52.60	-80.26 - 125.90	SR (Лейкемія) -25.15 EKVX (Недрібноклітинний рак легень) -4.93 NCI-H522 (Недрібноклітинний рак легень) -1.78 KM12 (Рак прямої кишки) 10.35 SF-539 (Рак ЦНС) -80.26 SNB-75 (Рак ЦНС) -27.19 OVCAR-4 (Рак яєчників) - 28.76 786-0 (Рак нирки) -0.99 TK-10 (Рак нирки) -20.94 HS 578T (Рак молочної залози) -1.72	9/52	25/52

Сполука **3.2a** проявила помірну цитостатичну активність щодо двох ліній клітин раку молочної залози - HS 578T та T-47D, для яких рівень інгібування росту становив 59,45% та 53,31% відповідно. Водночас решта 50 досліджених ліній клітин продемонстрували низьку чутливість до цієї сполуки, що вказує на вузький

спектр дії та можливу специфічність механізму дії. Для сполуки **3.2b** рівень інгібування росту клітин HS 578T та T-47D становив 77,65% і 78,59% відповідно. Загалом 8 із 52 ліній клітин виявили чутливість до цієї структури, що свідчить про розширення спектра протипухлинної дії внаслідок структурної модифікації.

Сполука **3.5**, яка містить піперидиновий фрагмент, продемонструвала виражену цитотоксичність щодо клітин меланоми SK-MEL-28, де рівень інгібування досягав 84,37%. Найчутливішими до дії сполуки **3.8** виявилися клітинні лінії OVCAR 4 (рак яєчників), 786 0 і TK 10 (рак нирки), SF 539 і SNB 75 (пухлини центральної нервової системи), EKVX та NCI H522 (недрібноклітинний рак легенів). У цих випадках інгібування росту коливалося від -80,26% до -125,90%, що свідчить про виражену цитотоксичну дію сполуки. У межах проведеного дослідження сполуку **3.8** було обрано для поглибленого біологічного тестування на панелі із 60 ліній клітин людських пухлин (NCI-60) при п'яти концентраціях у діапазоні 10^{-4} - 10^{-8} М, оскільки вона продемонструвала найвищу активність серед усіх протестованих зразків. [156]

Для оцінки біологічної активності сполуки використовували такі ключові параметри:

- **GI₅₀ (Growth Inhibition 50%)** - концентрація, що пригнічує ріст клітин на 50% (цитостатичний ефект);
- **TGI (Total Growth Inhibition)** - концентрація, що повністю зупиняє проліферацію клітин (цитостатичний ефект);
- **LC₅₀ (Lethal Concentration 50%)** - концентрація, що спричиняє загибель 50% клітин (цитотоксичний ефект) (Табл. 2.13).

Результати поглибленого скринінгу показали, що сполука **3.8** виявила виражений цитостатичний ефект щодо більшості досліджуваних ліній клітин. Найнижчі значення GI₅₀ (менше 1 μM) були зафіксовані для таких клітинних ліній: OVCAR-4 (рак яєчників): GI₅₀ = 0,382 μM; SR (лімфома): GI₅₀ = 0,676 μM; 786-0 (рак нирки): GI₅₀ = 0,696 μM; A498 (рак нирки): GI₅₀ = 0,528 μM; BT-549 (рак молочної залози): GI₅₀ = 0,666 μM. Для зазначених ліній також було зафіксовано

зниження життєздатності клітин LC₅₀ у межах до 50 μМ, що додатково підтверджує цитотоксичний ефект сполуки **3.8** (Табл. 2.13).

Таблиця 3.6 Узагальнення результатів скринінгу NCI-60 для сполуки **3.8** за різних концентрацій (10⁻⁴-10⁻⁸ М).

Клітинна лінія	GI ₅₀ , μМ / SI	TGI, μМ / SI	LC ₅₀ , μМ / SI
Лейкемія			
CCRF-CEM	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
HL-60(TB)	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
K-562	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MOLT-4	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
RPMI-8226	22.20/0.36	3.88/2.57	67.60/0.185
SR	0.676/11.83	20.80/0.48	53.50/0.23
MG_MID	73.81	70.78	86.85
Недрібноклітинний рак легень			
A549/ATCC	36.60/0.218	> 100/0.1	> 100/0.12
EKVX	36.50/0.219	> 100/0.1	> 100/0.12
HOP-62	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
HOP-92	11.40/0.7	25.20/0.39	55.60/0.22
NCI-H226	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
NCI-H23	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
NCI-H322M	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
NCI-H460	17.10/0.46	33.80/0.29	67.20/0.186
NCI-H522	43.20/0.18	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	60.53	84.33	91.42
Рак прямої кишки			
COLO 205	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
HCC-2998	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
HCT-116	11.40/0.7	23.80/0.4	49.70/0.25
HCT-15	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
HT29	35.10/0.22	> 100/0.1	> 100/0.12
KM12	13.50/0.59	27.10/0.36	54.30/0.23
SW-620	42.70/0.18	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	57.52	78.7	86.2
Рак ЦНС			
SF-268	13.40/0.59	26.30/0.38	51.60/0.24
SF-295	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
SF-539	18.50/0.43	40.30/0.24	87.70/0.14
SNB-19	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
SNB-75	12.70/0.62	26.40/0.37	55.10/0.22
U251	11.90/0.67	27.80/0.35	65.30/0.19
MG_MID	42.75	53.46	76.6

Меланома			
LOX IMVI	55.60/0.14	> 100/0.1	> 100/0.12
MALME-3M	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
M14	27.90/0.28	54/0.18	> 100/0.12
MDA-MB-435	19.10/0.41	35.90/0.27	67.30/0.18
SK-MEL-2	18.90/0.42	38/0.26	76.40/0.16
SK-MEL-28	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
SK-MEL-5	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
UACC-257	30.90/0.25	68.20/0.14	> 100/0.12
UACC-62	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	61.37	77.34	93.7
Рак яєчників			
IGROV1	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
OVCAR-3	17.60/0.45	32.50/0.28	59.70/0.21
OVCAR-4	0,382/20.94	0,864/11.57	29.5/0.42
OVCAR-5	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
OVCAR-8	14.6/0.54	28/0.35	53.70/0.23
NCI/ADR-RES	99.30/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
SK-OV-3	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	61.69	65.9	77.55
Рак нирки			
786-0	0.696/11.49	38.80/0.25	> 100/0.12
A498	0,528/15.1	15.80/0.63	40.60/0.30
ACHN	-	-	-
CAKI-1	16.70/0.47	31.80/0.31	60.30/0.20
RXF 393	64.70/0.12	> 100/0.1	> 100/0.12
SN12C	18.30/0.43	42.60/0.23	99.60/0.12
TK-10	15.40/0.51	34.10/0.29	75.50/0.16
UO-31	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	30.90	51.87	82.28
Рак простати			
PC-3	18/0.44	33.20/0.3	61.40/0.20
DU-145	22.60/0.35	43.60/0.22	84.10/0.14
MG_MID	29.30	38.4	72.75
Рак молочної залози			
MCF7	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MDA-MB-231/ATCC	29.50/0.27	98.20/0.101	> 100/0.12
HS 578T	14.70/0.54	28.10/0.35	53.40/0.23
BT-549	0,666/12	17.80/0.56	42.90/0.29
T-47D	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MDA-MB-468	> 100/0.08	> 100/0.1	> 100/0.12
MG_MID	57.47	74	72.71
MG_MID_60	8	10	12.54

Для кількісної оцінки селективності сполуки **3.8** були розраховані індекси селективності SI, які визначалися шляхом ділення середніх значень GI₅₀, TGI та LC₅₀ по всій панелі клітин (MG_MID) на відповідні значення кожного параметра для окремої клітинної лінії. Отримані співвідношення інтерпретувалися за такою шкалою: SI від 3 до 6 - помірна селективність; SI > 6 - висока селективність; SI < 3 - відсутність селективності.

Згідно з результатами, наведеними у таблиці 2.13, більшість значень SI були меншими за 3, що свідчить про обмежену селективність сполуки щодо більшості клітинних ліній. Водночас найвищі значення SI зафіксовано для клітин, які проявили найвищу чутливість до дії сполуки **3.8**: OVCAR-4 (рак яєчників): SI = 20,94 (GI₅₀), SI = 11,57 (TGI); SR (лейкемія): SI = 11,83 (GI₅₀); A498 (рак нирки): SI = 15,10 (GI₅₀); 786-0 (рак нирки): SI = 11,49 (GI₅₀); BT-549 (рак молочної залози): SI = 12,00 (GI₅₀) (Табл. 2.13, Рис. 2.17). Таким чином, сполука **3.8** виявила високу вибірковість щодо окремих типів пухлинних клітин, зокрема раку яєчників, нирки та молочної залози, що вказує на перспективність її подальшого дослідження як селективного протипухлинного агента [50]. Натомість, для більшості інших клітинних ліній спостерігалася низька вибірковість, що може свідчити про неспецифічний механізм дії або потребу в структурній оптимізації молекули для підвищення таргетованості.

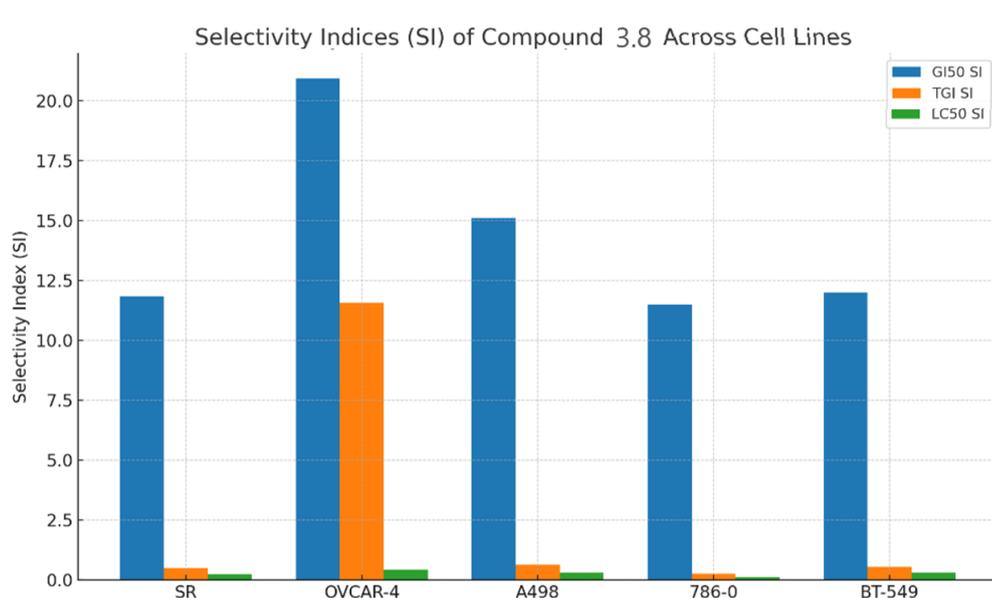


Рисунок 3.9. Порівняння індексу селективності (SI) за параметрами GI₅₀, TGI та LC₅₀ для клітинних ліній з найвищою чутливістю до сполуки **3.8**.

З метою узагальненої оцінки біологічної активності сполуки **3.8** на всій панелі клітинних ліній NCI-60 було проаналізовано середні значення трьох ключових біологічних показників: GI₅₀ (Growth Inhibition 50%) - середнє значення 8 мкМ, що вказує на виражене пригнічення проліферації більшості пухлинних клітин за помірних концентрацій тестованої сполуки; TGI (Total Growth Inhibition) - середнє значення 10 мкМ, яке демонструє здатність сполуки повністю зупинити клітинний ріст (цитостатичний ефект) у більшості випадків; LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) - середнє значення 12,54 мкМ, що підтверджує цитотоксичний ефект щодо значної частини клітинних ліній. Зазначені показники були розраховані на основі параметра MG_MID (Mean Graph Midpoint), який є стандартизованим індикатором середньої ефективності сполуки щодо всіх 60 клітинних ліній. Такий підхід забезпечує об'єктивне порівняння активності різних молекул або структур незалежно від типу пухлини.

Біологічне тестування синтезованих похідних тіопірано[2,3-*d*]тіазолу дозволило виявити певні залежності «структура-активність» та підкреслило вплив навіть незначних структурних модифікацій на цитотоксичний профіль сполук. Зокрема, сполука **3.1a** проявила помірну цитостатичну активність лише щодо двох ліній раку молочної залози (HS 578T та T-47D), що свідчить про вузький спектр дії та вказує на можливу специфічність механізму її взаємодії з біологічними мішенями. Переміщення атома хлору з орто-положення (**3.1a**) у мета-положення (**3.1b**) ароматичного кільця призвело до підвищення інгібувальної активності та розширення спектра цитотоксичної дії сполуки **3.1b**. Це підкреслює критичну роль електронних і стеричних ефектів у формуванні біологічної активності цих молекул.

Введення піперидинового фрагмента (сполука **3.5**) сприяло підвищенню цитотоксичності, зокрема щодо клітинної лінії меланоми SK-MEL-28 (84,37 % інгібування росту). Загалом, 22 з 57 протестованих клітинних ліній виявили чутливість до цієї сполуки, що свідчить про широкий профіль активності з частковою селективністю щодо клітин меланоми. Це дозволяє припустити, що

циклічні аміни можуть покращувати проникність через клітинні мембрани та взаємодію з мішенями за рахунок гідрофобних контактів і водневого зв'язування.

Сполука **3.8** проявила найширший спектр протипухлинної активності, індукуючи загибель пухлинних клітин у 25 з 52 протестованих клітинних ліній. Найбільш чутливими виявилися лінії OVCAR-4 (рак яєчників), 786-0 та ТК-10 (нирково-клітинний рак), SF-539 і SNB-75 (пухлини центральної нервової системи), а також EKVX і NCI-H522 (недрібноклітинний рак легень). Загальні результати первинного скринінгу підтверджують високий потенціал сполуки **3.8** як перспективного протипухлинного агента завдяки її широкому цитотоксичному спектру та вираженій дії на пухлинні клітини різного гістогенетичного походження.

Подальша поглиблена оцінка з використанням панелі NCI-60 підтвердила, що сполука **3.8** проявляє високу активність у мікромольному діапазоні. Найнижчі значення GI_{50} (< 1 мкМ) були зафіксовані для клітинних ліній OVCAR-4 (0,382 мкМ), SR (лімфома, 0,676 мкМ), 786-0 (0,696 мкМ), A498 (0,528 мкМ) та BT-549 (0,666 мкМ), що відповідає критеріям потенційних протипухлинних агентів. Відповідні значення LC_{50} також підтвердили здатність сполуки індукувати загибель пухлинних клітин. Сполука **3.8** продемонструвала найвищі індекси селективності (SI) для OVCAR-4 (SI = 20,94), A498 (15,1), 786-0 (11,49), SR (11,83) та BT-549 (12,0), що свідчить про її потенційно таргетну дію щодо клітин раку яєчників, нирок, гемопоетичної системи та агресивних форм раку молочної залози.

3.6 Опис експериментів.

3.6.1. Хімічні дослідження.

Елементний аналіз (C,H,N) був виконаний з використанням Perkin-Elmer 2400 CHN аналізатору і знаходилися в межах $\pm 0,4\%$ від теоретичних значень. Температури плавлення були виміряні відкритим капілярним методом на приладі Buchi B-545 і представлені в некорегованій формі. Спектри ^1H (400 МГц) та ^{13}C (100 МГц) ЯМР реєстрували на приладі Varian Gemini в ДМСО- d_6 з використанням

тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. Хімічні зміщення наведені в мільйонних частках з використанням δ шкали.

Синтез (5*aS*,11*bS*)-3-(2-хлоробензил)-3,5*a*,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону (3.2*a*). До розчину гідроксиду калію (1.3 ммоль) в етанолі (8 мл) додавали 2.3*a* (1.3 ммоль) та перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв для утворення відповідної калієвої солі. Далі одноразово додавали 2-хлоробензилхлорид 3.1*a* (1.5 ммоль), після чого реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2,5 год. Після охолодження продукт осаджували водою, відфільтровували, висушували та перекристалізовували із суміші ДМФ/етанол (1:2).

Синтез (5*aS*,11*bS*)-3-(3-хлоробензил)-3,5*a*,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону (3.2*b*). Реакцію проводили аналогічно до синтезу сполуки 3.2*a*, використовуючи 3-хлоробензилхлорид 3.1*b* (1.5 ммоль).

Синтез (5*aS*,11*bS*)-8,10-Дибromo-3-(2-(піперидин-1-іл)етил)-3,5*a*,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону 3.4. До розчину гідроксиду калію (2.9 ммоль) в етанолі (10 мл) додавали сполуку 2.3*b* (1.49 ммоль) і перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Далі одноразово додавали гідрохлорид 1-(2-хлороетил)піперидину 3.3 (2.9 ммоль). Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2,5 год. Після завершення реакції та охолодження продукт відфільтровували, висушували та перекристалізовували з ацетонітрилу.

Синтез 1-(2-((5*aS*,11*bS*)-8,10-дибromo-2-оксо-5*a*,11*b*-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)етил)піперидин-1-ієвого метансульфонату (3.5). До розчину сполуки 3.4 (0,915 ммоль) у тетрагідрофурані (3 мл) додавали метансульфонову кислоту (0,915 ммоль). Реакційну суміш нагрівали до 40 °C та перемішували протягом 5 хв. Після охолодження реакційної суміші розчинник упарювали у вакуумі, одержаний кристалічний осад обробляли діетиловим етером, відфільтровували, промивали діетиловим етером, висушували та використовували без подальшого очищення.

Синтез 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону (**3.8**). До розчину 4-тіоксо-2-оксотіазолідинону **2.1** (3.6 ммоль) в ацетонітрилі (30 мл), що містив каталізатор ЕДДА (0.4 ммоль), додавали 2,4-біс(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегід **3.6** (5 ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 15 хв реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 год. Після завершення реакції та охолодження осад відфільтровували, висушували та очищали методом перекристалізації з суміші розчинників ДМФ/етанол (1:2).

Висновки до розділу 3

Синтезовано ряд 3-заміщених тіопірано[2,3-d]тіазолів з використанням реакцій, що включала конденсацію Кньовенагеля з подальшою внутрішньомолекулярною гетероциклізацією за механізмом *гетеро*-Дільса-Альдера між 4-тіоксо-2-оксотіазолідиноном **2.1** та О-алкільованими похідними саліцилальдегідів, які містять алільні або пропаргільні замісники. N³-алкілювання нуклеофільного центру в положенні 3 тіазолідинового циклу дало змогу одержати сполуки **3.2a, b** та **3.4**.

Введення піперидинового фрагмента забезпечило можливість синтезу водорозчинної солі метансульфонової кислоти **3.5**, що суттєво підвищує фармакокінетичний потенціал сполуки. Покращена водорозчинність є критичним параметром для біодоступності потенційних лікарських засобів і розширює можливості їх використання в біологічних дослідженнях.

Синтез 9-(проп-2-ін-1-ілокси)-2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **3.8** проведено в середовищі оцтової кислоти та ацетонітрилу, доведено, що використання ацетонітрилу як реакційного середовища не призводить до очікуваного збільшення виходу продукту реакції.

Проведений скринінг біологічної активності синтезованих похідних виявило виражені кореляції типу “структура-активність”, що підтверджує суттєвий вплив навіть незначних структурних змін на цитотоксичний профіль сполук.

Встановлено, що 1-(2-((5a*S*,11b*S*)-8,10-дибромо-2-оксо-5a,11b-дигідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6*H*)-іл)етил)піперидин-1-ію метансульфонат **3.5** найбільш активне по відношенню до клітинних ліній меланоми SK-MEL-28 спричинивши загибель -84.37% клітин та UACC-257 спричинивши загибель -1.83% клітин. 9-(Проп-2-ін-1-ілокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **3.8** у свою чергу проявив активність до більшої кількості клітинних ліній, що свідчить про зменшення селективності. Використання похідного **3.8** призвело до загибелі NCI-H522 (Non-Small Cell Lung Cancer) -1.78% клітин, SF-539 (CNS Cancer) -80.26%, SNB-75 (CNS Cancer) -27.19%, OVCAR-4 (Ovarian Cancer) -28.76%, 786-0 (Renal Cancer) -0.99%, TK-10 (Renal Cancer) -20.94%, HS 578T (Breast Cancer) -1.72%.

Проведено поглиблене тестування сполуки **3.8** в п'яти концентраціях. Структура **3.8** характеризується високою активністю в мікромольному діапазоні. Найнижчі значення GI₅₀ (<1 μM) зареєстровані для OVCAR-4 (0.382 μM), SR (лімфома, 0.676 μM), 786-0 (0.696 μM), A498 (0.528 μM) та BT-549 (0.666 μM), що відповідає рівню потенційних протипухлинних агентів. Значення LC₅₀ також підтвердили здатність сполуки **3.8** індукувати загибель пухлинних клітин.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [156]

РОЗДІЛ 4

СИНТЕЗ 3-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ ТІОПІРАНО-ТІАЗОЛУ ТА ІЗОТІОХРОМЕНО-ТІАЗОЛУ

Структури, що містять у своїй будові піразоліновий фрагмент, широко описані в літературних джерелах як молекули, здатні проявляти виражену протипухлинну активність з різними типами механізму дії [171-175]. Для цього класу сполук було показано здатність індукувати апоптоз, порушувати клітинний цикл, впливати на редокс-гомеостаз клітин, а також взаємодіяти з ключовими сигнальними шляхами, задіяними у проліферації та виживанні пухлинних клітин. Завдяки такому різноманіттю біологічних ефектів піразоліновий фрагмент розглядається як перспективний фармакофор у дизайні нових протипухлинних агентів.

У попередніх наших дослідженнях було встановлено, що характер замісника в положенні 3 тiazолідинового циклу відіграє визначальну роль у формуванні фармакологічного профілю молекули, зокрема впливає на інтенсивність та спектр біологічної активності, а також на селективність дії щодо пухлинних клітин. Зміна природи та просторових характеристик замісника дозволяла цілеспрямовано модулювати фізико-хімічні властивості сполук, такі як ліпофільність, електронна густина та конформаційна гнучкість, що, у свою чергу, відображалось на їх взаємодії з біологічними мішенями.

Продовжуючи тематику наших досліджень і спираючись на отримані раніше результати, у цій роботі ми поставили за мету об'єднати тіопірановий, тiazольний та піразольний фрагменти в межах однієї молекули з метою підвищення фармакологічного потенціалу синтезованих сполук за рахунок поєднання кількох фармакофорних елементів. Такий підхід відповідає сучасним концепціям поліфармакології та дизайну мультифункціональних малих молекул, здатних одночасно взаємодіяти з кількома біологічними мішенями.

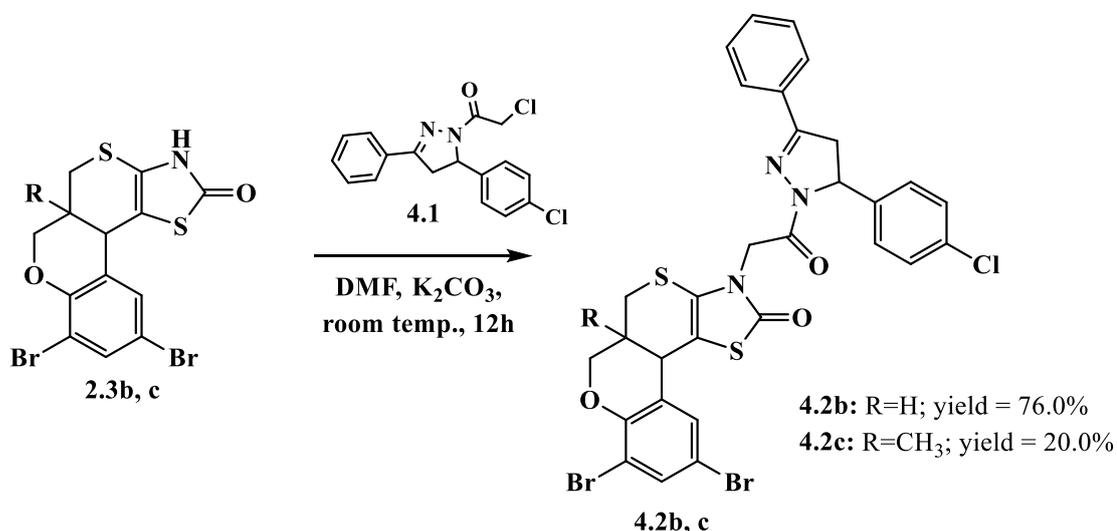
В якості алкілюючих агентів нами були обрані похідні 2-хлор-1-(3,5-дифеніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)етан-1-ону, 3-хлор-1-(3,5-дифеніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)пропан-1-ону та 4-хлор-1-(3,5-дифеніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)бутан-1-ону. Використання зазначених реагентів дало змогу варіювати довжину

алкільного лінкера між тiazолідиновим і піразоліновим фрагментами, що забезпечило додаткове структурне різноманіття синтезованих молекул та створило передумови для подальшого дослідження залежностей «структура-активність» у цій серії сполук.

4.1 Синтез тіопірано-тіазолів з 1-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)етан-1-оновим замісником

Наші базові каркаси 8,10-дибромо-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **2.3b** та 8,10-дибромо-5а-метил-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-он **2.3c** були використані для подальшої структурної модифікації. 2-хлоро-1-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)етан-1-он **4.1** вступав в реакцію алкілювання з сполуками **4.2b** та **4.2c** з утворенням відповідних 3-заміщених похідних 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.2b** та 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-5а-метил-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.2c**.

Схема 4.1. Схема синтезу 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.2b** та 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-5а-метил-3,5а,6,11*b*-тетрагідро-2*H*,5*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.2c**



В якості реакційного середовища використовували диметилформамід та основу калію карбонат для депротонування -NH нуклеофільного центру в положенні 3 тіазолідинового циклу, реакція протікала за кімнатної температури, при постійному перемішуванні протягом 12 годин. Після закінчення реакції у реакційну суміш додавали воду, перемішували та відфільтровували продукт реакції, в подальшому висушували та перекристалізовували DMF/EtOH (1:2).

Одержані сполуки **4.2b** та **4.2c** ідентифіковано на основі елементного аналізу та спектрів LC-MS та ¹H ЯМР.

Таблиця 4.1. Фізико-хімічні параметри сполук **4.2b** та **4.2c**

Сполука	Вихід, %	Т _{пл} , °C	Брутто-формула	Вираховано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.2 b	76.0	171-173	C ₃₀ H ₂₂ Br ₂ Cl N ₃ O ₃ S ₂	49.23	3.03	5.74	49.25	3.05	5.77
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ, ppm: 7.87-7.80 (m, 2H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.54-7.43 (m, 3H, Ar), 7.45 (s, 1H, Ar), 7.43-7.34 (m, 2H, Ar), 7.29-7.22 (m, 2H, Ar), 5.59 (dd, J = 11.2, 4.4 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.96 (d, J = 17.3 Hz, 1H, CH ₂), 4.87 (d, J = 17.3 Hz, 1H, CH ₂), 4.52-4.59 (m, 1H, CH-11b), 4.15 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 6-CH ₂), 4.01-4.09 (m, 1H, 6-CH ₂), 3.93 (dd, J = 17.8, 12.3 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.51-3.42 (m, 1H, 5-CH ₂), 3.25-3.16 (m, 2H, CH ₂ pyrazole, 5-CH ₂), 2.77 (br.s, 1H, 5a-CH). LCMS (ESI+) m/z: 733,0 (M +H) ⁺ .							
4.2 c	20.0	160-162	C ₃₁ H ₂₄ Br ₂ Cl N ₃ O ₃ S ₂	49.92	3.24	5.63	49.95	3.27	5.67
	Спектри ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ, ppm: 7.88-7.70 (m, 3H, Ar), 7.54-7.43 (m, 4H, Ar), 7.40-7.31 (m, 2H, Ar), 7.29-7.18 (m, 2H, Ar), 5.56 (dd, J = 11.2, 4.4 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.98 (d, J = 17.3 Hz, 1H, CH ₂), 4.89 (d, J = 17.3 Hz, 1H, CH ₂), 4.51-4.58 (m, 1H, CH-11b), 4.15 (t, J = 10.3 Hz, 1H, 6-CH ₂), 4.01-4.09 (m, 1H, 6-CH ₂), 3.94 (dd, J = 17.8, 12.3 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.24-3.03 (m, 3H), 1.06 (s, 3H, CH ₃). LCMS (ESI+) m/z: 747,0 (M +H) ⁺ .							

Синтезовані 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **4.2b** та 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-5a-метил-3,5a,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено-[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **4.2c** є порошками жовтого кольору, не розчинними в етанолі, ацетонітрилі та діоксані, розчинними в оцтовій кислоті та ДМФ при

нагріванні. Очищення сполук відбувалось методом перекристалізації в суміші розчинників DMF/EtOH (1:2).

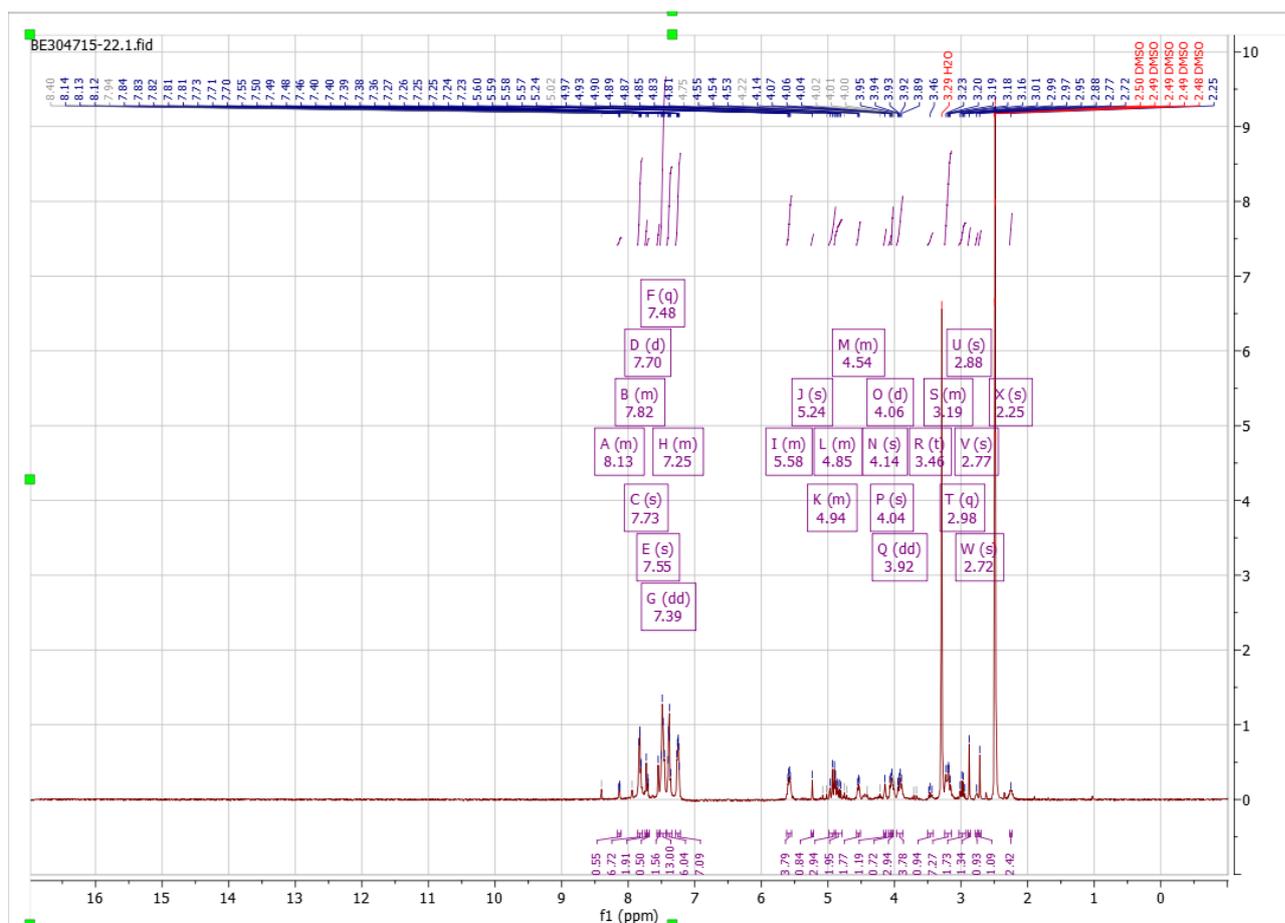


Рис. 4.1. Спектр ^1H ЯМР 8,10-дибромо-3-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]-тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.2b**

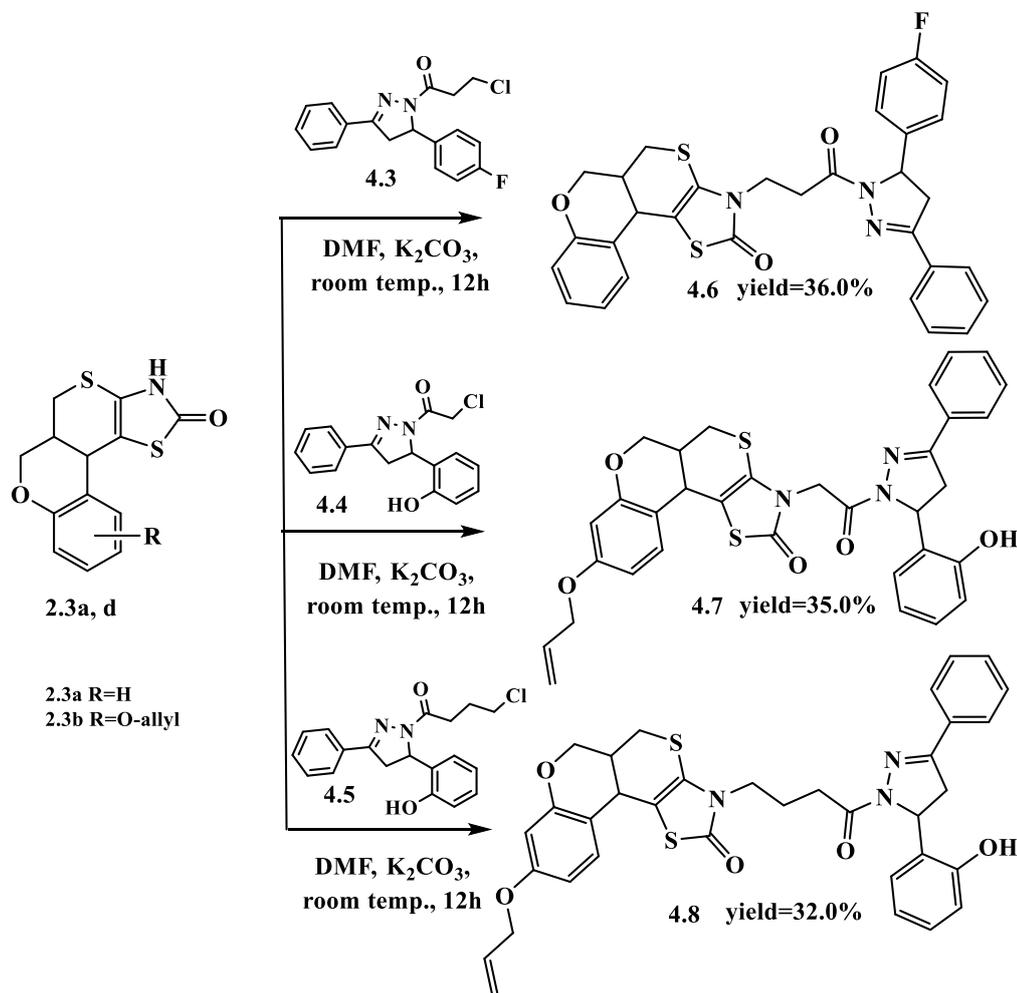
4.2 Синтез 3-(3-(5-(4-фторфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-3-оксопропіл)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону та 3-(4-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-4-оксобутил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону

Для синтезу цільових сполук 3-(3-(5-(4-фторфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-3-оксопропіл)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.6**, 9-(алілокси)-3-(2-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено [4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.7** та 9-(алілокси)-3-(4-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-4-оксобутил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-

хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.8** ми використовували вихідний тіопірано-тіазол **2.3a**, який вводили в реакцію з 3-хлоро-1-(5-(4-фторфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)пропан-1-оном **4.3**, 2-хлоро-1-(5-(2-гідрокси)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етан-1-оном **4.4** та 4-хлоро-1-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)бутан-1-оном **4.5**.

Як і в попередньому випадку реакція перебігала в середовищі диметилформаміду та калію карбонату, з подальшим виділенням та очищенням продуктів реакції. Подовження карбонового ланцюга замісника в 3-положенні тіазолідинового циклу в похідних **4.6** та **4.8** зумовлює підвищення конформаційної гнучкості молекули, що супроводжується зростанням кількості доступних конформацій. Збільшення конформаційної свободи потенційно сприяє кращій адаптації ліганду до просторових особливостей активних центрів біомішеней, що, у свою чергу, може позитивно позначатися на ефективності зв'язування з рецепторами.

Схема 4.2. Схема синтезу похідних **4.6-4.8**



Структура синтезованих похідних підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS, ¹H ЯМР.

Таблиця 4.2. Фізико-хімічні параметри сполук 4.6-4.8

Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.6	36.0	225-227	C ₃₁ H ₂₆ FN ₃ O ₃ S ₂	63.13	4.58	7.35	63.15	4.61	7.38
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H ЯМР (400 MHz, DMSO-d ₆): 7.79–7.63 (m, 2H, Ar), 7.57–7.33 (m, 5H, Ar), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.18–6.95 (m, 4H, Ar), 6.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 5.53 (dd, J = 11.5, 4.7 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.28 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.15–4.05 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.96 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CO), 3.79–3.91 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.48 (d, J = 13.5 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.23 (dd, J = 13.5, 5.7 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.10 (dd, J = 16.9, 4.8 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.89 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH ₂ , CH ₂ -CH ₂ -CO), 2.74 (br.s, 1H, 5a-CH). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 572,0 ([M+H] ⁺).							
4.7	35.0	167-169	C ₃₃ H ₂₉ N ₃ O ₅ S ₂	64.79	4.78	6.87	64.81	4.82	6.89
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	1H-NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 10.82 (br.s, 1H, OH), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.41–7.21 (m, 6H, Ar), 7.15–6.83 (m, 2H, Ar), 6.67–6.48 (m, 3H, Ar). 5.56 (dd, J = 11.5, 4.7 Hz, 1H, CH pyrazole), 5.90–5.79 (m, 1H, CH allyl), 5.33–5.19 (m, 2H, =CH ₂ allyl), 4.56 (s, 2H, CH ₂ -CO), 4.42 (d, J = 5.6 Hz, 2H, -CH ₂ - allyl), 4.31 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.13–4.04 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.77–3.90 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.49 (d, J = 13.5 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.19 (dd, J = 13.5, 5.7 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.08 (dd, J = 16.9, 4.8 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.72 (br.s, 1H, 5a-CH). LCMS (ESI ⁺) m/z: 612,0 ([M+H] ⁺).							
4.8	32.0	200-202	C ₃₅ H ₃₃ N ₃ O ₅ S ₂	65.71	5.20	6.57	65.73	5.22	6.60
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	1H-NMR (400MHz, DMSO-d ₆ , δ): 10.82 (br.s, 1H, OH), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.41–7.21 (m, 6H, Ar), 7.15–6.83 (m, 2H, Ar), 6.67–6.48 (m, 3H, Ar). 5.56 (dd, J = 11.5, 4.7 Hz, 1H, CH pyrazole), 5.90–5.79 (m, 1H, CH allyl), 5.33–5.19 (m, 2H, =CH ₂ allyl), 4.42 (d, J = 5.6 Hz, 2H, -CH ₂ - allyl), 4.31 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.13–4.04 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.77–3.90 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.68 (t, J = 6.9 Hz, 2H, -CH ₂ -), 3.49 (d, J = 13.5 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.19 (dd, J = 13.5, 5.7 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.08 (dd, J = 16.9, 4.8 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.72 (br.s, 1H, 5a-CH), 2.67 (t, J = 6.9 Hz, 2H, -CH ₂ -), 1.82–2.01 (m, 2H, -CH ₂ -). LCMS (ESI ⁺) m/z: 640,0 ([M+H] ⁺).							

Наявність алільного фрагменту в структурі похідних **4.7** та **4.8** у свою чергу надає можливість подальшої функціоналізації даних каркасів, що в перспективі може позитивно вплинути на фармакологічний профіль молекул.

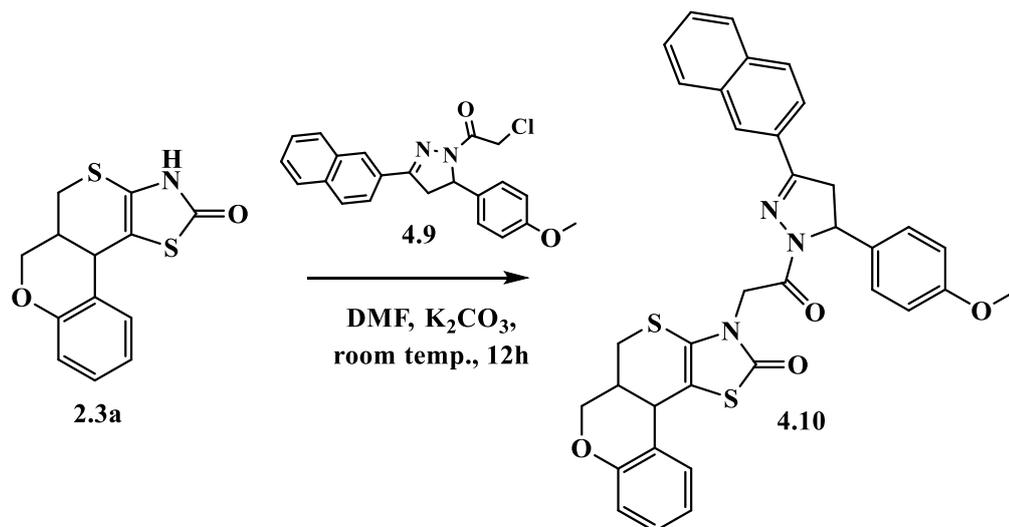
Синтезовані 3-(3-(5-(4-фторфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-3-оксопропіл)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **4.6**, 3-(4-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-4-оксобутил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **4.7** та 9-(алілокси)-3-(4-(5-(2-гідроксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-4-оксобутил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.8** порошки жовтого кольору не розчинні в етанолі, **4.6**, **4.7** - не розчинні в оцтовій кислоті, **4.8** - розчинна в оцтовій кислоті при нагріванні, та всі сполуки розчинні в ДМФА. Очищення сполуки **4.6** проводилось методом перекристалізації в системі розчинників ДМФА/оцтова кислота [1:2], **4.7** - в сисиемі розчинників ДМФА/етанол [1:2], та **4.8** в оцтовій кислоті.

4.3 Синтез цільового похідного 3-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено [4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону з нафталеновим фрагментом у молекулах

Вихідний 3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **2.3а** був апробований в реакції алкілювання з 2-хлоро-1-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етан-1-оном **4.9**, в результаті було одержано 3-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-он **4.10**. Реакція проходила як і в випадку з **4.2b**, **с**, в середовищі диметилформаміду та калію карбонату. Введення до структури молекули жорсткого нафталенового фрагмента призводить до зростання її просторової жорсткості та ароматичності, що потенційно може впливати на конформаційні характеристики, а також на характер і міцність взаємодії з біологічними мішенями.

Синтезоване похідне **4.10** є порошком жовтого кольору розчинним в етанолі, оцтовій кислоті та диметилформаміді. Очищення проводилось методом перекристалізації в етанолі. Структура похідного підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS, ^1H та ^{13}C ЯМР.

Схема 4.3. Схема синтезу 3-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.10**



Таблиця 4.3. Фізико-хімічні параметри 3-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-(нафтален-2-іл)-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-3,5а,6,11b-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.10**

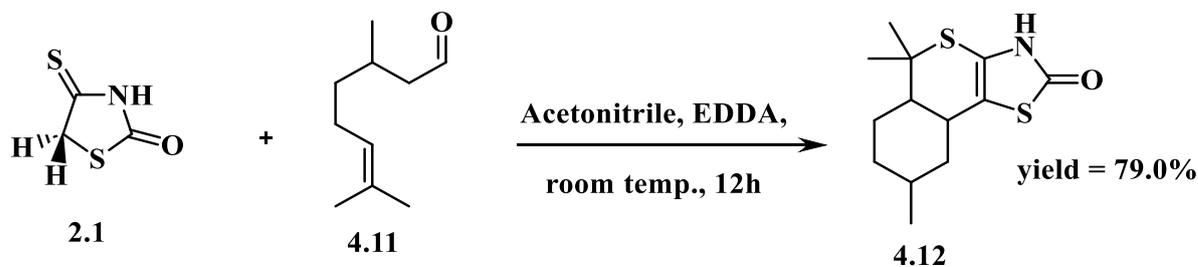
Сполука	Вихід, %	$T_{\text{плав.}}$, °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.10	35.0	153-155	$\text{C}_{35}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$	67.83	4.72	6.78	67.85	4.74	6.81
	Спектри ^1H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ , ppm: 8.25 (br.s, 1H, Ar), 8.09 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 8.03 – 7.90 (m, 3H, Ar), 7.64 – 7.50 (m, 2H, Ar), 7.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.26 – 7.09 (m, 3H, Ar), 7.01 – 6.75 (m, 4H, Ar), 5.57 (dd, $J = 11.1, 4.3$ Hz, 1H, CH pyrazole), 4.90 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H, CH_2), 4.79 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, CH_2), 4.28 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, CH-11b), 4.11–4.01 (m, 2H, 6- CH_2), 3.98 (dd, $J = 17.9, 12.2$ Hz, 1H, CH_2 pyrazole), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.46 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, 5- CH_2), 3.24–3.14 (m, 2H, CH_2 pyrazole, 5- CH_2), 2.73 (br.s, 1H, 5a-CH). LC-MS (ESI $^+$) m/z: 621,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).							

4.4 Синтез 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2Н-ізотіохромено [3,4-*d*]тіазол-2-ону

З метою розширення структурного різноманіття похідних тіопірано-тіазолу було здійснено синтез сполуки **4.12**, що містить ізотіохроменований фрагмент. Ключовою особливістю цієї структури є відсутність ароматичного кільця, що принципово відрізняє її від раніше синтезованих нами тіопірано-тіазольних похідних. Така структурна модифікація створює передумови для проведення порівняльного аналізу зв'язку «структура–активність» (SAR), зокрема з метою оцінки впливу ароматичності та жорсткості молекулярного фрагмента на конформаційні та біологічні властивості досліджуваних сполук.

Для цього 4-тіоксо-2-оксотіазолідинон **2.1** був апробований в реакції Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера з цитронелалем **4.11**. Реакція проходила в середовищі ацетонітрилу та ЕДДА при кімнатній температурі та перемішуванні на магнітній мішалці протягом 12 годин з утворенням відповідного 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2Н-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону **4.12**.

Схема 4.4 Схема синтезу 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2Н-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону **4.12**



Похідне **4.12** було синтезоване за раніше розробленою методикою, та використане нами для подальших хімічних перетворень, усі фізико-хімічні параметри, спектральні аналізи наведено за посиланням [176].

4.5 Синтез 3 заміщених похідних на основі 5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2Н-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону.

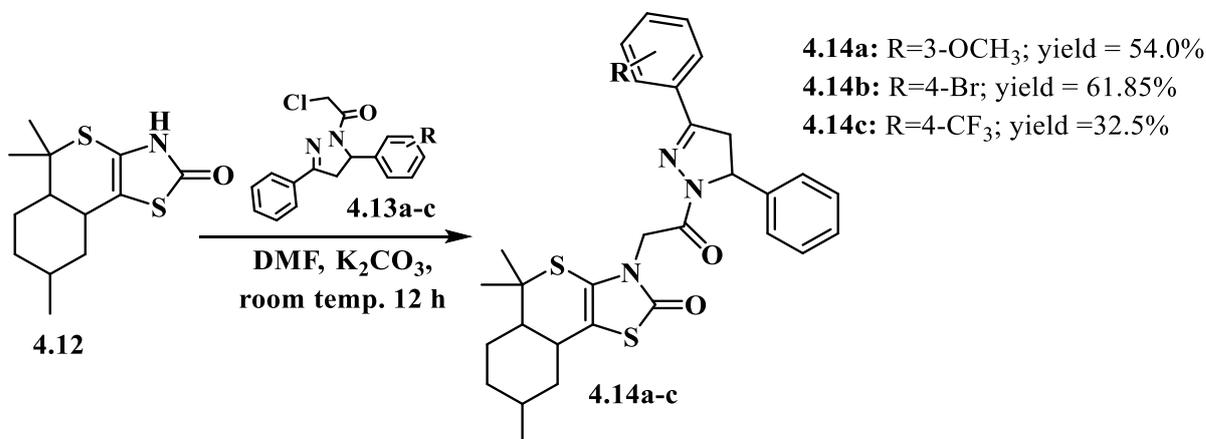
Для синтезу цільових сполук 3-(2-(3-(3-метоксифеніл)-5-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-5,5,8-триметил-3,5,5а,6,7,8,9,9а-октагідро-2Н-ізотіо-

хромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону **4.14a**, 3-(2-(3-(4-бромфеніл)-5-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-5,5,8-триметил-3,5,5a,6,7,8,9,9a-октагідро-2H-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону **4.14b** та 5,5,8-триметил-3-(2-оксо-2-(5-феніл-3-(4-(трифлуорометил)феніл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етил)-3,5,5a,6,7,8,9,9a-октагідро-2H-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-ону **4.14c** ми використовували вище описану сполуку **4.12** та відповідні 2-хлоро-1-(5-(3-метоксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етан-1-он **4.13a**, 1-(5-(4-бромфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-хлоретан-1-он **4.14b** та 2-хлоро-1-(3-феніл-5-(4-(трифлуорметил)феніл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етан-1-он **4.13c**.

Реакція проходила в середовищі диметилформаміду та K₂CO₃ за кімнатної температури та постійному перемішуванні на магнітній мішалці протягом 12 годин.

Синтезовані похідні **4.14a-c** є структурними аналогами наших тіопірано-тіазолів з піразоліновим фрагментом в положенні 3 тіазолідинового циклу та продовженням розвитку тематики наших досліджень сполук даного класу.

Схема 4.5. Схема синтезу ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-2-онів **4.14 a-c**



Синтезовані сполуки є порошками білого кольору, **4.14a** розчинні в етанолі, оцтовій кислоті, ацетонітрилі та диметлформаміді, **4.14b** та **4.14c** - не розчинна в етанолі, розчинна в оцтовій кислоті, ацетонітрилі та диметилформаміді. Очищення сполук проводилось методом перекристалізації: сполука **4.14a** перекристалізувалась в етанолі, **4.14b** - в ацетонітрилі та **4.14c** в суміші розчинників диметилформамід/етанол [1:2].

Структура похідних підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS, ¹H та ¹³C ЯМР.

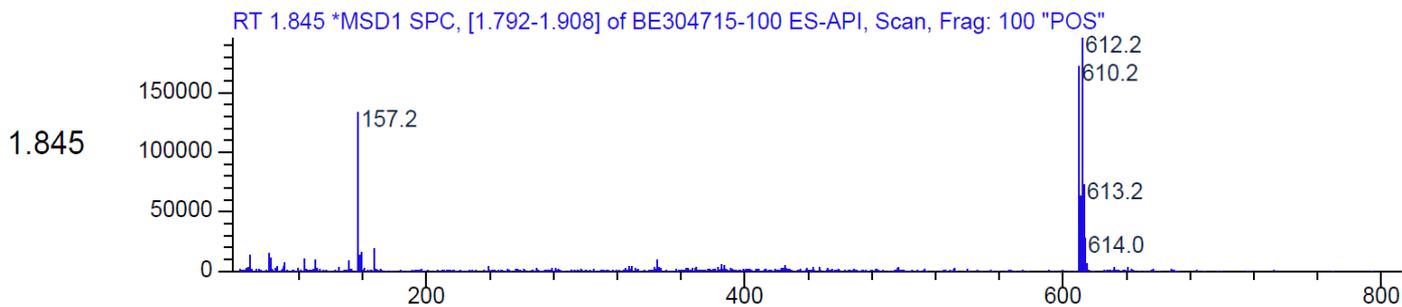


Рис. 4.2. Спектр MS 1-(5-(4-бромофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-хлоретан-1-ону **4.14b**

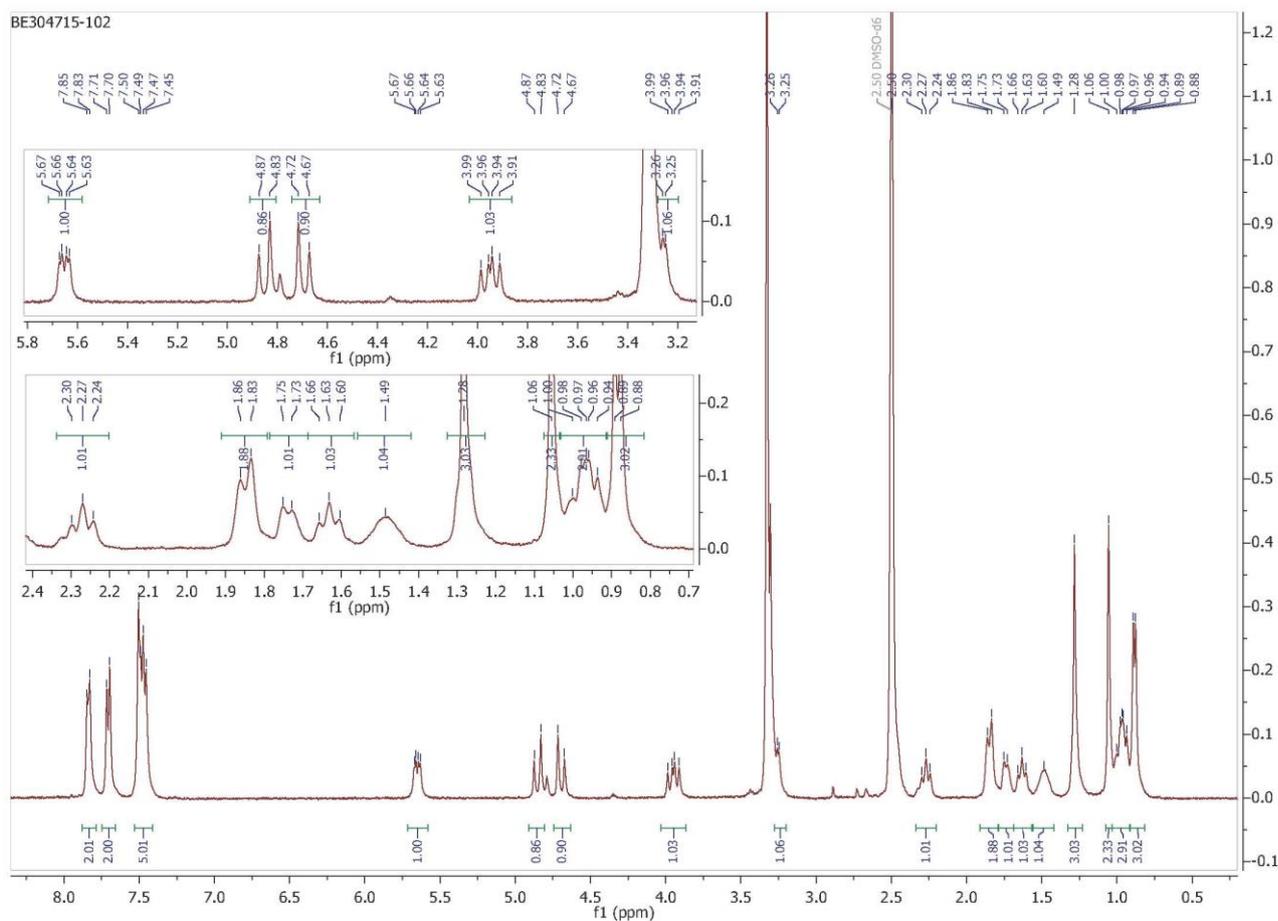


Рис. 4.3. Спектр ^1H ЯМР 5,5,8-триметил-3-(2-оксо-2-(5-феніл-3-(4-(трифлуорометил)феніл)-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етил)-3,5,6а,7,8,9,9а-октагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-2-ону **4.14c**

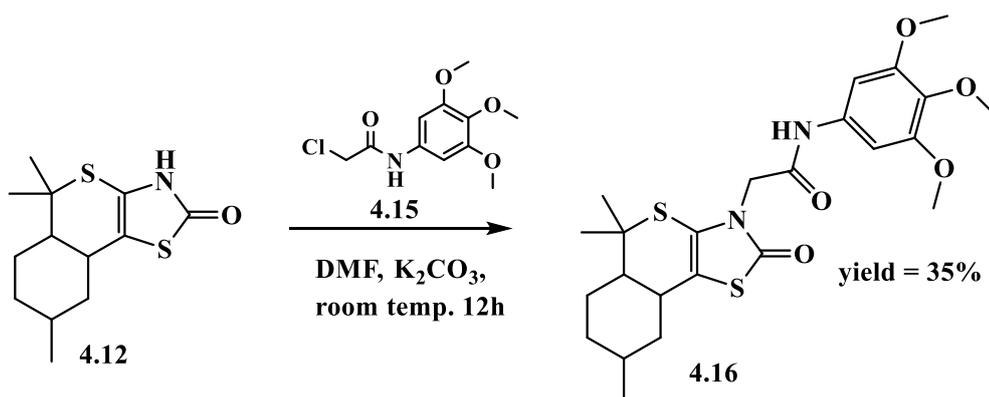
Таблиця 4.4. Фізико-хімічні параметри 4.14 а-с

Спо- лука	Ви- хід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто- формула	Вираховано, %			Знайдено, %		
				С	Н	N	С	Н	N
4.14а	54.07	110- 112	C ₃₁ H ₃₅ N ₃ O ₃ S ₂	66.28	6.28	7.48	66.27	6.29	7.47
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ, ppm: 7.83 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.53 – 7.42 (m, 3H, Ar), 7.25 (t, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 6.86 – 6.70 (m, 3H, Ar), 5.54 (dd, J = 11.2, 5.4 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.88 (d, J = 17.5 Hz, 1H, CH ₂), 4.68 (d, J = 17.5 Hz, 1H, CH ₂), 3.90 (dd, J = 18.1, 11.9 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.73 (s, 3H, OCH ₃), 3.23 – 3.12 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.31 (q, J = 11.8 Hz, 1H), 1.86 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 1.75 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 1.64 (q, J = 11.2 Hz, 1H), 1.51 (br.s, 1H), 1.35 – 1.21 (m, 4H), 1.14 (s, 2H), 1.09 – 0.92 (m, 3H), 0.89 (br.s, 3H). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 563.0 ([M+H] ⁺).							
4.14б	61.85	195- 197	C ₃₀ H ₃₂ BrN ₃ O ₂ S ₂	59.01	5.28	6.88	59.02	5.27	6.89
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ, ppm: 7.79 (d, J = 7.1 Hz, 2H, Ar), 7.52 – 7.41 (m, 5H, Ar), 7.19 – 7.11 (m, 2H, Ar), 5.51 (dd, J = 11.2, 5.4 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.80 (d, J = 17.5 Hz, 1H, CH ₂), 4.63 (d, J = 17.5 Hz, 1H, CH ₂), 3.88 (dd, J = 18.1, 11.9 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.22 – 3.12 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.33 – 2.19 (m, 1H), 1.82 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 1.71 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 1.65 – 1.54 (m, 1H), 1.46 (br.s, 1H), 1.31 – 1.17 (m, 4H), 1.08 (br.s, 2H), 1.01 – 0.89 (m, 3H), 0.85 (d, J = 6.0 Hz, 3H). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 612.2 ([M+H] ⁺).							
4.14с	32.35	209- 211	C ₃₁ H ₃₂ F ₃ N ₃ O ₂ S ₂	62.08	5.38	7.01	62.07	5.39	7.02
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ, ppm: 7.84 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.71 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.54-7.41 (m, 5H), 5.65 (dd, J = 11.1, 4.3 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.85 (d, J = 17.2 Hz, 1H, CH ₂), 4.70 (d, J = 17.3 Hz, 1H, CH ₂), 3.95 (dd, J = 17.9, 12.2 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.28-3.21 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 2.27 (t, J = 11.1 Hz, 1H), 1.85 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 1.74 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 1.63 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 1.49 (br.s, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.06 (br.s, 3H), 1.03 – 0.91 (m, 3H), 0.88 (d, J = 5.6 Hz, 3H). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 600.2 ([M+H] ⁺).							

4.6 Синтез N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-3(5H)-іл)ацетаміду.

Продовжуючи наші синтетичні дослідження, було здійснено синтез N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-3(5H)-іл)ацетаміду **4.16** з використанням базового гетероциклічного каркаса **4.12** та 2-хлоро-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду **4.15** як алкілюючого агента. Синтез проводили за умов, аналогічних до тих, що були застосовані раніше для отримання похідних, які містять піразольний фрагмент у молекулі, що забезпечило коректну порівняльну оцінку реакційної здатності та впливу замісників на перебіг процесу. Реакцію N-алкілювання здійснювали у середовищі диметилформаміду у присутності карбонату калію (K₂CO₃) як основи. Реакційну суміш перемішували на магнітній мішалці при кімнатній температурі протягом 12 годин, що сприяло м'якому перебігу реакції без необхідності додаткового нагрівання. За таких умов цільову сполуку **4.16** було отримано з виходом 35%, що є типовим для алкілювання стерично утруднених амідних фрагментів у конденсованих гетероциклічних системах.

Схема 4.5. Синтез N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-3(5H)-іл)ацетаміду **4.16**



Отримане похідне **4.16** являє собою білий кристалічний порошок, добре розчинний в етанолі, оцтовій кислоті та диметилформаміді, але малорозчинний у неполярних органічних розчинниках. Очищення сполуки проводили методом перекристалізації з етанолу, що дозволило отримати аналітично чистий зразок, придатний для подальших спектроскопічних та біологічних досліджень.

Структура похідного підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS та ^1H ЯМР.

Таблиця 4.5. Фізико-хімічні параметри N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-3(5H)-іл)ацетаміду **4.16**

Сполука	Вихід, %	$T_{\text{плав.}}$, °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.16	35.0	208-210	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$	58.51	6.55	5.69	58.52	6.56	5.68
	Спектри ^1H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ , ppm: 10.25 (s, 1H, NH), 6.93 (s, 2H, Ar), 4.41 (d, J = 17.2 Hz, 1H, CH ₂), 4.27 (d, J = 16.9 Hz, 1H, CH ₂), 3.74 (s, 6H, 2OCH ₃), 3.62 (s, 3H, OCH ₃), 2.34 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 1.88 (s, 2H), 1.76 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 1.66 (t, J = 10.6 Hz, 1H), 1.51 (br.s, 1H), 1.32 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.02 (dq, J = 23.5, 12.0, 10.3 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.0 Hz, 3H). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 493.2 ([M+H] ⁺).							

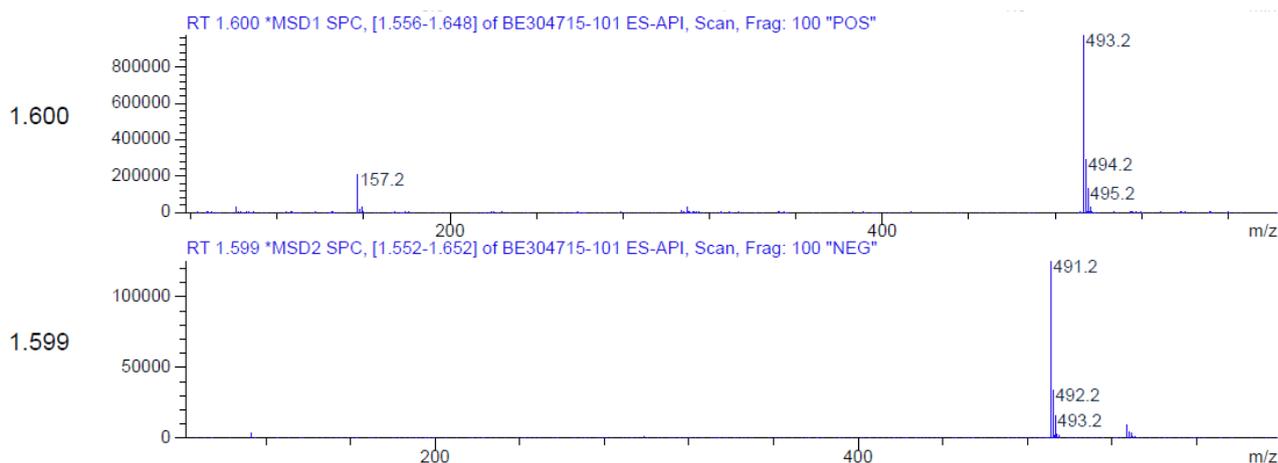


Рис. 4.4. Спектр MS N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2H-ізотіохромено[3,4-d]тіазол-3(5H)-іл)ацетаміду **4.16**

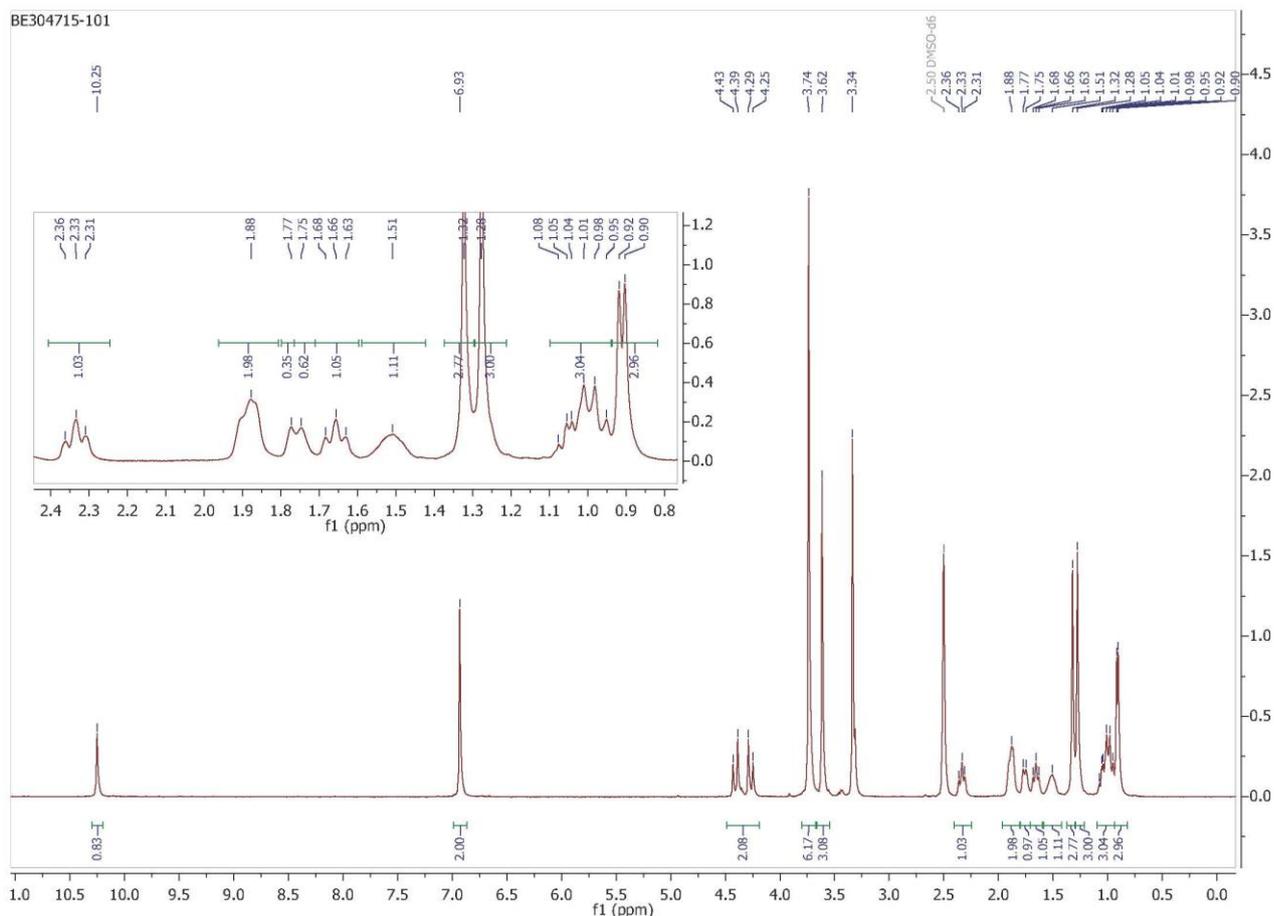


Рис. 4.5. Спектр ^1H ЯМР N-(3,4,5-триметоксифеніл)-2-(5,5,8-триметил-2-оксо-5а,6,7,8,9,9а-гексагідро-2Н-ізотіохромено[3,4-*d*]тіазол-3(5Н)-іл)ацетаміду **4.16**

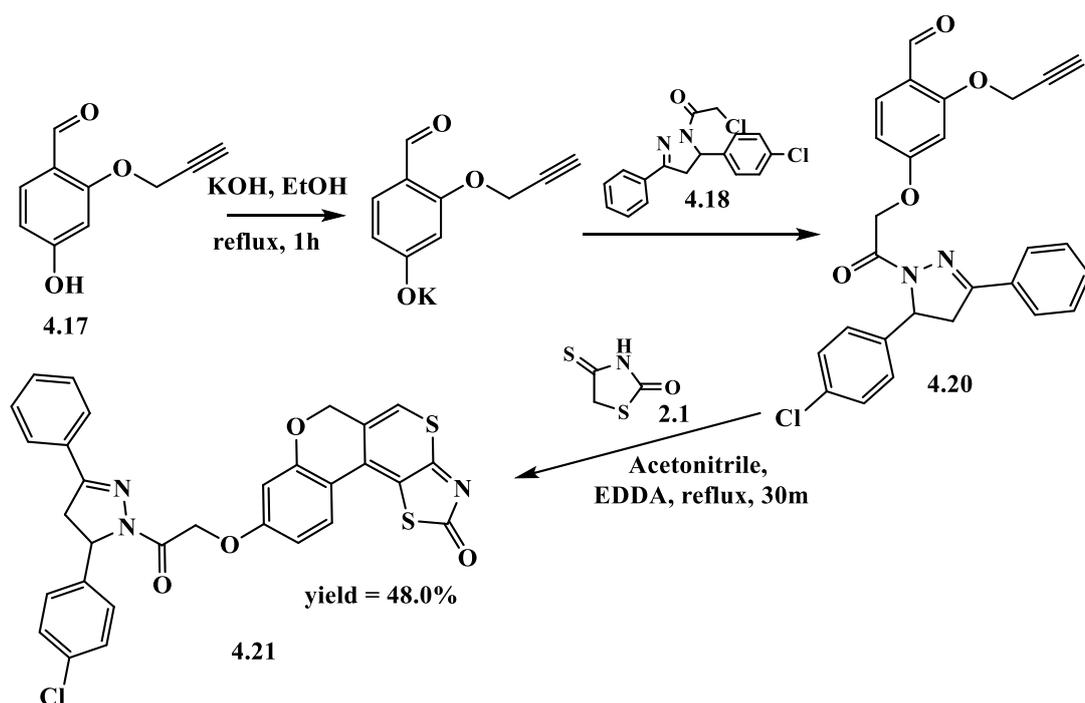
4.7. Синтез 9-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2Н,6Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону

В продовження наших досліджень нами було здійснено спробу функціоналізації положення 9 ароматичного циклу, щоб продемонструвати потенціал структурної різноманітності даного класу сполук. На відміну від попередніх методів синтезу в яких першочерговим було утворення конденсованих тіопірано-тіазолів шляхом проведення реакції доміно-Кньовенагеля-гетеро-Дільса-Альдера та подальшої функціоналізації нуклеофільного центру тіазолідинового циклу, в цьому методі ми змінили підхід до проведення даних хімічних перетворень.

Першим етапом була модифікація структури 4-гідрокси-2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегіду **4.17**, для цього ми вводили його в реакцію з 2-хлор-1-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)етан-1-оном **4.18**. Реакція

проходила через стадію утворення калійної солі нашого альдегіду, в якості реакційного середовища виступав етанол. Після 2 годин синтезу утворилось похідне **4.20** 4-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегід, який очищували методом перекристалізації з оцтової кислоти.

Схема 4.6. Схема синтезу 9-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1Н-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2Н,6Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону **4.21**



Другим етапом була реакція доміно-Кньовенагеля-гетеро-Дільса -Альдера між **4.20** та ізороданіном **2.1** в середовищі ацетонітрилу та EDDA в результаті чого ми одержали наш цільовий продукт **4.21**. Дане хімічне перетворення відкриває перед нами потенціал хімічної гнучкості та можливості функціоналізації даного класу сполук, як потенційних агентів з широким спектром біологічної активності.

Синтезоване похідне є кристалічним порошком жовтого кольору не розчинним в етанолі, оцтовій кислоті та розчинним в диметилформаміді при нагріванні. Очищення даної сполуки проводилось методом перекристалізації в суміші розчинників ДМФ\етанол (1:2). Структура похідного підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS, ^1H та ^{13}C ЯМР.

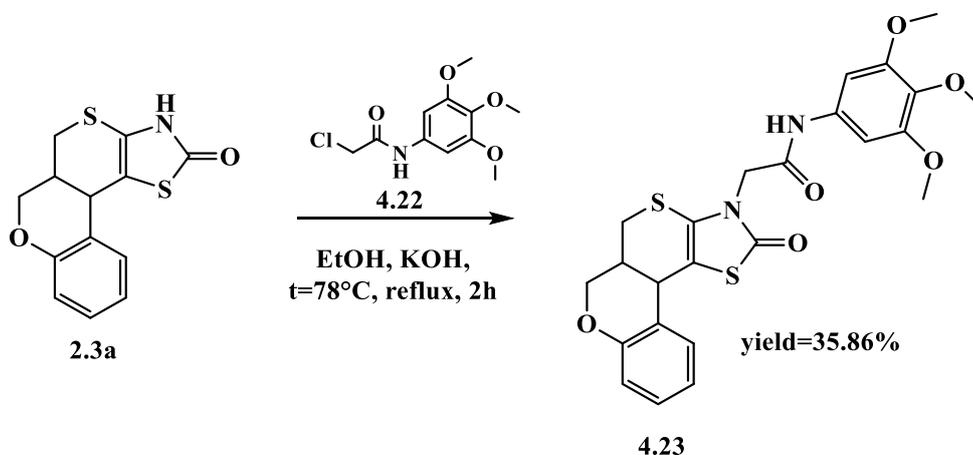
Таблиця 4.6. Фізико-хімічні параметри 9-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано-[2,3-d]тіазол-2-ону **4.21**

Сполука	Вихід, %	T _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вирахувано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.21	48.0	257-259	C ₃₀ H ₂₀ ClN ₃ O ₄ S ₂	61.48	3.44	7.17	61.47	3.43	7.16
	Спектри ¹ H ЯМР, σ (м.ч.), J (Гц); LC-MS, m/z	¹ H ЯМР (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): 8.33 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Ar), 8.03 (dd, J = 9.0, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.76–7.67 (m, 2H, Ar), 7.47–7.39 (m, 3H, Ar), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar), 7.24 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar), 6.95 (ddd, J = 9.0, 2.6, 1.5 Hz, 1H, Ar), 6.80 (dd, J = 2.6, 1.6 Hz, 1H, -CH=), 5.53 (dd, J = 11.5, 4.7 Hz, 1H, CH pyrazole), 4.95–4.90 (m, 2H, -CH ₂ -), 4.77 (br.s, 2H, -CH ₂ -), 3.81–3.90 (m, 1H, CH ₂ pyrazole), 3.17 (dd, J = 16.9, 4.8 Hz, 1H, CH ₂ pyrazole). LC-MS (ESI ⁺) m/z: 586,0 ([M+H] ⁺).							

4.8. Синтез цільового 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду.

Вихідна сполука **2.3a** була введена в реакцію алкілювання з 2-хлоро-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетамідом **4.22**, в результаті чого було синтезовано 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетамід **4.23**.

Схема 4.7. Схема синтезу 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2H,5H-хромено [4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду **4.23**



Реакція проходила в середовищі спиртового розчину калію гідроксиду при температурі кипіння розчинника 78°C. Реакція тривала 2 години після початку

закипання розчинника, далі реакційну суміш охолоджували, продукт відфільтровували, сушили та очищували. Синтезоване похідне є кристалічним порошком білого кольору не розчинним в етанолі, оцтовій кислоті, розчинним в диметилформаміді при нагріванні. Очищення даної сполуки проводилось методом перекристалізації в суміші розчинників ДМФ\етанол, [1:2].

Структура похідного підтверджена методами елементного аналізу та спектрів LC-MS, ^1H та ^{13}C ЯМР.

Таблиця 4.7. Фізико-хімічні параметри 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2Н,5Н-хромено [4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду **4.23**

Сполука	Вихід, %	Т _{плав.} , °C	Брутто-формула	Вираховано, %			Знайдено, %		
				C	H	N	C	H	N
4.23	35.86	212-214	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₆ S ₂	57.59	4.83	5.60	57.58	4.82	5.59
	Спектри ^1H ЯМР, σ (м.ч.), <i>J</i> (Гц); LC-MS, <i>m/z</i>	^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ , ppm: 10.29 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar), 7.18 (t, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz, Ar), 6.99 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar), 6.93 (s, 2H, Ar), 6.83 (d, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz, Ar), 4.42 (d, <i>J</i> = 17.2 Hz, 1H, CH ₂), 4.29 (d, <i>J</i> = 17.0 Hz, 1H, CH ₂), 3.63 (s, 3H, OCH ₃), 3.78 (s, 6H, 2OCH ₃), 4.25 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H, CH-11b), 4.14–4.04 (m, 2H, 6-CH ₂), 3.46 (d, <i>J</i> = 13.5 Hz, 1H, 5-CH ₂), 3.26 (dd, <i>J</i> = 13.5, 5.7 Hz, 1H, 5-CH ₂), 2.73 (br.s, 1H, 5a-CH). LC-MS (ESI ⁺) <i>m/z</i> : 501,2 ([M+H] ⁺).							

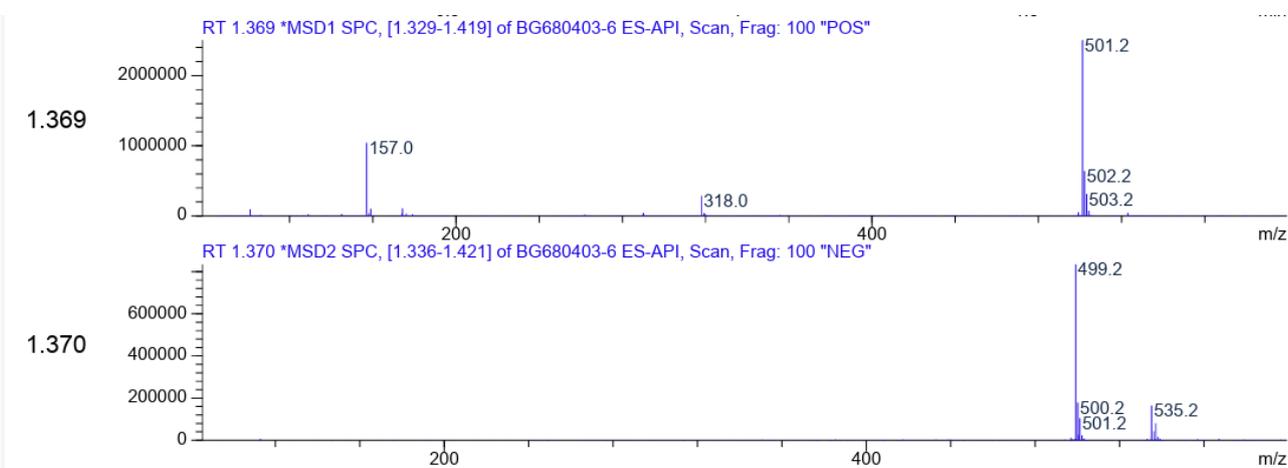
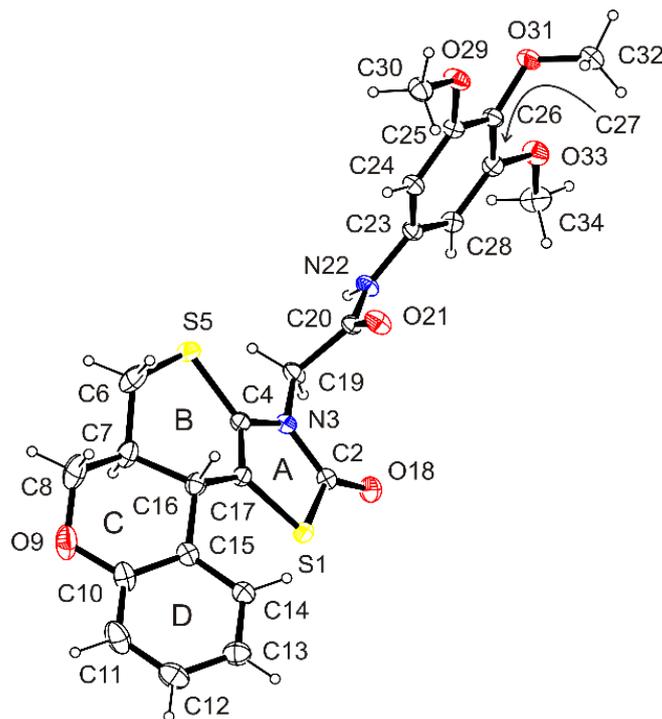


Рис. 4.6. Спектр MS 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду **4.23**

4.8.1. Рентгеноструктурне дослідження 2-(2-оксо-5а,11b-дигідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-3(6Н)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)-аце-таміду.

На основі рентгеноструктурного аналізу структура сполуки **4.23**, раніше встановлена спектроскопічними методами (^1H та ^{13}C ЯМР), була підтверджена як *rel*-(5aSR,11bSR)-2-[2-оксо-(3,5a,6,11b)-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазолін-3-іл]-N-(3,4,5-триметоксифеніл) ацетамід.



$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$, $M_{\text{cz}} = 500.57$, monoclinic system, space group $P2_1/c$, $a = 4.9700(2)$, $b = 25.7192(11)$, $c = 17.8140(6)$ Å, $a = 90$ $b = 92.049(4)$, $g = 90^\circ$, $V = 2275.61(15)$ Å³, $Z = 4$ ($Z' = 1$), $d_x = 1.461$ Mg m⁻³, $m(\text{MoK}\alpha) = 2.511$ mm⁻¹, $T = 293(2)$ K, $q = 76.62^\circ$, number of independent reflections 7433, number of observed [$I > 2s(I)$] reflections 5266, $wR(F^2) = 0.1327$, $R[F^2 > 2s(F^2)] = 0.0477$, $S = 0.919$

Рисунок 4.7 ORTEP-зображення просторової структури сполуки **4.23** разом із деякими кристалографічними даними.

Молекули досліджуваної сполуки містять жорстку тетрациклічну систему 2-оксо-(3,5a,6,11b)-тетрагідро-2Н,5Н-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3*d*][1,3]тіазолу із «зімкнутими» внутрішніми шестичленними кільцями дигідротіопірану та дигідропірану (рис. 4.7). Перше має викривлену конформацію «конверта» (параметри Кремера-Попла [177]: $Q = 0.569(4)$ Å, $\theta = 122.4(3)^\circ$, $\phi = 50.0(4)^\circ$), тоді

як друге має викривлену конформацію напівкрісло (параметри: $Q = 0.466(4) \text{ \AA}$, $\theta = 133.9(5)^\circ$, $\varphi = 259.6(6)^\circ$). Кільця дигідротіопірану та дигідропірану з'єднані за типом *cis*-декаліну, а між їхніми площинами найменших квадратів утворюється двогранний кут $21.46(14)^\circ$. Атоми Гідрогену при стереогенних центрах C7 та C16, спільних для обох кілець, займають аксіальне положення щодо кожного кільця. Водночас пара H(-C7) та H(-C16) перебуває в антиперипланарній (ap) конформації. Торсійний кут H7-C7-C16-H16 становить 165° . Довжина зв'язку C4-C17, рівна $1.350(4) \text{ \AA}$, підтверджує наявність подвійного зв'язку між цими атомами в тетрациклічному фрагменті молекули (рис. 4.9). Літературне значення довжини подвійного зв'язку C=C становить $1.331(1) \text{ \AA}$ [178].

Плоска ацетамідна група (C19, C20, O21 та N22) утворює двогранні кути $88.39(9)$ та $44.80(11)^\circ$, відповідно, з площинними системами тiazолін-2-ону та фенільного фрагмента (C23 \rightarrow C28). Водночас карбонільна група (C20=O21) перебуває в синперипланарній конформації щодо зв'язків C19-N3 та N22-C23. Торсійні кути N3-C19-C20-O21 та O21-C20-N22-C23 дорівнюють відповідно $-13.3(4)^\circ$ та $-6.3(4)^\circ$.

Таблиця 4.8 Геометрія водневих зв'язків (\AA , $^\circ$) для сполуки **4.23**.

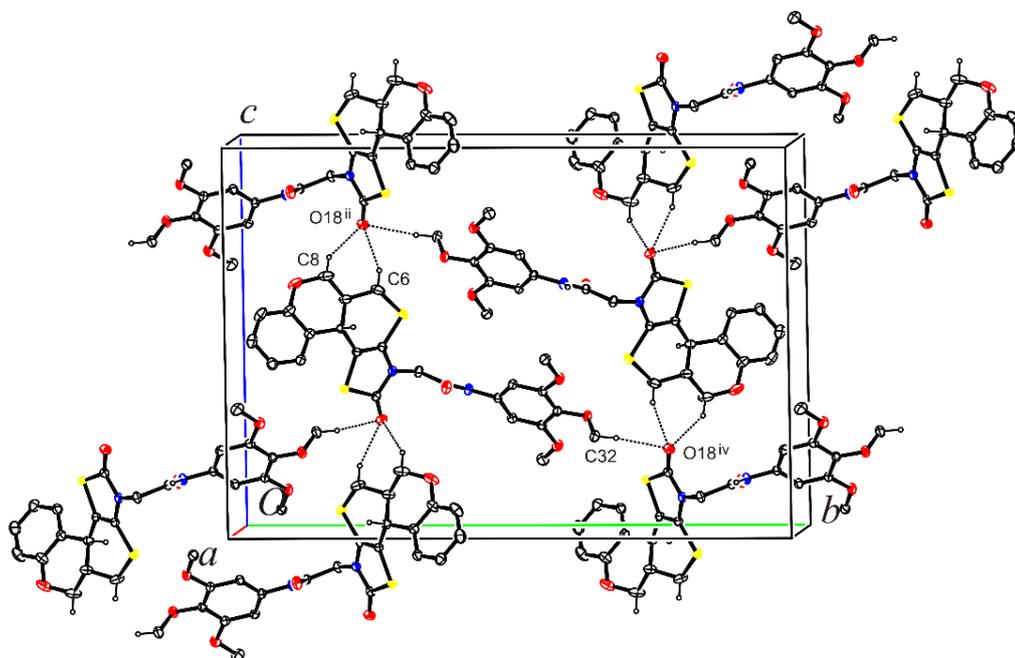
Міжмолекулярні зв'язки	Донор-Н (\AA)	Н \cdots Акцепт ор (\AA)	Донор \cdots Акц ептор (\AA)	Донор- Н \cdots Акцептор ($^\circ$)
N22-H22 \cdots O21 ⁱ	0.87(3)	2.06(3)	2.902(3)	165(3)
C6-H6B \cdots O18 ⁱⁱ	0.97	2.39	3.311(4)	158
C8-H8B \cdots O18 ⁱⁱ	0.97	2.59	3.454(5)	148
C16-H16 \cdots S5 ⁱⁱⁱ	0.98	2.78	3.754(3)	175
C32-H32C \cdots O18 ^{iv}	0.96	2.53	3.444(4)	159

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

У кристалічній решітці молекули **4.23** утворюють двовимірні шари, розташовані паралельно площині *bc*, завдяки чотирьохцентровим водневим

зв'язкам C6-H6B...O18², C8-H8B...O18², C32-H32C...O18⁴ (табл. 4.8, рис. 4.8 а), у яких беруть участь три протон-донори та один протон-акцептор. Сусідні шари, які пов'язані трансляцією вздовж осі *a*, додатково сполучаються водневими зв'язками N22-H22...O21¹ та C16-H16...S5³ у тривимірну мережу водневих зв'язків (табл. 4.8, рис. 4.8b).

a)



b)

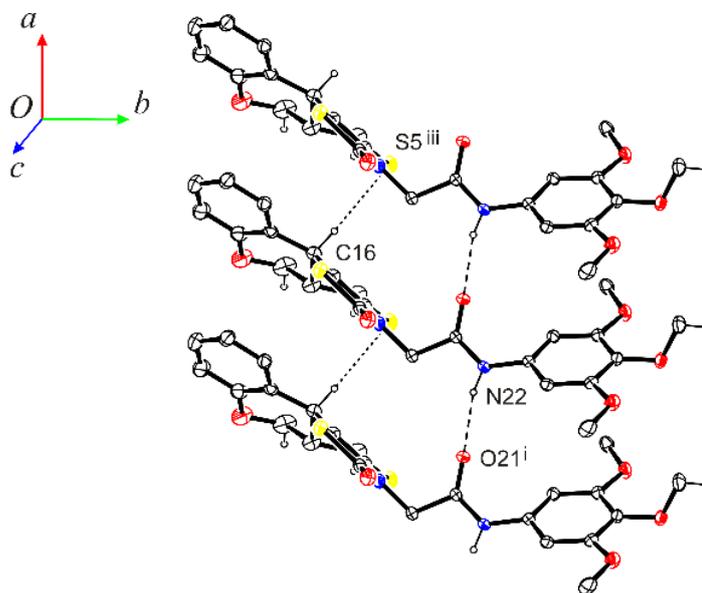


Рисунок 4.8. Водневі зв'язки (а, б) у кристалічній ґратці сполуки **4.23**. Атоми Гідрогену, які не беруть участі у водневих зв'язках, опущено для наочності.

4.9. Комплексний аналіз ^1H ЯМР та РСА як основа структурної діагностики та пояснення діастереотопності метиленових протонів $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ фрагмента.

Для детальнішого вивчення будови синтезованих продуктів **4.2b,c**, **4.6-4.8**, **4.10**, **4.14a-c**, **4.15**, **4.21**, **4.23** ключову роль відіграв аналіз їх ^1H ЯМР спектрів, які вже на початковому етапі надали важливу інформацію про просторову організацію молекул. Для прикладу у ^1H ЯМР спектрах тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних **4.2b,c**, **4.6-4.8**, **4.10**, **4.14a-c**, **4.15**, **4.21**, **4.23** сигнал метиленової групи фрагмента $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ проявляється не у вигляді одного синглету, як це було б очікувано для ізольованої метиленової групи, а як два взаємно розщеплені дублети, що формують характерну АВ-систему з виразним ефектом «даху». Зокрема, для сполуки **4.14c** сигнали метиленової групи $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ проявляються у вигляді двох дублетів при δ 4.85 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H) та δ 4.70 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), тоді як у спектрі сполуки **4.16** відповідні сигнали спостерігаються при δ 4.41 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H) та δ 4.27 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H). Великі значення гемінальної константи спінової взаємодії ($^2J_{\text{NH}} \approx 17$ Hz) є типовими для N-метиленових фрагментів і однозначно свідчать про магнітну нееквівалентність протонів H_α і H_β . Водночас відносно невелика різниця їх хімічних зсувів ($\Delta\delta$) зумовлює перехід системи у режим другого порядку (AB), що експериментально проявляється характерним перерозподілом інтенсивностей сигналів та ефектом «даху». Для сполуки **4.14c** два сигнали метиленових протонів фіксуються при δ 4.85 та 4.70 ppm, що відповідає різниці хімічних зсувів $\Delta\delta \approx 0.15$ ppm. Для спектрометра з робочою частотою 400 МГц це еквівалентно $\Delta\nu \approx 60$ Гц. За умови великої гемінальної константи спінової взаємодії $^2J_{\text{NH}} \approx 17.2-17.3$ Гц, співвідношення $\Delta\nu/^2J_{\text{NH}} \approx 3.5$ є характерним для перехідного режиму між системами першого та другого порядку, у якому вже чітко проявляється ефект «даху». Це добре узгоджується з експериментально спостережуваним нахилом інтенсивностей дублетів на наведеному спектральному фрагменті (Рис. 4.9.). Для сполуки **4.16** відповідні сигнали метиленової групи розташовані при δ 4.41 та 4.27 ppm, що дає $\Delta\delta \approx 0.14$ ppm, або $\Delta\nu \approx 56$ Гц при 400 МГц. Значення гемінальної константи $^2J_{\text{NH}} \approx 16.9-$

17.2 Гц практично збігається з таким для **4.14с**, а співвідношення $\Delta\nu/{}^2J_{\text{HH}} \approx 3.2\text{--}3.3$ знову відповідає АВ-системі другого порядку. На спектрі це проявляється подібним перерозподілом інтенсивностей ліній і добре вираженим «дахом» (Рис.4.9.). Таким чином, для обох сполук різниця хімічних зсувів між протонами H_a і H_b є відносно невеликою ($\Delta\delta \approx 0.14\text{--}0.15$ ppm), але водночас порівнянною за величиною з гемінальною константою ${}^2J_{\text{HH}}$, що є ключовою умовою формування АВ-системи з ефектом «даху». Візуально зафіксований на спектрах нахил внутрішніх і зовнішніх ліній підтверджує, що система перебуває у режимі другого порядку, а не є простим набором незалежних дублетів.

Отримані значення $\Delta\delta$ та ${}^2J_{\text{HH}}$ переконливо підтверджують стійку діастереотопність метиленових протонів у фрагменті $\text{--N--CH}_2\text{--C(O)--}$, що зумовлена амідоподібним резонансом та обмежена конформаційна рухливість цього фрагмента навколо зв'язку --C(O)--N-- . Таким чином, кількісний аналіз $\Delta\delta$ у поєднанні з візуальними особливостями спектрів слугує прямим спектроскопічним доказом обмеженої конформаційної рухливості цього фрагмента та повністю узгоджується з наведеним структурним обґрунтуванням.

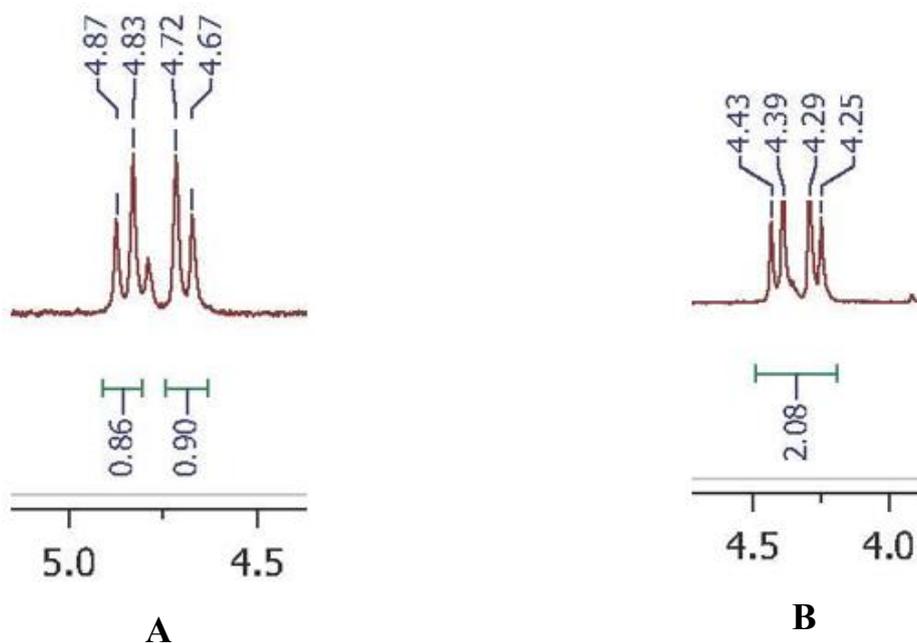


Рисунок 4.9. АВ-система сигналів протонів ізольованої метиленової групи фрагмента $\text{--N--CH}_2\text{--C(O)--}$ у ¹H ЯМР спектрах тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних **4.14с** (А) та **4.16** (В).

Особливо показовими в цьому контексті є дані рентгеноструктурного аналізу структурно спорідненої сполуки **4.23**, які демонструють, що плоска ацетамідна група (C19, C20, O21, N22) утворює значні двогранні кути $88.39(9)^\circ$ та $44.80(11)^\circ$ з площинними системами тiazолін-2-ону та фенільного фрагмента (C23→C28) відповідно, тоді як карбонільна група C20=O21 перебуває у майже синперипланарній орієнтації щодо зв'язків C19–N3 і N22–C23, що підтверджується малими значеннями торсійних кутів $N3–C19–C20–O21 = -13.3(4)^\circ$ та $O21–C20–N22–C23 = -6.3(4)^\circ$. Така майже співплощинна геометрія є прямою структурною ознакою частково подвійного характеру зв'язку -C(O)-N-, зумовленого амідоподібним резонансом, і, відповідно, підвищеного бар'єра обертання в зоні -C(O)-N-. Амідоподібний резонанс істотно підвищує бар'єр внутрішнього обертання навколо зв'язку -C(O)-N-, що, у свою чергу, обмежує конформаційну рухливість суміжного фрагмента -N-CH₂-. Саме цей фактор у розчинах зазвичай призводить до того, що ланки типу -N-CH₂-C(O)- не зазнають швидкого внутрішнього усереднення на часовій шкалі ЯМР, а два протони метиленової групи фіксуються у різних просторових положеннях відносно карбонільної групи та жорсткого тіопірано[2,3-*d*]тіазольного ядра. Унаслідок цього протони H_α і H_β перебувають у різних магнітних та електростатичних оточеннях і характеризуються різними хімічними зсувами ($\delta_\alpha \neq \delta_\beta$). Додаткову асиметрію магнітного оточення метиленових протонів формують ароматичні замісники, приєднані через карбонільний фрагмент. Так, у сполуці **4.14c** CF₃-заміщений фенільний фрагмент і розширена π-система зумовлюють виражені індуктивні та анізотропні ефекти, що підсилюють диференціацію протонів H_α і H_β. У сполуці **4.16** аналогічну роль відіграє 3,4,5-триметоксибензольний фрагмент, який змінює локальні електронні поля та ступінь екранування метиленових протонів.

Частково подвійний характер зв'язку -C(O)-N-, зумовлений амідоподібним резонансом, та пов'язаний із цим підвищений бар'єр обертання є добре встановленим фізико-хімічним явищем, експериментально підтвердженим методами динамічної ЯМР-спектроскопії. Зокрема, у класичній роботі Gasparro та

Kolodny [180] показано, що для N,N-диметилацетаміду повільне обертання навколо зв'язку -C(O)-N- призводить до магнітної нееквівалентності замісників при атомі азоту та появи розділених сигналів у ^1H ЯМР спектрах при низьких температурах, тоді як при підвищенні температури ці сигнали зливаються внаслідок подолання ротаційного бар'єра. Визначений у цій роботі бар'єр обертання ($\approx 14\text{--}17$ ккал/моль) безпосередньо пов'язується з делокалізацією електронної густини між атомами -O-C-N- та планарністю амідного фрагмента, що є структурною ознакою амідоподібного резонансу (рис. 4.9.).

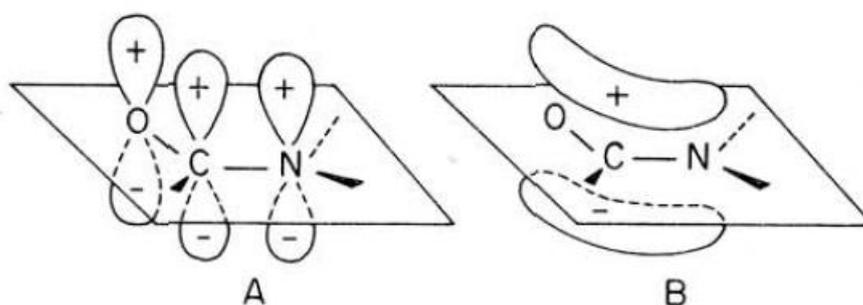


Рисунок 4.10. (А) Скелет σ -зв'язків амідного фрагмента, що визначає його планарну геометрію. (В) Делокалізована π -система амідного зв'язку, відповідальна за частково подвійний характер зв'язку -C(O)-N- [180].

Аналогічна ситуація реалізується й у досліджуваних нами системах, де ланка -N-CH₂-C(O)- перебуває у зоні впливу амідоподібного вузла і не зазнає швидкого конформаційного усереднення на часовій шкалі ЯМР, що приводить до стійкої діастереотопності метиленових протонів та формування АВ-систем із характерним ефектом «даху». Таким чином, спостережувані спектральні особливості є прямим наслідком підвищеного бар'єра обертання навколо зв'язку -C(O)-N-, зумовленого амідоподібним резонансом, що повністю узгоджується з фундаментальними даними динамічної ЯМР для амідних систем. Таким чином, узгоджений аналіз експериментальних ^1H ЯМР даних та результатів рентгеноструктурного аналізу переконливо свідчить, що спостережувана АВ-система сигналів фрагмента -N-CH₂-C(O)- у сполуках **4.16** і **4.14c** є прямим наслідком амідоподібного резонансу, підвищеного бар'єра внутрішнього обертання та жорсткої просторової організації тіопірано[2,3-*d*]тіазольного ядра.

Виявлена кореляція між спектроскопічними та кристалографічними даними є надійним підтвердженням запропонованої будови молекул і коректності їх N-алкілювання.

4.10 Опис експериментів

4.10.1. Хімічні дослідження.

Елементний аналіз (C,H,N) був виконаний з використанням Perkin-Elmer 2400 CHN аналізатору і знаходилися в межах $\pm 0,4\%$ від теоретичних значень. Температури плавлення були виміряні відкритим капілярним методом на приладі Buchi B-545 і представлені в некорегованій формі. Спектри ^1H (400 МГц) та ^{13}C (100 МГц) ЯМР реєстрували на приладі Varian Gemini в ДМСО- d_6 з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. Хімічні зміщення наведені в мільйонних частках з використанням δ шкали.

Загальна методика синтезу 3-заміщених похідних 4.2b, c, 4.6-4.8, 4.10, 4.14a-c, 4.15. У круглодонну колбу із зворотнім холодильником поміщують 10 ммоль відповідного тіопірано-тіазолу, 13 ммоль, відповідного алкілюючого реагенту, 20 ммоль, калію карбонату 26 ммоль та 5мл ДМФА. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі на магнітній мішалці протягом 12 годин. Після закінчення реакції додають воду. Продукт реакції відфільтровують, висушують і проводять очищення методом перекристалізації з оцтової кислоти або суміші розчинників ДМФА-етанол.

Синтез 5,5,8-триметил-3,5,5a,6,7,8,9,9a-октагідро-2H-ізотіохромено [3,4-d]тіазол-2-ону (4.16) Ізороданін (4-тіоксо-2-оксотіазолідинон) (10 ммоль) вводили в реакцію з цитронелалем 4.11 (10 ммоль) та додавали EDDA в каталітичних кількостях. В якості реакційного середовища використовували ацетонітрил (20 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв і в подальшому кипятили протягом 15 хв. Утворений продукт **4.12** фільтрували висушували і очищували методом перекристалізації в суміші розчинників ДМФА - етанол (1:2).

Синтез 9-(2-(5-(4-метоксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2H,6H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-2-ону (**4.21**). До розчину гідроксиду калію (28 ммоль) в етанолі (15 мл) додавали 4-гідрокси-2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегід **4.17** (28 ммоль) та перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв для утворення відповідної калієвої солі. Далі одноразово додавали 2-хлор-1-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)етан-1-он **4.18** (33 ммоль), після чого реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 год. Після синтезу реакційну суміш охолоджували, отриманий продукт 4-(2-(5-(4-хлорофеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1H-піразол-1-іл)-2-оксоетил)-2-(проп-2-ін-1-ілокси)бензальдегід **4.20** відфільтровували, висушували та очищували методом перекристалізації із оцтової кислоти. Далі **4.21** (10 ммоль) та ізороданін **2.1** (10 ммоль) поміщали в круглодонну колбу, додавали EDDA (10 ммоль) та (10 мл) ацетонтрилу і кип'ятили під зворотнім холодильником 30 хв. Після синтезу реакційну суміш охолоджували, отриманий продукт **4.21** відфільтровували, висушували та перекристалізовували із суміші ДМФА/етанол (1:2).

Синтез 2-(2-оксо-5a,11b-дигідро-2H,5H-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазол-3(6H)-іл)-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетаміду (**4.23**). До розчину гідроксиду калію (10 ммоль) в етанолі (12 мл) додавали **2.3a** (10 ммоль) та перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хв для утворення відповідної калієвої солі. Далі одноразово додавали 2-хлоро-N-(3,4,5-триметоксифеніл)ацетамід **4.22** (12 ммоль), після чого реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2,5 год. Після синтезу реакційну суміш охолоджували, відфільтровували, висушували та перекристалізовували із суміші ДМФ/етанол (1:2).

Висновки до розділу 4

Показано, що базові тіопірано-тіазоли (**2.3a-c**) є зручними та хімічно стабільними каркасами для подальшої структурної модифікації шляхом реакцій алкілювання з α -хлороацильними похідними піразолів. Обрані умови (ДМФА,

K₂CO₃, кімнатна температура) забезпечують ефективне перебігання реакцій та одержання цільових 3-заміщених похідних із задовільними фізико-хімічними характеристиками.

Синтезовано серію нових сполук (**4.2b,c; 4.6-4.8**), у яких відрізняється структура ароматичних замісників та довжини карбонового ланцюга в положенні 3 тiazолідинового циклу, що сприяє зростанню кількості можливих конформацій та потенційно може позитивно впливати на взаємодію з біологічними мішенями.

Реакція Кньюенагеля-гетеро-Дільса-Альдера між 4-тіоксо-2-оксотіазолідином та цитронелалем підтвердила ефективність цього підходу для побудови ізотіохромено[3,4-d]тіазольного каркасу. Отриманий продукт (**4.12**) використовувався для подальших функціоналізацій.

На основі похідного **4.12** успішно синтезовано серію 3-заміщених ізотіохромено-тіазолів (**4.14a-c**) з різними ароматичними замісниками, що демонструє універсальність розробленої методології.

Показано можливість функціоналізації положення 9 ароматичного циклу з утворенням 9-(2-(5-(4-хлорфеніл)-3-феніл-4,5-дигідро-1*H*-піразол-1-іл)-2-оксоетокси)-2*H*,6*H*-хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-*d*]тіазол-2-ону **4.21**.

Синтез сполуки **4.23** успішно реалізовано через реакцію алкілування, що підтверджує реакційну здатність N-нуклеофільного центру тіазолідин-2-ону.

Раніше встановлену спектроскопічними методами структуру було остаточно підтверджено методом рентгеноструктурного аналізу. Кільце дигідротіопірану має конформацію «конверта», що підтверджено параметрами Кремера-Попла. Кільце дигідропірану - напівкрісло. Кільця з'єднані за типом сіс-декаліну, що забезпечує жорсткість структури. Обидва стереогенні центри (C7 і C16) мають аксіальне розташування атомів Гідрогену. Довжина зв'язку C4-C17 = **1.350 Å**, що узгоджується з довжинами зв'язків C=C у літературі й підтверджує наявність алкенового фрагмента. Кристалічний стан характеризується складною мережею водневих зв'язків, що об'єднують молекули в тривимірні надмолекулярні структури.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено та реалізовано ефективну синтетичну стратегію одержання широкого ряду конденсованих тіопірано[2,3-*d*]тіазолів та їх 3-заміщених похідних, засновану на реакції Кньювенагеля–гетеро-Дільса–Альдера та подальших реакціях N-алкілювання, що дозволило цілеспрямовано поєднати в межах однієї молекули кілька фармакофорних фрагментів і сформувати хімічно стабільні конденсовані гетероциклічні каркаси.

2. Будову всіх синтезованих сполук надійно підтверджено комплексом сучасних фізико-хімічних методів (^1H та ^{13}C ЯМР, ВЕРХ-МС), а для ключового представника (сполука 4.23) – структуру остаточно верифіковано методом рентгеноструктурного аналізу, який продемонстрував наявність жорсткої тетрациклічної архітектури, фіксовану конформацію кілець та наявність амідоподібного вузла з підвищеним бар'єром внутрішнього обертання. Встановлено характерні спектроскопічні маркери будови N-алкільованих похідних, зокрема формування АВ-систем сигналів метиленового фрагмента $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ у ^1H ЯМР спектрах, що є прямим наслідком діастереотопності протонів, зумовленої амідоподібним резонансом та обмеженою конформаційною рухливістю; узгоджений аналіз ЯМР та РСА підтвердив структурну природу цього ефекту.

3. Проведено систематичний біологічний скринінг синтезованих тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних, який охоплював комплексне дослідження їх протисудомної та протипухлинної активності, а також оцінку основних токсикометричних параметрів. Такий підхід дозволив всебічно охарактеризувати біологічний потенціал отриманих молекул і продемонстрував, що навіть незначні структурні модифікації можуть істотно змінювати напрям і вираженість біологічної дії. Узагальнення результатів скринінгу дало змогу встановити первинні залежності типу «структура-активність» і сформувати основу для подальшого виділення сполук з оптимальним поєднанням ефективності та безпеки.

4. У результаті систематичного *in vivo* скринінгу протисудомної активності синтезованих тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних встановлено, що даний клас

сполук характеризується широким спектром впливу на перебіг судомного процесу - від слабкої та помірної активності до вираженого протисудомного ефекту. Проведена класифікація сполук за характером дії дозволила виділити похідні з вираженою протисудомною активністю (**2.14**, **2.18b**, **2.21**), а також встановити кореляції типу «структура-активність», які свідчать про ключову роль природи та просторової орієнтації замісників у положенні 3 тiazолідинового циклу. Показано, що введення ароматичних амідних фрагментів, зокрема 4-хлорфенілпропіонамідного замісника, істотно підсилює протисудомну дію сполук.

5. Проведено поглиблене фармакологічне дослідження сполуки **2.14** на шести експериментальних моделях судом, що охоплювали судом, індуковані пікротоксином, кофеїном, тіосемікарбазидом, стрихніном, камфорою, а також електроіндуковані судом. Отримані результати підтвердили високу та стабільну протисудомну ефективність похідного **2.14**, причому на моделях судом, індукованих пікротоксином, кофеїном та електрошоком, його активність була еквівалентною або в окремих випадках перевищувала ефекти препаратів порівняння (натрію вальпроату та карбамазепіну). Застосування сполуки **2.14** супроводжувалося істотним подовженням латентного періоду розвитку судом, зменшенням частоти та тяжкості нападів, а також зниженням летальності, тоді як результати на моделях тіосемікарбазид- та стрихнін-індукованих судом свідчать про механізм-специфічний характер її протисудомної дії.

6. Дослідження *in silico* методом молекулярного докінгу показали високу спорідненість сполук, зокрема **2.14** та **2.18b**, до бензодіазепінового сайту GABA_A-рецептора. Розраховані значення енергій зв'язування та аналіз прогнозованих конформацій комплексів ліганд-рецептор свідчать про формування стабільних нековалентних взаємодій із ключовими амінокислотними залишками рецептора, характерними для зв'язування класичних бензодіазепінів. Просторове накладання лігандів продемонструвало, що сполука **2.14** займає орієнтацію, близьку до діазепаму, з подібним розташуванням фармакофорних елементів у активному центрі рецептора. Сукупність отриманих *in silico* даних свідчить про бензодіазепіноподібний механізм протисудомної дії досліджуваних сполук, що

узгоджується з результатами *in vivo* фармакологічних досліджень. Крім того, результати молекулярного докінгу вказують на потенційну взаємодію сполук-лідерів із GlyR α 3, а також аденозиновими рецепторами A1R та A2AR, що дозволяє розглядати ці білкові мішені як вторинні та не виключає поліфармакологічний характер протисудомної дії. Отримані результати свідчать про доцільність подальшої оптимізації даного класу тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних як потенційних протисудомних агентів.

7. Встановлено, що ряд 3-заміщених тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних проявляє виражену протипухлинну активність *in vitro*, що підтверджено результатами первинного та поглибленого скринінгу на панелі клітинних ліній NCI-60. Зокрема, сполука **3.8** продемонструвала широку цитотоксичну дію в мікромольному діапазоні з низькими значеннями GI₅₀ (<1 μ M) для клітинних ліній раку яєчників, нирок, лімфоми та агресивних форм раку молочної залози, що відповідає критеріям перспективних протипухлинних агентів і підтверджує доцільність подальших досліджень цього класу сполук як потенційних кандидатів для терапії онкології.

8. Таким чином, у межах виконаної роботи комплексно поєднано сучасні синтетичні підходи, поглиблену структурну діагностику, експериментальні фармакологічні дослідження та *in silico* моделювання, що дозволило обґрунтувати тіопірано[2,3-*d*]тіазоли як перспективний клас біологічно активних сполук. Розроблена стратегія синтезу забезпечила отримання структурно різноманітних та хімічно стабільних похідних, для яких встановлено залежності типу «структура-активність». Ідентифіковані сполуки, що продемонстрували виражену протисудомну та протипухлинну активність у поєднанні з прийнятними токсикометричними показниками, а результати молекулярного докінгу дозволили обґрунтувати імовірні механізми їх дії на молекулярному рівні. Сукупність отриманих даних підтверджує доцільність подальшої оптимізації та поглиблених доклінічних досліджень тіопірано[2,3-*d*]тіазольних похідних як потенційних кандидатів у лікарські засоби з протисудомним та протипухлинним профілем дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Tietze, L. F., & Rackelmann, N. (2004). Enantioselective synthesis of Epimetine analogues: Control of the facial selectivity in a three-component domino Knoevenagel-Hetero-Diels-Alder reaction. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 59(4), 468-477. doi:10.1515/znb-2004-0415
2. Sabitha, G., Reddy, E. V., Fatima, N., Yadav, J. S., Krishna, K. R., & Kunwar, A. C. (2004). Diastereoselective synthesis of chiral cis-annulated polycyclic heterocycles from d-glucose by Domino Knoevenagel-Hetero-Diels-Alder reaction. *Synthesis*, 2004(08), 1150-1154. doi: 10.1055/s-2004-822352
3. Klapa, K. A. (2007). *Untersuchungen zur Synthese von Yohimban- und Camphotheca-Alkaloiden durch Domino-Knoevenagel-Hetero-Diels-Alder-Reaktion*. Georg-August-Universität Göttingen (Germany).
4. Majumdar, K. C., Taher, A., & Ray, K. (2009). Domino-Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reactions: an efficient one-step synthesis of indole-annulated thiopyranobenzopyran derivatives. *Tetrahedron Letters*, 50(27), 3889-3891. doi:10.1016/j.tetlet.2009.04.054
5. Kiamehr, M., & Moghaddam, F. M. (2009). An efficient ZnO-catalyzed synthesis of novel indole-annulated thiopyrano-chromene derivatives via Domino Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 50(48), 6723-6727. doi:10.1016/j.tetlet.2009.09.106
6. Moghaddam, F. M., Kiamehr, M., Khodabakhshi, M. R., Mirjafary, Z., Fathi, S., & Saeidian, H. (2010). A new domino Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction: An efficient catalyst-free synthesis of novel thiochromone-annulated thiopyranocoumarin derivatives in aqueous medium. *Tetrahedron*, 66(45), 8615-8622. doi:10.1016/j.tet.2010.09.048
7. Majumdar, K. C., Taher, A., & Ponra, S. (2010). Catalyst-free domino-Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction of terminal alkynes in water: an efficient one-step

synthesis of indole-annulated thiopyranobenzopyran derivatives. *Tetrahedron Letters*, 51(1), 147-150. doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.10.108

8. Tietze, L. F., Dietz, S., Böhnke, N., Düfert, M. A., Objartel, I., & Stalke, D. (2011). Three-Component Domino Knoevenagel/Hetero-Diels–Alder Reaction for the Synthesis of the Amino Sugars 2-Acetoxyforosamine and 2-Acetoxyossamine—Experimental and Theoretical Results. doi:10.1002/ejoc.201100725.

9. Reddy, B. S., Divya, B., Swain, M., Rao, T. P., Yadav, J. S., & Vardhan, M. V. (2012). A domino Knoevenagel hetero-Diels–Alder reaction for the synthesis of polycyclic chromene derivatives and evaluation of their cytotoxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(5), 1995-1999. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.01.033

10. Tietze, L. F., Bohnke, N., & Dietz, S. (2009). Synthesis of the Deoxyaminosugar (+)-d-Forosamine via a Novel Domino–Knoevenagel–Hetero-Diels–Alder Reaction. *Organic letters*, 11(13), 2948-2950. doi.org/10.1021/o1900899a

11. Khoshkholgh, M. J., Balalaie, S., Bijanzadeh, H. R., Rominger, F., & Gross, J. H. (2008). Synthesis of novel annulated uracils via domino Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction in aqueous media. *Tetrahedron Letters*, 49(49), 6965-6968. doi:10.1016/j.tetlet.2008.09.079

12. Khoshkholgh, M. J., Balalaie, S., Bijanzadeh, H. R., & Gross, J. H. (2009). Intramolecular domino-Knoevenagel-hetero-Diels-Alder reaction with terminal acetylenes. *Arkivoc*, 9, 114-121. doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.908

13. Matiychuk, V. S., Lesyk, R. B., Obushak, M. D., Gzella, A., Atamanyuk, D. V., Ostapiuk, Y. V., & Kryshchyshyn, A. P. (2008). A new domino-Knoevenagel-hetero-Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 49(31), 4648-4651. doi.org/10.1002/chin.200845151

14. Majumdar, K. C., Taher, A., & Ponra, S. (2010). Green synthesis of benzopyran-annulated thiopyrano [2, 3-b] thiochromen-5 (4H)-ones by domino Knoevenagel-hetero-Diels-Alder reaction. *Synthesis*, 2010(23), 4043-4050. doi: 10.1055/s-0030-1258261

15. Jayagobi, M., & Raghunathan, R. (2009). An efficient synthesis of pyrano [4, 5-c] pyrrole derivatives through microwave—accelerated intramolecular Knoevenagel

hetero Diels–Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 50(49), 6886-6890.
doi: [10.1016/j.tetlet.2009.09.136](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.136)

16. Sabitha, G., Fatima, N., Reddy, E. V., & Yadav, J. S. (2005). First Examples of Proline-Catalyzed Domino Knoevenagel/Hetero-Diels–Alder/Elimination Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 347(10), 1353-1355.
doi.org/10.1002/ADSC.200505144

17. Kiamehr, M., Mohammadkhani, L., Khodabakhshi, M. R., Jafari, B., & Langer, P. (2019). Synthesis of Tetrahydropyrazolo [4', 3': 5, 6] pyrano [3, 4-c] quinolones by Domino Knoevenagel/Hetero Diels–Alder Reactions. *Synlett*, 30(15), 1782-1786.
doi: [10.1055/s-0039-1690189](https://doi.org/10.1055/s-0039-1690189)

18. Wu, M., Yang, J., Luo, F., Cheng, C., & Zhu, G. (2019). Iron-catalyzed domino Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction: facile access to oxabicyclo [3.3. 1] nonene derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 17(23), 5684-5687.
doi.org/10.1039/C9OB00836E

19. Martin-Acosta, P., Haider, S., Amesty, A., Aichele, D., Jose, J., & Estevez-Braun, A. (2018). A new family of densely functionalized fused-benzoquinones as potent human protein kinase CK2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 410-423. doi:[10.1016/j.ejmech.2017.12.058](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.058)

20. Kiamehr, M., Khademi, F., Jafari, B., & Langer, P. (2020). Efficient synthesis of pentacyclic benzosultam-annulated thiopyranoindoles via domino Knoevenagel/intramolecular hetero-Diels–Alder reactions in water. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 56(3), 392-398. doi.org/10.1007/5419

21. Suri, M., Hussain, F. L., Gogoi, C., Das, P., & Pahari, P. (2020). Magnetically recoverable silica catalysed solvent-free domino Knoevenagel-hetero-Diels–Alder reaction to access divergent chromenones. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(11), 2058-2062. doi.org/10.1039/D0OB00284D

22. Bakthadoss, M., & Vinayagam, V. (2021). Construction of hybrid polycyclic quinolinobenzo [a] phenazinone architectures using solid-state melt reaction (SSMR). *Molecular Diversity*, 25(4), 2447-2458. doi: [10.1007/s11030-020-10090-6](https://doi.org/10.1007/s11030-020-10090-6)

23. Balázs Király, S., Tóth, L., Kovács, T., Bényei, A., Lisztes, E., Istvan Toth, B., ... & Kurtán, T. (2023). Multifaceted Domino Knoevenagel-Cyclization Reactions; Four Movements for 2H-Chromenes and Chromans. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 365(19), 3301-3319. doi.org/10.1002/adsc.202300083
24. Kajtar, M., Kiraly, S. B., Benyei, A., Kiss-Szikszai, A., Konya-Abraham, A., Zhang, N., ... & Kurtan, T. (2024). Competing Domino Knoevenagel-Cyclization Sequences with N-Arylcinnamylamines. *The Journal of Organic Chemistry*, 89(10), 6937-6950. doi.org/10.1021/acs.joc.4c00299
25. Karthik, S., Priya, L. V., Rao, B. M., Adarsh, D. R., Sridhar, B., Reddy, B. V. S., & Padmaja, P. (2025). Organocatalytic Domino Knoevenagel Hetero-Diels-Alder Reaction for the Synthesis of Chromenopyran Derivatives. *Letters in Organic Chemistry*, 22(1), 78-86. doi.org/10.2174/0115701786312736240604093915
26. Kajtár, M., Király, S. B., Bényei, A., Kiss-Szikszai, A., Kónya-Ábrahám, A., Horváth, L. B., ... & Kurtán, T. (2025). Knoevenagel-IMHDA and-IMSDA sequences for the synthesis of chiral condensed O, N-, S, N-and N-heterocycles. *RSC advances*, 15(2), 1230-1248. doi: 10.1021/acs.joc.4c00299
27. Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring—A biologically active scaffold. *Molecules*, 26(11), 3166. doi.org/10.3390/molecules26113166
28. Lesyk, R. B., & Zimenkovsky, B. S. (2004). 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Current Organic Chemistry*, 8(16), 1547-1577. doi.org/10.2174/1385272043369773
29. Verma, A., & Saraf, S. K. (2008). 4-Thiazolidinone—A biologically active scaffold. *European journal of medicinal chemistry*, 43(5), 897-905. doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.017
30. Lesyk, R. B., Zimenkovsky, B. S., Kaminsky, D. V., Kryshchyshyn, A. P., Havryluk, D. Ya., Atamanyuk, D. V. et al. (2011). Thiazolidinone motif in anticancer drug discovery. Experience of DH LNMU medicinal chemistry scientific group. *Biopolymers and Cell*, 27 (2), 107–117. doi.org/10.7124/bc.000089

31. Tripathi, A. C., Gupta, S. J., Fatima, G. N., Sonar, P. K., Verma, A., & Saraf, S. K. (2014). 4-Thiazolidinones: the advances continue.... *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 52-77. doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.017
32. Reginato, M. J., Bailey, S. T., Krakow, S. L., Minami, C., Ishii, S., Tanaka, H., & Lazar, M. A. (1998). A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor γ -activating properties. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32679-32684. doi.org/10.1074/jbc.273.49.32679
33. Kador, P. F., Kinoshita, J. H., & Sharpless, N. E. (1985). Aldose reductase inhibitors: a potential new class of agents for the pharmacological control of certain diabetic complications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(7), 841-849. doi.org/10.1021/jm00145a001
34. Davydov, E., Hoidyk, M., Shtrygol', S., Karkhut, A., Polovkovych, S., Klyuchivska, O., ... & Holota, S. (2024). Evaluation of thiopyrano [2, 3-d] thiazole derivatives as potential anticonvulsant agents. *Archiv der Pharmazie*, 357(10), e2400357.. doi:10.1002/ardp.202400357
35. Palla, R., Distratis, C., Cominotto, R., Panichi, V., Pozzetti, G., Bionda, A., ... & Frattarelli, L. (1987). Renal Effects of Etozolin in Man. In *Diuretics: Basic, Pharmacological, and Clinical Aspects: Proceedings of the International Meeting on Diuretics, Sorrento, Italy, May 26-30, 1986* (pp. 553-555). Boston, MA: Springer US. doi.org/10.1007/978-1-4613-2067-8_142
36. Löscher, W., Von Hodenberg, A., Nolting, B., Fassbender, C. P., & Taylor, C. (1991). Ralitoline: A reevaluation of anticonvulsant profile and determination of "active" plasma concentrations in comparison with prototype antiepileptic drugs in mice. *Epilepsia*, 32(4), 560-568. doi.org/10.1111/j.1528-1157.1991.tb04693.x
37. Aldrich, C., Bertozzi, C., Georg, G. I., Kiessling, L., Lindsley, C., Liotta, D., ... & Wang, S. (2017). The ecstasy and agony of assay interference compounds. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(3), 420-423. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00229
38. Kaminsky, D., Kryshchyshyn, A., & Lesyk, R. (2017). Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(12), 1233-1252. doi.org/10.1080/17460441.2017.1388370

39. Kaminsky, D., Kryshchyn, A., & Lesyk, R. (2017). 5-Ene-4-thiazolidinones—An efficient tool in medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, *140*, 542-594. doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.031
40. Baell, J. B., & Holloway, G. A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry*, *53*(7), 2719-2740. doi.org/10.1021/jm901137j
41. Baell, J. B. (2016). Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *Journal of Natural Products*, *79* (3), 616–628. doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00947
42. Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Atamanyuk, D., Jensen, F., Kieć-Kononowicz, K., & Gzella, A. (2006). Anticancer thiopyrano [2, 3-d][1, 3] thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *14*(15), 5230-5240. doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.053
43. Atamanyuk, D., Zimenkovsky, B., & Lesyk, R. (2008). Synthesis and anticancer activity of novel thiopyrano [2, 3-d] thiazole-based compounds containing norbornane moiety. *Journal of Sulfur Chemistry*, *29*(2), 151-162. doi.org/10.1080/17415990801911723
44. Atamanyuk, D., Zimenkovsky, B., Atamanyuk, V., Nektegayev, I., & Lesyk, R. (2013). Synthesis and biological activity of new thiopyrano [2, 3-d] thiazoles containing a naphthoquinone moiety. *Scientia Pharmaceutica*, *81*(2), 423. doi.org/10.3797/scipharm.1301-13
45. Kryshchyn, A., Roman, O., Lozynskyi, A., & Lesyk, R. (2018). Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as new efficient scaffolds in medicinal chemistry. *Scientia Pharmaceutica*, *86*(2), 26. doi.org/10.3390/scipharm86020026
46. Bar, M., Skóra, B., Tabęcka-Łonczyńska, A., Holota, S., Khylyuk, D., Roman, O., ... & Szychowski, K. A. (2022). New 4-thiazolidinone-based molecules Les-2769 and Les-3266 as possible PPAR γ modulators. *Bioorganic Chemistry*, *128*, 106075. doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106075

47. Крицишин, А. П., Зіменковський, Б. С., Запрутко, Л., & Лесик, Р. Б. (2010). Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних 3, 5а, 6, 11b-тетрагідро-2Н, 5Н-хромено [4', 3': 4, 5] тіопірано [2, 3-d] тiazолу. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*.
48. Zelisko, N., Atamanyuk, D., Vasylenko, O., Grellier, P., & Lesyk, R. (2012). Synthesis and antitrypanosomal activity of new 6, 6, 7-trisubstituted thiopyrano [2, 3-d][1, 3] thiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(23), 7071-7074. doi: [10.1016/j.bmcl.2012.09.091](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.091)
49. Zhang, Y., Wang, S., Wu, S., Zhu, S., Dong, G., Miao, Z., ... & Wang, W. (2013). Facile construction of structurally diverse thiazolidinedione-derived compounds via divergent stereoselective cascade organocatalysis and their biological exploratory studies. *ACS Combinatorial Science*, 15(6), 298-308. doi: [10.1021/co400022r](https://doi.org/10.1021/co400022r)
50. Finiuk, N., Zelisko, N., Klyuchivska, O., Yushyn, I., Lozynskyi, A., Cherniienko, A., ... & Lesyk, R. (2022). Thiopyrano [2, 3-d] thiazole structures as promising scaffold with anticancer potential. *Chemico-Biological Interactions*, 368, 110246. doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110246
51. Metwally, N. H., Badawy, M. A., & Okpy, D. S. (2018). Green synthesis of some new thiopyrano [2, 3-d][1, 3] thiazoles using lemon juice and their antibacterial activity. *Synthetic Communications*, 48(19), 2496-2509. doi.org/10.1080/00397911.2018.1495234
52. Metwally, N. H., Badawy, M. A., & Okpy, D. S. (2015). Synthesis and anticancer activity of some new thiopyrano [2, 3-d] thiazoles incorporating pyrazole moiety. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(7), 495-503. doi: [10.1248/cpb.c14-00885](https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00885)
53. Kozak, Y., Finiuk, N., Czarnomysy, R., Gornowicz, A., Pinyazhko, R., Lozynskyi, A., ... & Polovkovych, S. (2025). Juglone-Bearing Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles Induce Apoptosis in Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Cells* 2025, 14, 465. trials. doi.org/10.3390/cells14060465
54. Ivasechko, I., Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., ... & Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new

thiopyrano [2, 3-d] thiazoles based on 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (juglone). *European journal of medicinal chemistry*, 252, 115304. doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304

55. Lozynskyi, A., Senkiv, J., Ivasechko, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone motif in the synthesis of new thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as potential biologically active compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. doi.org/10.3390/molecules27217575

56. Kryshchyshyn-Dylevych, A., Garazd, M., Karkhut, A., Polovkovych, S., & Lesyk, R. (2020). Synthesis and anticancer activity evaluation of 3-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-yl)-1 H-indole-carboxylic acids derivatives. *Synthetic Communications*, 50(18), 2830-2838. doi.org/10.1080/00397911.2020.1786124

57. Polovkovych, S. V., Karkhut, A. I., Marintsova, N. G., Lesyk, R. B., Zimenkovsky, B. S., & Novikov, V. P. (2013). Synthesis of New Schiff Bases and Polycyclic Fused Thiopyranothiazoles Containing 4, 6-Dichloro-1, 3, 5-Triazine Moiety. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50(6), 1419-1424. doi.org/10.1002/jhet.890

58. Kryshchyshyn, A., Atamanyuk, D., & Lesyk, R. (2012). Fused thiopyrano [2, 3-d] thiazole derivatives as potential anticancer agents. *Scientia pharmaceutica*, 80(3), 509. doi.org/10.3797/scipharm.1204-02

59. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., Nektegayev, I., & Lesyk, R. (2015). Arylidene pyruvic acids motif in the synthesis of new thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as potential biologically active compounds. *Heterocyclic communications*, 21(1), 55-59. doi.org/10.1515/hc-2014-0204

60. Polovkovych, S., Klyuchivska, O., Karpenko, O., Lesyk, R., & Holota, S. (2024). Evaluation of thiopyrano [2, 3-d] thiazole derivatives as potential anticonvulsant agents. doi.org/10.1002/ardp.202400357

61. Mishchenko, M., Shtrygol', S., Lozynskyi, A., Khomyak, S., Novikov, V., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2021). Evaluation of anticonvulsant activity of dual COX-2/5-LOX inhibitor darbufelon and its novel analogues. *Scientia Pharmaceutica*, 89(2), 22. doi.org/10.3390/scipharm89020022

62. Mishchenko, M., Shtrygol, S., Kaminsky, D., & Lesyk, R. (2020). Thiazole-bearing 4-thiazolidinones as new anticonvulsant agents. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), 16. doi.org/10.3390/scipharm88010016
63. Holota, S., Kryshchyshyn, A., Derkach, H., Trufin, Y., Demchuk, I., Gzella, A., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis of 5-enamine-4-thiazolidinone derivatives with trypanocidal and anticancer activity. *Bioorganic chemistry*, 86, 126-136. doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.045
64. Kryshchyshyn, A., Kaminsky, D., Karpenko, O., Gzella, A., Grellier, P., & Lesyk, R. (2019). Thiazolidinone/thiazole based hybrids—New class of antitrypanosomal agents. *European journal of medicinal chemistry*, 174, 292-308. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.052
65. Kryshchyshyn, A., Kaminsky, D., Nektegayev, I., Grellier, P., & Lesyk, R. (2018). Isothiochromenothiazoles—a class of fused thiazolidinone derivatives with established anticancer activity that inhibits growth of *Trypanosoma brucei brucei*. *Scientia Pharmaceutica*, 86(4), 47. doi.org/10.3390/scipharm86040047
66. Kryshchyshyn, A., Devinyak, O., Kaminsky, D., Grellier, P., & Lesyk, R. (2018). Development of Predictive QSAR Models of 4-Thiazolidinones Antitrypanosomal Activity Using Modern Machine Learning Algorithms. *Molecular Informatics*, 37(5), 1700078. doi.org/10.1002/minf.201700078
67. Kaminsky, D. (2017). Investigation of anticancer and anti-parasitic activity of thiopyrano [2, 3-d] thiazoles bearing norbornane moiety. *Biopolymers and Cell*. doi.org/10.7124/bc.00094f
68. Lozynskyi, A., Zasadko, V., Atamanyuk, D., Kaminsky, D., Derkach, H., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2017). Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of novel thiopyrano [2, 3-d] thiazoles based on acryloyl acids. *Molecular Diversity*, 21(2), 427-436. doi.org/10.1007/s11030-017-9737-8
69. Khamitova, I. K., Berillo, D., Lozynskyi, A., Konechnyi, Y., Mural, D., Georgiyants, V., & Lesyk, R. (2024). Thiadiazole and thiazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 24(5), 531-545. doi.org/10.2174/1389557523666230713115947

70. Mittapalli, G. K., & Roberts, E. (2014). Structure activity relationships of novel antiepileptic drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 21(6), 722-754. doi.org/10.2174/0929867320666131119153215
71. Al-Otaibi, F. (2019). An overview of structurally diversified anticonvulsant agents. *Acta Pharmaceutica*, 69(3), 321-344. doi.org/10.2478/acph-2019-0023
72. Kerzare, D. R., Menghani, S. S., Rarokar, N. R., & Khedekar, P. B. (2021). Development of novel indole-linked pyrazoles as anticonvulsant agents: A molecular hybridization approach. *Archiv der Pharmazie*, 354(1), 2000100. doi.org/10.1002/ardp.202000100
73. Fontana, A. C., Poli, A. N., Gour, J., Srikanth, Y. V., Anastasi, N., Ashok, D., ... & Salvino, J. M. (2024). Synthesis and Structure–Activity Relationships for Glutamate Transporter Allosteric Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(8), 6119-6143. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01909
74. Mishchenko, M., Shtrygol, S., Kaminsky, D., & Lesyk, R. (2020). Thiazole-bearing 4-thiazolidinones as new anticonvulsant agents. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), 16. doi.org/10.3390/scipharm88010016
75. Mishchenko, M., Shtrygol', S., Lozynskyi, A., Hoidyk, M., Khylyuk, D., Gorbach, T., & Lesyk, R. (2022). Evaluation of 5-[(Z)-(4-nitrobenzylidene)]-2-(thiazol-2-ylimino)-4-thiazolidinone (Les-6222) as Potential Anticonvulsant Agent. *Scientia Pharmaceutica*, 90(3), 56. doi.org/10.3390/scipharm90030056
76. Kryshchyshyn, A., Roman, O., Lozynskyi, A., & Lesyk, R. (2018). Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as new efficient scaffolds in medicinal chemistry. *Scientia Pharmaceutica*, 86(2), 26. doi: 10.3390/scipharm86020026
77. Bar, M., Skóra, B., Tabęcka-Łonczyńska, A., Holota, S., Khylyuk, D., Roman, O., ... & Szychowski, K. A. (2022). New 4-thiazolidinone-based molecules Les-2769 and Les-3266 as possible PPAR γ modulators. *Bioorganic Chemistry*, 128, 106075. doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106075
78. Hoidyk, M., Karkhut, A., Polovkovich, S., Lesyk, R. (2025). Knoevenagel-hetero-Diels-Alder tandem and domino reactions as a platform for designing biologically

relevant molecules in organic and medicinal chemistry: A review. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, (6), doi: 15-38.10.32434/0321-4095-2025-163-6-15-38

79. Lozynskiy, A., Matiychuk, V., Karpenko, O., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2017). Tandem hetero-Diels–Alder-hemiacetal reaction in the synthesis of new chromeno [4', 3': 4, 5] thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles. *Heterocyclic Communications*, 23(1), 1-5. doi:10.1515/hc-2016-0176

80. Zelisko, N., Karpenko, O., Muzychenko, V., Gzella, A., Grellier, P., & Lesyk, R. (2017). *trans*-Aconitic acid-based hetero-Diels-Alder reaction in the synthesis of thiopyrano [2, 3-*d*][1, 3] thiazole derivatives. *Tetrahedron Letters*, 58(18), 1751-1754. doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.03.062

81. WHO, accessed April 2024 from [https://www.who.int/health-topics/epilepsy#tab=tab_1]

82. Talevi, A. (2022). Antiseizure medication discovery: Recent and future paradigm shifts. *Epilepsia Open*, 7, S133-S141. doi.org/10.1002/epi4.12581

83. Enrique, A. V., Di Ianni, M. E., Goicoechea, S., Lazarowski, A., Valle-Dorado, M. G., Costa, J. J. L., ... & Talevi, A. (2021). New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmaco-resistant seizure model in mice. *Epilepsy & Behavior*, 121, 106451. doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106451

84. Ciccone, L., Cerri, C., Nencetti, S., & Orlandini, E. (2021). Carbonic anhydrase inhibitors and epilepsy: State of the art and future perspectives. *Molecules*, 26(21), 6380. doi.org/10.3390/molecules26216380

85. Pawlik, M. J., Miziak, B., Walczak, A., Konarzewska, A., Chrościńska-Krawczyk, M., Albrecht, J., & Czuczwar, S. J. (2021). Selected molecular targets for antiepileptogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9737. doi.org/10.3390/ijms22189737

86. Perucca, E., Bialer, M., & White, H. S. (2023). New GABA-targeting therapies for the treatment of seizures and epilepsy: I. Role of GABA as a modulator of seizure activity and recently approved medications acting on the GABA system. *CNS drugs*, 37(9), 755-779. doi.org/10.1007/s40263-023-01027-2

87. Janković, S. M., Dješević, M., & Janković, S. V. (2021). Experimental GABA A receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of focal epilepsy. *Journal of experimental pharmacology*, 235-244. doi.org/10.2147/JEP.S242964
88. Zhang, Y., Wang, K., & Yu, Z. (2020). Drug development in channelopathies: Allosteric modulation of ligand-gated and voltage-gated ion channels. *Journal of medicinal chemistry*, 63(24), 15258-15278. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01304
89. Pal, R., Kumar, B., Akhtar, M. J., & Chawla, P. A. (2021). Voltage gated sodium channel inhibitors as anticonvulsant drugs: A systematic review on recent developments and structure activity relationship studies. *Bioorganic Chemistry*, 115, 105230. doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105230
90. Willems, L. M., Bauer, S., Rosenow, F., & Strzelczyk, A. (2019). Recent advances in the pharmacotherapy of epilepsy: brivaracetam and perampanel as broad-spectrum antiseizure drugs for the treatment of epilepsies and status epilepticus. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(14), 1755-1765. doi.org/10.1080/14656566.2019.1637420
91. Sadowski, K., Kotulska-Józwiak, K., & Józwiak, S. (2015). Role of mTOR inhibitors in epilepsy treatment. *Pharmacological Reports*, 67(3), 636-646. doi.org/10.1016/j.pharep.2014.12.017
92. Myers, K. A., & Scheffer, I. E. (2017). DEPDC5 as a potential therapeutic target for epilepsy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(6), 591-600. doi.org/10.1080/14728222.2017.1316715
93. Dhir, A. (2019). An update of cyclooxygenase (COX)-inhibitors in epilepsy disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(2), 191-205. doi.org/10.1080/13543784.2019.1557147
94. Rawat, C., Kukal, S., Dahiya, U. R., & Kukreti, R. (2019). Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 197. doi.org/10.1186/s12974-019-1592-3
95. Mishra, C. B., Tiwari, M., & Supuran, C. T. (2020). Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological

applications: Where are we today?. *Medicinal research reviews*, 40(6), 2485-2565. doi.org/10.1002/med.21713

96. Mishra, C. B., Kumari, S., Angeli, A., Bua, S., Mongre, R. K., Tiwari, M., & Supuran, C. T. (2021). Discovery of potent carbonic anhydrase inhibitors as effective anticonvulsant agents: drug design, synthesis, and in vitro and in vivo investigations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(6), 3100-3114. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01889

97. Kumari, S., Bhushan Mishra, C., & Tiwari, M. (2016). Polypharmacological drugs in the treatment of epilepsy: the comprehensive review of marketed and new emerging molecules. *Current pharmaceutical design*, 22(21), 3212-3225. doi.org/10.2174/1381612822666160226144200

98. Miziak, B., Konarzewska, A., Ułamek-Kozioł, M., Dudra-Jastrzębska, M., Pluta, R., & Czuczwar, S. J. (2020). Anti-epileptogenic effects of antiepileptic drugs. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2340. doi.org/10.3390/ijms21072340

99. Singh, R., Sarangi, S. C., Singh, S., & Tripathi, M. (2022). A review on role of metformin as a potential drug for epilepsy treatment and modulation of epileptogenesis. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 101, 253-261. doi.org/10.1016/j.seizure.2022.09.003

100. Wang, S. J., Zhao, M. Y., Zhao, P. C., Zhang, W., & Rao, G. W. (2024). Research Status, Synthesis and Clinical Application of Antiepileptic Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 31(4), 410-452. doi: 10.2174/0929867330666230117160632

101. M.D.Hanwell, D. E.Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, J. Cheminf. 2012, [Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform](#), *Journal of Cheminformatics* 4(1), 17. doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

102. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, 3(1), 33. doi.org/10.1186/1758-2946-3-33

103. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of chemical information and modeling*, *61*(8), 3891-3898. doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203
104. Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of chemical information and modeling*, *48*(7), 1411-1422. doi.org/10.1021/ci800084x
105. Masiulis, S., Desai, R., Uchański, T., Serna Martin, I., Lavery, D., Karia, D., ... & Aricescu, A. R. (2019). GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*, *565*(7740), 454-459. doi.org/10.1038/s41586-018-0832-5
106. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, *26*(16), 1701-1718. doi.org/10.1002/jcc.20291
107. Shtrygol, S., Zalevskiy, S., Mishchenko, M., Shtrygol, D., Severina, H., Kayal, W. E., & Georgiyants, V. (2022). Promising anticonvulsant N-[(2, 4-dichlorophenyl) methyl]-2-(2, 4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl) acetamide: dose-dependent study and evaluation of anticonvulsant action spectrum in vivo and in silico. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, *71*(5), 224-233. doi.org/10.5817/csf2022-5-224
108. Johnston, G. A. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British journal of pharmacology*, *169*(2), 328-336. doi.org/10.1111/bph.12127
109. Dighe, A. P., & Barve, K. H. (2019). Anticonvulsant effect of Sphaeranthus flower extracts in mice. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, *10*(1), 38-40. doi.org/10.1016/j.jaim.2018.06.008
110. Golovenko, M. Y., & Gromov, L. O. (2003). *Pre-clinical study of the specific activity of potential anticonvulsants: Methodical recommendations*. Kyiv, Ukraine: State Center of the Ministry of Healthcare of Ukraine.
111. Iyanyi, U. L., Oparah, I., & Okokon, J. O. (2023). Evaluation of the anticonvulsant activity of ethanol leaf extract of Panicum maximum in pentylenetetrazole

and strychnine induced seizure in mice. *Journal of Current Biomedical Research*, 3(4, July-August). doi.org/10.54117/jcbr.v3i4.4

112. Salim Mahmood, A., Ammoo, A. M., Ali, M. H. M., Hameed, T. M., Al-Hussaniy, H. A., Aljumaili, A. A. A., ... & Kadhim, A. H. (2022). Antiepileptic effect of Neuroaid® on strychnine-induced convulsions in mice. *Pharmaceuticals*, 15(12), 1468. doi.org/10.3390/ph15121468

113. Park, T. J., Seo, H. K., Kang, B. J., & Kim, K. T. (2001). Noncompetitive inhibition by camphor of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, 61(7), 787-793. doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00547-0

114. Njan, A. A. (2022). Mechanism and changes associated with edible camphor induced neurotoxicity. *Pharmacology and Toxicology of Natural Medicines (ISSN: 2756-6838)*, 2(2), 37-49. doi.org/10.52406/ptnm.v2i2.29

115. Melnick, S. M., Shin, Y., & Glenn, K. J. (2023). Anticonvulsant effects of cenobamate in chemically and electrically induced seizure models in rodents. *Heliyon*, 9(8). doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18920

116. Vogel, H. G. (Ed.). (2002). *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*. Springer Science & Business Media.

117. Stojanović, N. M., Rajković, I., Raičević, V., Petković, M. N., Randjelović, P. J., & Radulović, N. S. (2022). Lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil moderately affects strychnine-induced and pentylenetetrazol-induced convulsions—in silico and in vivo studies. *Natural Product Communications*, 17(11), 1934578X221139961. doi.org/10.1177/1934578X221139961

118. Tescarollo, F. C., Rombo, D. M., DeLiberto, L. K., Fedele, D. E., Alharfoush, E., Tomé, Â. R., ... & Boison, D. (2020). Role of adenosine in epilepsy and seizures. *Journal of caffeine and adenosine research*, 10(2), 45-60. doi.org/10.1089/caff.2019.0022

119. Ghogare, J. G., Bhandari, S. V., Bothara, K. G., Madgulkar, A. R., Parashar, G. A., Sonawane, B. G., & Inamdar, P. R. (2010). Design, synthesis and pharmacological screening of potential anticonvulsant agents using hybrid approach. *European journal of medicinal chemistry*, 45(3), 857-863. doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.014

120. Mandhane, S. N., Aavula, K., & Rajamannar, T. (2007). Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with sc PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, *16*(7), 636-644. doi.org/10.1016/j.seizure.2007.05.005
121. Huang, X. (2016). Crystal Structure of Human Glycine Receptor- α 3 Bound to Antagonist Strychnine. *Biophysical Journal*, *110*(3), 201a-202a. doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.1125
122. Cheng, R. K., Segala, E., Robertson, N., Deflorian, F., Doré, A. S., Errey, J. C., ... & Cooke, R. M. (2017). Structures of human A1 and A2A adenosine receptors with xanthines reveal determinants of selectivity. *Structure*, *25*(8), 1275-1285. doi.org/10.1016/j.str.2017.06.012
123. Draper-Joyce, C. J., Bhola, R., Wang, J., Bhattarai, A., Nguyen, A. T., Cowie-Kent, I., ... & Christopoulos, A. (2021). Positive allosteric mechanisms of adenosine A1 receptor-mediated analgesia. *Nature*, *597*(7877), 571-576. doi.org/10.1038/s41586-021-03897-2
124. Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., ... & Stevens, R. C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, *322*(5905), 1211-1217. doi.org/10.1126/science.1164772
125. Xu, S., Hermanson, D. J., Banerjee, S., Ghebreselasie, K., Clayton, G. M., Garavito, R. M., & Marnett, L. J. (2014). Oxicams bind in a novel mode to the cyclooxygenase active site via a two-water-mediated H-bonding network. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(10), 6799-6808. doi.org/10.1074/jbc.m113.517987
126. Wang, J. L., Limburg, D., Graneto, M. J., Springer, J., Hamper, J. R. B., Liao, S., ... & Carter, J. (2010). The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *20*(23), 7159-7163. doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.054
127. Gilbert, N. C., Rui, Z., Neau, D. B., Waight, M. T., Bartlett, S. G., Boeglin, W. E., ... & Newcomer, M. E. (2012). Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-

lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *The FASEB Journal*, 26(8), 3222. doi.org/10.1096/fj.12-205286

128. Ho, J. D., Lee, M. R., Rauch, C. T., Aznavour, K., Park, J. S., Luz, J. G., ... & Norman, B. H. (2021). Structure-based, multi-targeted drug discovery approach to eicosanoid inhibition: Dual inhibitors of mPGES-1 and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1865(2), 129800. doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129800

129. Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of computational chemistry*, 17(5-6), 490-519. [doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)

130. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4(1), 17. doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

131. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), 3891-3898. doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

132. Morris, G. M., Huey, R., & Olson, A. J. (2008). Using autodock for ligand-receptor docking. *Current protocols in bioinformatics*, 24(1), 8-14. doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24

133. Fischer, L., Hornig, M., Pergola, C., Meindl, N., Franke, L., Tanrikulu, Y., ... & Werz, O. (2007). The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *British journal of pharmacology*, 152(4), 471-480. doi.org/10.1038/sj.bjp.0707416

134. Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of chemical information and modeling*, 48(7), 1411-1422. doi.org/10.1021/ci800084x

135. Ximenes, J. C. M., de Oliveira Gonçalves, D., Siqueira, R. M. P., Neves, K. R. T., Santos Cerqueira, G., Correia, A. O., ... & de Barros Viana, G. S. (2013). Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 386(7), 575-587. doi.org/10.1007/s00210-013-0853-4
136. Alsaegh, H., Eweis, H., Kamel, F., & Alrafiah, A. (2021). Celecoxib decrease seizures susceptibility in a rat model of inflammation by inhibiting HMGB1 translocation. *Pharmaceuticals*, 14(04), 380. doi.org/10.3390/ph14040380
137. Perucca, E. (2017). Cannabinoids in the treatment of epilepsy: hard evidence at last?. *Journal of epilepsy research*, 7(2), 61. doi.org/10.14581/jer.17012
138. Abdellatif, K. R., Abdelgawad, M. A., Elshemy, H. A., & Alsayed, S. S. (2016). Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. *Bioorganic chemistry*, 64, 1-12. doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.11.001
139. Shawky, A. M., Abourehab, M. A., Abdalla, A. N., & Gouda, A. M. (2020). Optimization of pyrrolizine-based Schiff bases with 4-thiazolidinone motif: Design, synthesis and investigation of cytotoxicity and anti-inflammatory potency. *European journal of medicinal chemistry*, 185, 111780. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111780
140. Finiuk, N., Kaleniuk, E., Holota, S., Stoika, R., Lesyk, R., & Szychowski, K. A. (2023). Pyrrolidinedione-thiazolidinone hybrid molecules with potent cytotoxic effect in squamous cell carcinoma SCC-15 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 92, 117442. doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117442
141. Tchorzewski, H., Krasomski, G., Biesiada, L., Głowacka, E., Banasik, M., & Lewkowicz, P. (2000). IL-12, IL-6 and IFN- γ production by lymphocytes of pregnant women with rheumatoid arthritis remission during pregnancy. *Mediators of Inflammation*, 9(6), 289-293. doi.org/ 10.1080/09629350020027609
142. Grygorenko, O. O., Radchenko, D. S., Dziuba, I., Chuprina, A., Gubina, K. E., & Moroz, Y. S. (2020). Generating multibillion chemical space of readily accessible screening compounds. *Iscience*, 23(11). doi.org/10.1016/j.isci.2020.101681

143. Perebyinis, M., & Rognan, D. (2023). Overlap of On-demand Ultra-large Combinatorial Spaces with On-the-shelf Drug-like Libraries. *Molecular Informatics*, 42(1), 2200163. doi.org/10.1002/minf.202200163
144. Wang, M., Li, S., Wang, J., Zhang, O., Du, H., Jiang, D., ... & Hsieh, C. Y. (2024). ClickGen: Directed exploration of synthesizable chemical space via modular reactions and reinforcement learning. *Nature Communications*, 15(1), 10127. doi.org/10.1038/s41467-024-54456-y
145. Hayashi, Y. (2020). Time economy in total synthesis. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(1), 1-23. doi.org/10.1021/acs.joc.0c01581
146. Savych, O., Kuchkovska, Y. O., Bogolyubsky, A. V., Konovets, A. I., Gubina, K. E., Pipko, S. E., ... & Grygorenko, O. O. (2019). One-pot parallel synthesis of 5-(dialkylamino) tetrazoles. *ACS combinatorial science*, 21(9), 635-642. doi.org/10.1021/acscombsci.9b00120
147. Graebin, C. S., Ribeiro, F. V., Rogério, K. R., & Kümmerle, A. E. (2019). Multicomponent reactions for the synthesis of bioactive compounds: A review. *Current Organic Synthesis*, 16(6), 855-899. doi.org/10.2174/1570179416666190718153703
148. Lozynskiy, A., Karkhut, A., Polovkovych, S., Karpenko, O., Holota, S., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2022). 3-Phenylpropanal and citral in the multicomponent synthesis of novel thiopyrano [2, 3-d] thiazoles. *Results in Chemistry*, 4, 100464. doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100464
149. Ismaili, L., & do Carmo Carreiras, M. (2017). Multicomponent reactions for multitargeted compounds for Alzheimers disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(31), 3319-3327. doi.org/10.2174/1568026618666180112155424
150. Radchenko, D. S., Naumchyk, V. S., Dziuba, I., Kyrylchuk, A. A., Gubina, K. E., Moroz, Y. S., & Grygorenko, O. O. (2022). One-pot parallel synthesis of 1, 3, 5-trisubstituted 1, 2, 4-triazoles. *Molecular diversity*, 26(2), 993-1004. doi.org/10.1007/s11030-021-10218-2
151. Hajizadeh, F., Mojtahedi, M. M., & Abae, M. S. (2023). One-pot four-component synthesis of novel isothiourea-ethylene-tethered-piperazine derivatives. *RSC advances*, 13(46), 32772-32777. doi.org/10.1039/d3ra06678a

152. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., Karkhut, A., Polovkovych, S., Gzella, A. K., & Lesyk, R. (2016). Application of the 2 (5H) furanone motif in the synthesis of new thiopyrano [2, 3-d] thiazoles via the hetero-Diels–Alder reaction and related tandem processes. *Tetrahedron Letters*, 57(30), 3318-3321. doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.060
153. Rapelli, C., Sridhar, B., & Reddy, B. S. (2020). Tandem Prins cyclization for the synthesis of indole fused spiro-1, 4-diazocane scaffolds. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(34), 6710-6715. doi.org/10.1039/d0ob01384f
154. Kumar, Y., & Ila, H. (2022). Domino synthesis of thiazolo-fused six-and seven-membered nitrogen heterocycles via intramolecular heteroannulation of in-situ-generated 2-(het) aryl-4-amino-5-functionalized thiazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 87(18), 12397-12413. doi.org/10.1021/acs.joc.2c01673
155. Fan, L., Zhu, X., Liu, X., He, F., Yang, G., Xu, C., & Yang, X. (2023). Recent Advances in the Synthesis of 3, n-Fused Tricyclic Indole Skeletons via Palladium-Catalyzed Domino Reactions. *Molecules*, 28(4), 1647. doi.org/10.3390/molecules28041647
156. Hoidyk, M., Karkhut, A., Polovkovych, S., & Lesyk, R. (2025). Synthesis, structural characterization and antitumor activity of new chromeno [4', 3': 4, 5] thiopyrano [2, 3-d] thiazole derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (5 (57)), 37-49. doi.org/10.15587/2519-4852.2025.341796
157. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., *et al.* (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at: <https://gco.iarc.who.int/today>
158. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249. doi.org/10.3322/caac.21660
159. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789. doi.org/10.1002/ijc.33588

160. Malvezzi, M., Santucci, C., Boffetta, P., Collatuzzo, G., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2023). European cancer mortality predictions for the year 2023 with focus on lung cancer. *Annals of Oncology*, *34*(4), 410-419. doi.org/10.1016/j.annonc.2023.01.010
161. Exploring the different types of cancer and treatment options (2023). Cancer Research Institute. Available at: <https://www.cancerresearch.org/blog/exploring-the-different-types-of-cancer-and-treatment-options>
162. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., ... & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer*, *103*, 356-387. doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005
163. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M. et al. (2018). Cancer today (powered by GLOBOCAN 2018): IARC CancerBase No. 15. Lyon: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>
164. Fidler, M. M., Gupta, S., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., & Bray, F. (2017). Cancer incidence and mortality among young adults aged 20–39 years worldwide in 2012: a population-based study. *The lancet oncology*, *18*(12), 1579-1589. doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30677-0
165. Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk?. *International journal of cancer*, *132*(2), 385-400. doi.org/10.1002/ijc.27616
166. Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The growing burden of invasive melanoma: projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(6), 1161-1171. doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035
167. Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., ... & Bray, F. (2022). Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA dermatology*, *158*(5), 495-503. doi.org/10.1001/jamadermatol.2022.0160
168. Prasad, S. M., Shishkov, D., Mihaylov, N. V., Khuskivadze, A., Genov, P., Terzi, V., ... & ENVISION Study Group. (2024). Primary chemoablation of recurrent low-

grade intermediate-risk nonmuscle-invasive bladder cancer with UGN-102: a single-arm, open-label, phase 3 trial (ENVISION). *Journal of Urology*, 10-1097. doi.org/10.1097/ju.00000000000004296

169. Williams, P. A., Zaidi, S. K., Sengupta, R. (2023). AACR Cancer Progress Report 2023: Advancing the Frontiers of Cancer Science and Medicine. *Clinical Cancer Research*, 29 (19), 3850–3851. doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-23-2591

170. Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring—A biologically active scaffold. *Molecules*, 26(11), 3166. doi.org/10.3390/molecules26113166

171. Ge, L., Hu, Q., Shi, M., Yang, H. and Zhu, G., 2017. Design and discovery of novel thiazole derivatives as potential MMP inhibitors to protect against acute lung injury in sepsis rats via attenuation of inflammation and apoptotic oxidative stress. *RSC advances*, 7(52), pp.32909-32922.

172. Patel, S., Patle, R., Parameswaran, P., Jain, A. and Shard, A., 2019. Design, computational studies, synthesis and biological evaluation of thiazole-based molecules as anticancer agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 134, pp.20-30.

173. Anh, D.T., Hai, P.T., Park, E.J., Jun, H.W., Kang, J.S., Kwon, J.H., Anh, V.T., Han, S.B. and Nam, N.H., 2020. Exploration of certain 1, 3-oxazole-and 1, 3-thiazole-based hydroxamic acids as histone deacetylase inhibitors and antitumor agents. *Bioorganic Chemistry*, 101, p.103988.

174. de Santana, T.I., de Oliveira Barbosa, M., de Moraes Gomes, P.A.T., da Cruz, A.C.N., da Silva, T.G. and Leite, A.C.L., 2018. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 144, pp.874-886.

175. Aly, A.A., Bräse, S., Hassan, A.A., Mohamed, N.K., El-Haleem, L.E.A., Nieger, M., Morsy, N.M., Alshammari, M.B., Ibrahim, M.A. and Abdelhafez, E.M., 2020. Design, synthesis, and molecular docking of paracyclophanyl-thiazole Hybrids as novel CDK1 inhibitors and apoptosis inducing anti-melanoma agents. *Molecules*, 25(23), p.5569.

176. Matiychuk, V. S., Lesyk, R. B., Obushak, M. D., Gzella, A., Atamanyuk, D. V., Ostapiuk, Y. V., & Kryshchyshyn, A. P. (2008). A new domino-Knoevenagel-hetero-

Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, 49(31), 4648-4651.
doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.05.062

177. Cremer, D. T., & Pople, J. A. (1975). General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, 97(6), 1354-1358.
doi.org/10.1021/ja00839a011

178. Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor, R. (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), S1-S19. doi.org/10.1039/P298700000S1

179. Festing, M. F., & Altman, D. G. (2002). Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR journal*, 43(4), 244-258.
doi.org/10.1093/ilar.43.4.244

180. Gasparro, F. P., & Kolodny, N. H. (1977). *NMR determination of the rotational barrier in N,N-dimethylacetamide: A physical chemistry experiment*. *Journal of Chemical Education*, 54(4), 258–260. <https://doi.org/10.1021/ed054p258>