

АНОТАЦІЯ

Федотов С. О. Синтез та властивості *S*-похідних 4-аміно-5-(5-*R*-піразол-3-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу та продуктів їх хімічних перетворень. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія» (226 – Фармація, промислова фармація). – Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2023.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню практично значимих методів синтезу біоактивних сполук в ряду *S*-похідних 4-аміно-5-(5-*R*-піразол-3-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу і продуктів їх хімічної трансформації, а також стратегії пошуку біологічно активних агентів з потенційною протимікробною, протигрибковою, протизапальною, антиоксидантною активністю, встановленню певних закономірностей «структура-біологічна дія», виявленню оптимальних напрямів хімічної модифікації з метою підвищення фармакологічних характеристик та подальшим рекомендаціям щодо сполук, які можуть бути кандидатами для створення біологічно активної субстанції.

Вагоме значення цієї роботи полягає в тому, що вона розширює можливості та створює додаткові перспективи для подальших досліджень у сфері розробки потенційних лікарських препаратів. Інноваційні знання, одержанні в ході виконання дисертаційного дослідження, можуть стати цінним внеском у розвиток сучасної медицини та фармації.

Значна частина досліджень у фармацевтичній галузі націлена на створення нових перспективних біологічно активних сполук, зокрема, на основі гетероциклів. Похідні 1,2,4-триазолу та піразолу є одними з найбільш досліджених класів з доведеним потенціалом фармакологічної активності, що було підтверджено проведеним аналізом літературних джерел останніх років. Також за даними наукової літератури показані широкі можливості в сфері

хімічного конструювання нових молекул, які представляють собою симбіоз фрагментів 1,2,4-триазолу та піразолу і дозволяють створювати перспективні біологічно активні сполуки. Всебічний аналіз літератури дозволив виявити ряд питань, які пов'язані з розширенням можливостей в сфері синтезу перспективних похідних зазначених гетероциклічних систем і тому потребують вирішення.

В процесі практичної реалізації наукових досліджень були обговорені особливості формування структури та синтезовано три вихідні речовини – 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол, 4-аміно-5-(3-(3-фторофеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол та 4-аміно-5-(3-(4-метоксифеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол за допомогою внутрішньомолекулярної лужної гетероциклізації відповідних заміщених гідразинокарботіоамідів. Синтез цільових продуктів хімічного перетворення включав кілька послідовних кроків.

Початковим етапом була взаємодія заміщених ацетофенонів, а також ацетону з діетилноксалатом в середовищі метанолу у присутності натрій метилату. Утворені в результаті зазначеної взаємодії заміщені етил 2,4-діоксопентаноатициклізували в середовищі пропан-2-олу з додаванням подвійного надлишку гідразин гідрату, що супроводжувалось формуванням відповідно етил 3-метил-піразол-5-метаноату, етил 3-(3-фторофеніл)піразол-5-метаноату та етил 3-(4-метоксифеніл)піразол-5-метаноату.

Подальше додавання гідразин гідрату призводило до утворення продуктів хімічного перетворення у вигляді гідразидів, а саме: 3-метилпіразол-5-карбогідрзиду, 3-(3-фторофеніл)піразол-5-карбогідрзиду та 3-(4-метоксифеніл)піразол-5-карбогідрзиду.

Далі реалізовувалась взаємодія відповідних гідразидів з карбон дисульфідом з наступною циклізацією в середовищі гідразин гідрату та кінцевим підкисленням кислотою етановою до нейтрального середовища, що в результаті дало змогу одержати 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол, 4-аміно-5-(3-(3-фторофеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол та 4-аміно-5-(3-(4-метоксифеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол.

Наступним кроком був синтез *S*-алкілпохідних 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу та 4-аміно-5-(3-(3-фторофеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу. Алкілювання вихідних тіолів проводили відповідними галогеналканами в середовищі пропан-1-олу в присутності еквівалентної кількості натрій гідроксиду. Як алкілюючі агенти були обрані йодометан, бромоетан, 1-бромпропан, 1-бромобутан, 1-бромопентан, 1-бромогексан, 1-бромогептан, 1-бромооктан, 1-бромонonan та 1-бромодекан.

В подальшому вивчалась реакція взаємодії 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-3-(алкілтіо)-1,2,4-триазолу з надлишком триетоксиметану при кип'ятінні, в результаті було одержано 9-метил-3-(алкілтіо)піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазини.

Для 4-аміно-3-(етилтіо)-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазолу було досліджено реакцію взаємодії з калій етилксантогенатом в середовищі пропан-2-олу при інтенсивному перемішуванні. Як результат було одержано 3-(етилтіо)-9-метил-6-(алкілтіо)піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазини.

З метою розширення арсеналу перспективних сполук було синтезовано проміжний 4-((2,6-дихлоробензиліден)аміно)-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол в результаті нуклеофільного приєднання 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу до 2,6-дихлоробензальдегіду. Хімічна взаємодія реалізовувалась в середовищі кислоти етанової при нагріванні.

Подальші синтетичні дослідження включали в себе одержання карбонільних похідних за участі заміщених α -галогенкетонів та 4-((2,6-дихлоробензиліден)аміно)-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу. Дані реагенти при тривалому перемішуванні в середовищі тетрагідрофурану сприяли утворенню (6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метилпіразол-5-іл)-6,7-дигідро[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]-[1,3,4]тіадіазин-7-іл)(*R*-феніл)метанонів.

Наступним етапом роботи було одержання 2-((4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)алканових кислот шляхом алкілювання вихідного 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу відповідними 2-бромпропановою та 2-бром-3-метилбутановою кислотами в середовищі пропан-2-олу.

Також в результаті реакції взаємодії інтермедіату 4-((2,6-дихлоробензиліден)аміно)-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу з хлороетановою кислотою в середовищі тетрагідрофурану було синтезовано 6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метилпіразол-5-іл)-6,7-дигідро[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-карбонову кислоту.

Синтез естерів відповідних кислот проводили методом алкілуванням 4-аміно-5-(3-метилпіразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу метиловим, етиловим та ізопропіловиместерами 2-бромпропанової та 2-бром-3-метилбутанової кислоти за участі еквівалентної кількості натрій гідрогенкарбонату.

Солі 6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метилпіразол-5-іл)-6,7-дигідро[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-карбонової кислоти одержували взаємодією зазначеної кислоти з неорганічними та органічними основами у водно-спиртовому середовищі.

Подальші дослідження актуальних напрямків перетворення вихідного 4-аміно-5-(3-(4-метоксифеніл)піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу дозволили встановити, що в реакції взаємодії з карбонілдімідазолом в середовищі 1,4-діоксану з попереднім захистом тіольної групи відбувається формування 9-(4-метоксифеніл)-3-(метилтіо)піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазин-6-ону. Показано, що використання трифторометансульфонового ангідриду дозволяє створювати умови для активного залучення карбонільного вуглецю до реакції взаємодії з *Вос*-захищеним піперазином. Зазначений процес відбувається у дві стадії. На першій стадії в середовищі дихлорометану у присутності *N,N*-діізопропілетиламіну відбувається утворення 9-(4-метоксифеніл)-3-(метилтіо)піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазин-6-іл трифлуорометансульфонату. На другій стадії одержаний сульфонат був залучений до взаємодії з *Вос*-піперазином, що дозволило ввести до структури досліджуваної сполуки піперазиновий фрагмент та після деблокування *Вос*-захисту за допомогою хлоридної кислоти в середовищі 1,4-діоксану одержати 9-(4-метоксифеніл)-3-(метилтіо)-6-(піперазин-1-іл)піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазин гідрохлорид.

Наступний етап функціоналізації передбачав введення карбонільної групи до структури синтезованого 9-(4-метоксифеніл)-3-(метилтіо)-6-(піперазин-1-іл)-піразоло[1,5-*d*][1,2,4]триазоло[3,4-*f*][1,2,4]триазин гідрохлориду шляхом взаємодії з хлорангідрідами алкіл-, арил- та гетерилкарбонових кислот. Реакція успішно відбувається в середовищі дихлорометану в присутності триетиламіну.

Фізико-хімічні, а також спектральні характеристики нових *S*-похідних 4-аміно-5-(3-*R*-піразол-5-іл)-1,2,4-триазол-3-тіолу було встановлено за допомогою сучасного набору методів аналізу, включаючи ІЧ- та ¹H-ЯМР-спектроскопію, елементний аналіз, хромато-мас-спектрометрію.

Біологічні дослідження проводились на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології (в. о. зав. каф. к. мед. н., доцент Количева Н. Л.), навчально-наукового медико-лабораторного центру з віварієм (керівник - д. фарм. н., професор кафедри природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії Щербина Р. О.) Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, навчально-науково-виробничої клініки ветеринарної медицини Полтавської державного аграрного університету (завідувач к. вет. н., доцент Звенігородська Т. В.)

В ході проведеного дослідження було одержано 81 сполуку, які були піддані біологічному тестуванню для оцінки їх гострої токсичності, протимікробної, протигрибкової, антиоксидантної та аналгетичної активності. З цих сполук було виділено найбільш активні. Крім цього, були виявлені певні зв'язки між хімічною структурою та біологічною активністю цих речовин.

Для подальших поглиблених фармакологічних досліджень рекомендовано 2 сполуки, які проявляли найвищий потенціал біологічної активності.

Серед них ізопропіл 6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метилпіразол-5-іл)-6,7-дигідро[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-етаноат, який проявляє протигрибкову дію та продемонстрував задовільні показники аналгетичної активності та (6-(2,6-дихлорофеніл)-3-(3-метилпіразол-5-іл)-6,7-дигідро[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)(феніл)метанон, який виступив потенційним антиоксидантним агентом. Наведені похідні 1,2,4-триазолу являються

перспективними кандидатами для удосконалення, подальшого вивчення і майбутньої розробки нових засобів терапевтичного спрямування.

Ключові слова: 1,2,4-триазол, піразол, синтез, фізико-хімічні властивості, біологічна активність, молекулярний докінг, антиоксидантна активність, протимікробна активність, аналгетична активність.

ABSTRACT

Fedotov S. O. Synthesis and properties of *S*-derivatives of 4-amino-5-(5-*R*-pyrazol-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol and products of their chemical transformations. - Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of philosophy in the specialty 15.00.02 "Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy" (226 – Pharmacy, Industrial Pharmacy). - Zaporizhia State Medical and Pharmaceutical University of the Ministry of health of Ukraine, Zaporizhia, 2023.

The dissertation is devoted to a comprehensive study of practically significant methods for the synthesis of bioactive compounds in a number of *S*-derivatives of 4-amino-5-(5-*R*-pyrazol-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol and their chemical transformation products, as well as strategies for finding biologically active agents with potential antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant activity, establishing certain regularities "structure-biological action", identifying optimal directions of chemical modification in order to improve pharmacological characteristics and further recommendations about connections, which can be candidates for creating a biologically active substance.

The significant importance of this work is that it expands opportunities and creates additional prospects for further research in the development of potential drugs. Innovative knowledge gained in the course of dissertation research can become a valuable contribution to the development of modern medicine and pharmacy.

A significant part of research in the pharmaceutical industry is aimed at creating new promising biologically active compounds, in particular, based on heterocycles.

Derivatives of 1,2,4-triazole and pyrazole are among the most studied classes with proven potential for pharmacological activity, which was confirmed by the analysis of literature sources in recent years. Also, according to the scientific literature, wide opportunities in the field of chemical construction of new molecules are shown, which are a symbiosis of fragments of 1,2,4-triazole and pyrazole and allow creating promising biologically active compounds. A comprehensive analysis of the literature revealed a number of issues that are related to expanding opportunities in the field of synthesis of promising derivatives of these heterocyclic systems and therefore need to be addressed.

In the course of practical implementation of scientific research, the features of structure formation were discussed and three starting substances were synthesized – 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol, 4-amino-5-(3-(3-fluorophenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol and 4-amino-5-(3-(4-methoxyphenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol by intramolecular alkaline heterocyclization of the corresponding substituted hydrazine carbonylamides. The synthesis of target chemical transformation products involved several consecutive steps.

The initial stage was the interaction of substituted acetophenones, as well as acetone with diethyl oxalate in a methanol medium in the presence of sodium methylate. The substituted ethyl 2,4-dioxopentanoates formed as a result of this interaction were cyclized in a propan-2-ol medium with the addition of a double excess of hydrazine hydrate, which was accompanied by the formation of ethyl 3-methylpyrazole-5-methanoate, ethyl 3-(3-fluorophenyl)pyrazole-5-methanoate and ethyl 3-(4-methoxyphenyl)pyrazole-5-methanoate, respectively.

Further addition of hydrazine hydrate led to the formation of chemical conversion products in the form of hydrazides, namely: 3-methylpyrazole-5-carbohydrazide, 3-(3-fluorophenyl)pyrazole-5-carbohydrazide and 3-(4-methoxyphenyl)pyrazole-5-carbohydrazide.

Further, the interaction of the corresponding hydrazides with carbon disulfide was implemented, followed by cyclization in the hydrazine hydrate medium and final acidification with ethanoic acid to a neutral medium, which eventually allowed us to

obtain 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol, 4-amino-5-(3-(3-fluorophenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-yl) thiol and 4-amino-5-(3-(4-methoxyphenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol.

The synthesis of *S*-alkyl derivatives 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol to 4-amino-5-(3-(3-fluorophenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol. Alkylation of these compounds was carried out with two-sided halogenalkanes in the middle of propan-1-ol in the presence of an equivalent amount of sodium hydroxide. Iodomethane, bromoethane, 1-bromopropane, 1-bromobutane, 1-bromopentane, 1-bromohexane, 1-bromoheptan, 1-bromooctane, 1-bromononane and 1-bromodecane were chosen as alkylating agents.

Further, the reaction of the interaction of 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-3-(alkylthio)-1,2,4-triazole with an excess of triethoxymethane during boiling was studied, resulting in 9-methyl-3-(alkylthio)pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]-triazines.

For 4-amino-3-(ethylthio)-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole, the reaction of interaction with potassium ethylxanthogenate in a propane-2-ol medium under intensive mixing was studied. As a result, 3-(ethylthio)-9-methyl-6-(alkylthio)pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines were obtained.

In order to expand the arsenal of promising compounds, the intermediate 4-((2,6-dichlorobenzylidene)amino)-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol was synthesized as a result of the nucleophilic addition of 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol to 2,6-dichlorobenzaldehyde. The chemical interaction was realized in an ethanoic acid medium when heated.

Further synthetic studies included the production of carbonyl derivatives involving substituted α -halogenketones and 4-((2,6-dichlorobenzylidene)amino)-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol. These reagents, when mixed for a long time in a tetrahydrofuran medium, contributed to the formation of (6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methylpyrazol-5-yl)-6,7-dihydro[1,2,4]triazolo[3,4-*b*]-[1,3,4]thiadiazine-7-yl)(*R*-phenyl)methanones.

The next stage of work was the production of 2-((4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazol-3-yl)alkanoic acids by alkylation of the initial 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol with the corresponding 2-bromopropane and 2-bromo-3-methylbutanoic acids in a propane-2-ol medium. Also, as a result of the interaction of the 4-((2,6-dichlorobenzylidene)amino)-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol Intermediate with chloroethanic acid, 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methylpyrazol-5-yl)-6,7-dihydro[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid, was synthesized in a tetrahydrofuran medium.

The synthesis of esters of the corresponding acids was carried out by alkylation of 4-amino-5-(3-methylpyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol with methyl, ethyl and isopropyl esters of 2-bromopropane and 2-bromo-3-methylbutanoic acid with the participation of an equivalent amount of sodium hydrogencarbonate.

Salts of 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methylpyrazol-5-yl)-6,7-dihydro[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-carboxylic acid were obtained by interacting this acid with inorganic and organic bases in a water-alcohol medium.

Further studies of the actual conversion directions of the initial 4-amino-5-(3-(4-methoxyphenyl)pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol allowed us to establish that in the reaction of interaction with carbonyldiimidazole in a 1,4-dioxane medium with preliminary protection of the thiol group, 9-(4-methoxyphenyl)-3-(methylthio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine-6-on. It is shown that the use of trifluoromethanesulfone anhydride allows creating conditions for the active involvement of carbonyl carbon in the reaction of interaction with *Boc*-protected piperazine. This process takes place in two stages.

At the first stage, 9-(4-methoxyphenyl)-3-(methylthio)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine-6-yl trifluoromethanesulfonate is formed in the dichloromethane medium in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine. At the second stage, the obtained sulfonate was involved in interaction with *Boc*-piperazine, which made it possible to introduce a piperazine fragment into the structure of the studied compound and, after unblocking the *Boc* protection with hydrochloric acid in a 1,4-

dioxane medium, to obtain 9-(4-methoxyphenyl)-3-(methylthio)-6-(piperazine-1-yl)pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine hydrochloride.

The next stage of functionalization involved the introduction of a carbonyl group into the structure of synthesized 9-(4-methoxyphenyl)-3-(methylthio)-6-(piperazine-1-yl)-pyrazolo[1,5-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazine hydrochloride by interaction with alkyl-, aryl - and heteryl carboxylic acid chloranhydrides. The reaction successfully occurs in a dichloromethane medium in the presence of triethylamine.

The physicochemical and spectral characteristics of the new *S*-derivatives of 4-amino-5-(3-*R*-pyrazol-5-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol were established using a modern set of analysis methods, including IR and ¹H NMR spectroscopy, elemental analysis, and chromatography - mass spectrometry.

Biological studies were conducted on the basis of the Department of microbiology, virology and immunology (acting head of the department, Candidate of Medical Sciences, associate professor Kolycheva N. L.), the educational and scientific medical laboratory center with a vivarium (head- Doctor of Pharmaceutical Sciences, associate professor of the Department of natural sciences for foreign students and toxicological chemistry Shcherbyna R. O.) Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, educational and scientific and production clinic of veterinary medicine of Poltava State Agrarian University (head - Candidate of Veterinary Sciences, associate professor Zvenigorodskaya T. V.)

In the course of the study, 81 compounds were obtained, which were subjected to biological testing to assess their acute toxicity, antimicrobial, antifungal, antioxidant and analgesic activity. Of these compounds, the most active ones were isolated. In addition, certain connections were found between the chemical structure and biological activity of these substances.

For further in-depth pharmacological studies, 2 compounds that showed the highest potential for biological activity are recommended. Among them there is isopropyl 6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(3-methylpyrazol-5-yl)-6,7-dihydro[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-ethanoate, which exhibits an antifungal effect and has demonstrated satisfactory indicators of analgesic activity and (6-(2,6-dichlorophenyl)-3-

(3-methylpyrazol-5-yl)-6,7-dihidro[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-yl)(phenil)-methanon, which acted as a potential antioxidant agent. These derivatives of 1,2,4-triazole are promising candidates for improvement, further study and future development of new therapeutic agents.

Key words: 1,2,4-triazole, pyrazole, synthesis, physico-chemical properties, biological activity, molecular docking, antioxidant activity, antimicrobial activity, analgesic activity.