

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
Праця на правах рукопису

**Ель Кайал Вассім Мохамад**

УДК 615.214:54.057:547:466.22:547.856

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості арил-(алкіл)амідів  
(2,4-діоксо-/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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



В. М. Ель Кайал

Науковий керівник Северіна Ганна Іванівна, доктор фармацевтичних наук,  
доцент

Харків – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Ель Кайал В.М.* Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості арил-(алкіл)амідів (2,4-діоксо-/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

У дисертаційній роботі наведено практичне вирішення наукової задачі спрямованого пошуку потенційних протисудомних засобів в ряду похідних хіназолін-4(3*H*)-ону. За результатами експериментальних досліджень обґрунтована модифікація структури хіназолін-4(3*H*)-ону, здійснено спрямований синтез його алкіл/арилацетамідних похідних, визначено їх фізико-хімічні властивості, *in silico* прогноз та *in vivo* дослідження фармакологічних властивостей та обрано потенційний інноваційний АФІ – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)-метил]-ацетамід.

Вважається, що переважним вектором фармакологічного впливу похідних хіназолін-4(3*H*)-ону є регуляція діяльності ЦНС через виражену позитивну алостеричну модуляцію ГАМК<sub>A</sub> рецептора. Зокрема, яскравим прикладом є препарат метаквалон із потужною протисудомною, гіпнотичною та снодійною активністю. Модифікацією його структури були одержані антиковульсанти зі спектром активності на моделях хемотоксичних та електрошокових судом, однак наразі жоден не застосовується через здатність викликати звикання. Зважаючи на пріоритетність напрямку раціонального «drug design» щодо варіації структури відомих лікарських засобів для досягнення більш сприятливого фармакологічного профілю, саме модифікація будови хіназолін-4(3*H*)-ону для пошуку протисудомних засобів є виправданою та обнадійливою. Крім того, хіназолін є бензанельованим аналогом піримідину, протисудомні властивості якого відомі з часів відкриття фенобарбіталу та неодноразово доведені міжнародною науковою спільнотою.

За результатами літературного огляду вивчено наявні варіанти синтезу хіназолін-4(3*H*)-ону та обґрунтовано варіабельність скафолду для легкого конструювання бажаних сполук з введенням цільових фармакофорів в структуру гетероциклу. Аналіз результатів вивчення фармакологічної активності похідних хіназолін-4(3*H*)-ону засвідчив пріоритетність їх впливу на ЦНС та доцільність пошуку протисудомних агентів.

На початковому етапі після аналізу літературних даних для раціоналізації експерименту було розроблено дизайн дослідження з першочерговим вибором головного скафолду – хіназолін-4(3*H*)-ону та наступних експериментальних методів. Ґрунтуючись на постулатах сучасної фармакофорної моделі протисудомної активності, магістральним напрямком обрано введення дистальної області в структуру метаквалону, замінивши метилфенільний радикал у 3 положенні на залишок оцтової кислоти, що поєднало хіназоліновий скафолд із нейротропним медіатором – гліцином. Віртуальна база протисудомних агентів склала 298 речовин. Спрогнозовано афінність структур-лігандів до протисудомних біомішеней: сайт бенздіазепінів ГАМК<sub>A</sub> рецептора, сайти інгібіторів NMDA та AMPA – рецепторів, а також – інгібітора карбонової ангідрази II. Здійснено ранжування структур-кандидатів для синтезу за показником афінності до ГАМКергічних та глутаматергічних біомішеней та обрано 50 сполук для синтезу.

Реакцію циклізації метилового естеру 2-ізотіоціанобензойної кислоти з гліцином при кип'ятінні в середовищі пропанолу-2 впродовж 30 хвилин у присутності триетиламіну синтезовано головний білдинг-блок дослідження – (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтову кислоту. Амідування останньої здійснено "one-pot" методом при взаємодії з N,N'-карбонілдіімідазолом за кип'ятіння у діоксані та подальшою взаємодією проміжного ацилімідазолу з відповідними алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами. Синтезовані 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміди досліджено на PTZ-моделі судом та визначено низькі показники протисудомної активності. Здійснено SAR-аналіз та виявлено певні закономірності.

На наступному етапі апробовано різні підходи, що описані в літературі, та розроблено новий препаративний підхід до синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти як білдинг-блоку дослідження, який одержано окисненням гідрогену пероксидом за 70 °С раніше синтезованої 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти. Синтезовано нові неописані раніше похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміди шляхом амідування 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти відповідними алкіл-, аліл- та ариламинами в безводному діоксані в присутності *N,N'*-карбонілдіімідазолу. Будова та індивідуальність усіх синтезованих речовин підтверджена ТШХ, LC/MS та елементним аналізом, <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопією. За результатами проведеного фармакологічного скринінгу на моделі PTZ-індукованих судом у мишей визначено чотири похідні з потужним протисудомним потенціалом, одна з яких перевищувала за усіма показниками референс-препарат натрій вальпроат. Сформульовано деякі закономірності залежності структура-протисудомна активність, загалом похідні хіназолін-2,4-діону продемонстрували ліпші показники захисту від судом у порівнянні з їх 2-тіоксо-4-оксоаналогів.

Чотири «сполуки-хіти» були досліджені на показники нейротоксичності у тесті стрижня, що обертається. Жодна з речовин не чинила негативного впливу на координацію руху мишей та не мала міорелаксатної активності. За найліпшими показниками фармакологічного профілю для подальших досліджень обрано 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід для якого було визначено гостру токсичність (LD<sub>50</sub> >5000 мг/кг).

Для прогнозування активності на MES моделі судом проведено молекулярний докінг найактивнішої речовини в активні сайти інгібіторів метаботропних глутаматних рецепторів mGlu5 та іонотропних AMPA-рецепторів глутамату. Передбачено низьку вірогідність активності на цій моделі через помірну афінність та незадовільне конформаційне розміщення щодо референс-лігандів в сайтах зв'язування, що і було підтверджено в

експерименті *in vivo* – «сполука-хіт» 2,4-дихлоробензилацетамідна похідна не чинила виразної активності, достовірно зменшувалася лише тривалість судомного періоду та летальності до 33%.

Помірна активність на MES моделі «сполуки-хіта» зумовила подальшу модифікацію структури. Для можливого покращення параметрів активності, а також визначення ролі циклічного  $\text{NHC}=\text{O}$  фрагмента на прояв протисудомної дії сконструйовано 1-бензил- та 1-арилацетамідні похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетаміду. Алкілювання проводили у традиційних умовах шляхом взаємодії з відповідними бензилхлоридами та 2-хлорацетамідами у середовищі диметилформаміду в присутності надлишку калій карбонату за температури 70-80 °С. Структура синтезованих сполук та їх індивідуальність доведена методами ТШХ, LC/MS, елементним аналізом,  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії (для чотирьох сполук).

Відбір сполук-кандидатів для *in vivo* експерименту здійснювали за показником афінності в активні сайти позитивного алостеричного модулятора бензамідину та бенздіазепіну  $\text{GAMK}_A$  рецептора та сайт інгібітора ферменту  $\text{GAMK}_{AT}$ . Помірний рівень афінності розраховано лише до бенздіазепінового сайту, до того ж при деталізації конформаційного розміщення визначено, що саме замісники у 1 положенні взаємодіють з амінокислотами – тирозином та серином, які не формують активний сайт в експерименті. За результатами скринінгу на PTZ моделі судом визначено повну втрату активності модифікованих похідних та визначено позитивну кореляцію між результатами *in vivo* та *in silico* дослідженнями.

Проведено дослідження спектра протисудомної активності на хемотоксичних моделях судом 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду. Кожному етапу *in vivo* експерименту передував *in silico* прогноз афінності до таргетів відповідно до механізму проконвульсивної дії хемотоксинів. Для «сполуки-лідера» визначено широкий та потужний спектр протисудомної активності на моделях судом, індукованих пікротоксином, стрихніном, кофеїном. Визначено відсутність впливу на

судоми, що їх спричинено тіосемікарбазидом. Інструментами молекулярного докінгу визначено афінність досліджуваної речовини до протисудомних біомішеней, передбачено механізм реалізації активності та визначено кореляцію *in vivo* та *in silico* результатів: антагонізм до PTZ та пікротоксину – стимулювання ГАМКергічних механізмів внаслідок позитивної алостеричної модуляції бенздіазепінового сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора; антагонізм з кофеїном – модуляція аденозинергічної ланки через конкурентне інгібування А<sub>2A</sub> рецепторів; активність на стрихнін-індукованих судамах – гліцинергічний механізм через інгібування Gly-рецепторів. Прогнозовано механізм реалізації протисудомного ефекту «сполуки-лідера» через модуляцію метаботропних mGlu8 (сайт селективного агоніста) та іонотропних NMDA-рецепторів глутамату (сайт антагоністів), а також інгібування карбонової ангідрази II, що передбачає активність на моделі PTZ-кіндлінгу та електроіндукованих судом, відповідно.

За показниками фармакологічного профілю розкрито перспективність подальшого поглибленого дослідження «сполуки-лідера» 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду з визначенням нейрохімічних механізмів, додаткових параметрів токсичності та супутніх видів фармакологічної активності.

*Ключові слова:* хіназолін-4(3*H*)-он, гліцин, спрямований синтез, молекулярний докінг, протисудомна активність.

*Список публікацій здобувача:*

1. El Kayal W. M., Shtrygol S. Y., Zalevskyi S. V., Shark A. A., Tsyvunin V. V., Kovalenko S. M., Bunyatyan N. D., Perekhoda L. O., Severina H. I., Georgiyants V. A. Synthesis, *in vivo* and *in silico* anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134–142. (Q1, Scopus, Web of Science). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.085> (Особистий внесок – проведення літературного пошуку,

- експериментальних синтетичних досліджень, докінгових досліджень, аналіз результатів спектральних даних, підготовка статті до друку).
2. El Kayal W., Severina H., Tsyvunin V., Zalevskyi S., Shtrygol' S., Vlasov S., Golovchenko O., Kovalenko S., Georgiyants, V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1*H*-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69. (Q3, Scopus). <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.253554> (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, синтетичні дослідження та інтерпретація спектральних даних, проведення докінгових досліджень, підготовка статті до друку)
  3. Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. Promising anticonvulsant N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1*H*-quinazolin-3-yl)acetamide: dose-dependent study and evaluation of anticonvulsant action spectrum in vivo and in silico. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2022. Vol. 71. P. 224-233. (Q3, Scopus) <https://doi.org/10.5817/CSF2022-5-224> (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, проведення та інтерпретація даних докінгових досліджень, підготовка статті до друку)
  4. Ель Кайал В., Залевський С. В., Абу Шарк А. І., Штриголь С. Ю., Бур'ян Г. О., Цивунін В. В., Георгіянци В. А., Коваленко, С. М. Похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідро-2*H*-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію: пат. 137806 на корисну модель, №U 2019 03594 ; заявл. 08.04.2019 ; опубл. 11.11.19, Бюл. № 21. (Особистий внесок – брав участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
  5. El Kayal W., Abu Sharkh A. I., Burian G. O. Perspectives of biologically active compounds creation in the range of (2,4-dioxo-(2-thio-4-oxo)quinazolin-3-yl)acetic acid derivatives. *9th international conference of pharmacy «Science*

- and practice 2019»* : the book of abstracts of 50<sup>th</sup> Conference, Kaunas, Lithuania, November 9th, 2018. Kaunas, 2018. P. 52.
6. El Kayal W., Abu Sharkh A. I., Burian G. O. Synthesis of biologically active compounds in the range of (2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-2*H*-quinazolin-3-yl)-acetamide derivative. *Topical issues of new medicines development*: мат. XXVI міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 10-12 квіт. 2019 р., м. Харків: НФаУ, 2019. С. 9–10.
  7. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пиримидин- и хиназолин-4(3*H*)-онов. *Сучасна фармація : історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
  8. Severina H. I., El Kayal W. M., Georgiyants V. A. The algorithm of virtual screening and prediction of the promising anticonvulsants' mechanism of action. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. II наук.-практ. Інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 41–42.
  9. El Kayal W. M., Severina H. I., Georgiyants V. A. Molecular docking studies of the N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1*H*-quinazolin-3-yl)acetamide of the active site of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>A</sub>T. *Science and practice 2019* : the 10th International pharmaceutical conference, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 109.
  10. El Kayal W. M., Severina H. I. Synthesis of acetamide derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline as perspective anticonvulsants. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international



- involvement, Kyiv, November 21, 2019, «Farmak» JSC, Ukraine; Укр. Мед. Часопис, 6 (134), Т. 2 – XI/XII 2019 с. 17-18.
11. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Дизайн потенциальных антиконвульсантов среди производных хиназолин-4(3H)-онов. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження* : матеріали наук.-практ. дистанційної міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. С. 139.
  12. Ель Кайал В.М., Северина А. И., Георгиянц В. А. Синтез 1-бензилзамещенных производных N-[(2,4-дихлорофенил)метил]-2-(2,4-диоксо-1H-хиназолин-3-ил)ацетамида как возможных противосудорожных агентов. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : сб. матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 138–141.
  13. Severina H. I., El Kayal W. M., abu Shark A., Georgiyants V. A. Synthesis of 1-acetamide derivatives of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide as new anticonvulsant agents. *100 years of success and quality* : materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy. Kharkiv, October 18th, 2021, Kharkiv: НФаУ, 2021. P. 42.
  14. Северіна Г., Ель Кайал В., Абу Шарк А., Головченко О., Георгіянц В. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1H-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021*: мат. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 82.

15. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування* : мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7–10.

### ANNOTATION

*El Kayal V.M.* Synthesis, physicochemical and pharmacological properties of aryl-(alkyl)amides of (2,4-dioxo-/2-thio-4-oxo)-quinazolin-3-yl)acetic acids. – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for obtaining a Philosophy Doctor scientific degree in specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy» (22 – Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis shows a practical solution to the scientific problem of a targeted search for potential anticonvulsants among quinazolin-4(3*H*)-one derivatives. According to the results of experimental studies, the structure modification of quinazolin-4(3*H*)-one was substantiated, the directed synthesis of its alkyl/arylacetamide derivatives was carried out, their physicochemical properties were determined, *in silico* prediction and *in vivo* studies of pharmacological properties were carried out, and a potential innovative API was selected – 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)-N-[(2,4-dichlorophenyl)-methyl]-acetamide.

It is considered that the CNS activity regulation through pronounced GABA receptor positive allosteric modulation is the dominant vector of the pharmacological effect of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives. In particular, a clear example is the drug methaqualone with a pronounced anticonvulsant, hypnotic and soporific activity. Anticonvulsants with a spectrum of activity on models of chemotoxic and electroshock seizures were obtained by modifying of its structure, but currently none of them are used due to addiction ability. Considering the priority of the rational «drug design» direction regarding the variation of the known drugs structure in order to achieve a more favorable pharmacological profile, modification of quinazolin-

4(3*H*)-one structure for the search of anticonvulsants was namely justified and encouraging. In addition, quinazoline can be considered as a benzenellated analogue of pyrimidine, whose anticonvulsant properties have been known since phenobarbital discovery and have been repeatedly proven by the international scientific community.

According to the literature review results, the available options for the synthesis of quinazolin-4(3*H*)-one were studied and the variability of the scaffold for easy construction of the desired compounds with target pharmacophores introduction into the heterocycle structure was substantiated. The analysis of the results of the study of the pharmacological activity of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives proved the priority of their effect on the CNS and the expediency of the search for anticonvulsant agents.

At the initial stage, after the literature data analysis, a research design was developed for the experiment rationalization with the following primary choice of the main scaffold – quinazolin-4(3*H*)-one and subsequent experimental methods. Based on the postulates of the modern pharmacophore model of anticonvulsant activity, the main direction was the distal region introduction into the structure of methaqualone, replacing the methylphenyl radical in the 3rd position with an acetic acid residue, which combined the quinazoline scaffold with the neurotropic mediator – glycine. The virtual base of anticonvulsant agents included 298 substances. The affinity of the ligand structures to anticonvulsant biotargets was predicted: the GABA<sub>A</sub> receptor site of benzodiazepines, NMDA and AMPA inhibitor sites – receptors, as well as the carbonic anhydrase II inhibitor. Candidate structures for synthesis were ranked according to their affinity to GABAergic and glutamatergic biotargets, and 50 compounds were selected for the synthesis.

The main building block of the study – (4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetic acid was synthesized by cyclization reaction of the methyl ester of 2-isothiocyanobenzoic acid with glycine during 30 minutes boiling in a medium of propanol-2 in the presence of triethylamine. The last one was amidated by the «one-pot» method during interaction with N,N'-carbonyldiimidazole while boiling in dioxane and subsequent interaction of the intermediate acylimidazole

with the corresponding alkyl-, cycloalkyl- and arylamines. The synthesized 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetamides were studied on the PTZ-induced model of seizures, and low indicators of anticonvulsant activity were determined. SAR analysis was carried out and certain regularities were revealed.

At the next stage, various approaches described in the literature were tested and a new preparative approach to the synthesis of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetic acid was developed as a building block of research, which was obtained by hydrogen oxidation peroxide at 70 °C of previously synthesized 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetic acid. A new undescribed derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetamides were synthesized by amidation of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl) acetic acid with the corresponding alkyl-, allyl-, and arylamines in anhydrous dioxane in the presence of *N,N'*-carbonyldiimidazole. The structure and identity of all synthesized compounds was confirmed by TLC, elemental analysis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, and LC/MS analysis. According to the results of pharmacological screening on the model of PTZ-induced seizures in mice, four derivatives with strong anticonvulsant potential were identified, and one derivative exceeded the reference drug sodium valproate in all parameters. Some regularities of structure-anticonvulsant activity dependence were formulated, in general, quinazoline-2,4-dione derivatives demonstrated better protection parameters against seizures compared to their 2-thioxo-4-oxo analogues.

Four «hit compounds» were tested for neurotoxicity on a rotating rod test. None of the substances had a negative effect on the motor coordination in mice and had no muscle relaxant activity. According to the best pharmacological indicators, 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)-*N*-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-acetamide was chosen for the further research, for which acute toxicity (LD<sub>50</sub> >5000 mg/kg) was determined.

To predict the activity of the MES seizure model, molecular docking of the most active substance into the active sites of inhibitors of metabotropic glutamate receptors mGlu5 and ionotropic AMPA glutamate receptors was carried out. A low

probability of activity on the given model was predicted due to moderate affinity and unsatisfactory conformational placement relative to the reference ligands in the binding sites. It was confirmed in the *in vivo* experiment – the «hit compound» 2,4-dichlorobenzylacetamide derivative did not have a pronounced activity, only the duration of the convulsive period and mortality were significantly reduced by up to 33%.

The «hit compound» moderate activity on the MES model led to the further structure modification. For the activity parameters possible improvement, as well as to determine the role of the cyclic NHC=O fragment on the anticonvulsant activity, 1-benzyl- and 1-arylacetamide derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)-N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]acetamide were constructed. The alkylation was carried out under common conditions by interaction with the corresponding 1-chloromethylbenzene or 2-chloroacetamide in dimethylformamide medium in the presence of potassium carbonate excess at a temperature of 70-80 °C. The structure of the synthesized compounds, as well as their individuality, was proven by TLC, LC/MS, elemental analysis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy (for four compounds).

The selection of candidate compounds for the *in vivo* experiment was carried out according to the affinity indicator into the active sites of the positive benzamidine and benzodiazepine allosteric modulator of the GABA<sub>A</sub> receptor and GABA<sub>AT</sub> enzyme inhibitor site. A moderate level of affinity was calculated only for the benzodiazepine site, besidesg, when detailing the conformational placement, it was determined that the position 1substituents can interact with amino acids – tyrosine and serine, which do not form the active site in the experiment. According to the PTZ-induced seizures screening, a complete loss of activity of the modified derivatives was determined and a positive correlation between *in vivo* and *in silico* studies was found.

A study of the spectrum of anticonvulsant activity on chemotoxic seizure models of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)-N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-acetamide was carried out. *In silico* prediction of affinity to the targets according to the chemotoxins proconvulsant activity mechanism preceded every stage of the *in vivo* experiment. A wide and powerful spectrum of

anticonvulsant activity was determined for the «leader compound» – in seizure models induced by picrotoxin, strychnine, and caffeine. In thiosemicarbazide-induced seizures, a lack of effect was determined. Molecular docking tools determined the affinity of the studied substance to anticonvulsant biotargets, the mechanism of activity implementation was predicted, and the correlation of *in vivo* and *in silico* results was determined: antagonism to PTZ and picrotoxin – stimulation of GABAergic mechanisms due to positive allosteric modulation of the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor; antagonism with caffeine – modulation of the adenosinergic link through competitive inhibition of A<sub>2A</sub> receptors; activity on strychnine-induced seizures – glycinergic mechanism through inhibition of Gly receptors. The «leader compound» mechanism of anticonvulsant effect implementation through the modulation of metabotropic mGlu8 (selective agonist site) and ionotropic NMDA glutamate receptors (antagonist site), as well as inhibition of carbonic anhydrase II, which implies activity on the model of PTZ-kindling and electrically induced seizures, respectively, was predicted.

According to the pharmacological profile indicators, the prospects for the further in-depth research of the «leader compound» 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)-N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-acetamide with determination of neurochemical mechanisms, additional parameters of toxicity and accompanying types of pharmacological activity was investigated.

## ЗМІСТ

Анотація	2
Список публікацій здобувача	6
Annotation	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 ПОХІДНІ ХІНАЗОЛІН-4(3 <i>H</i> )-ОНУ: ПІДХОДИ ДО КОНСТРУЮВАННЯ МОЛЕКУЛ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ (Огляд літератури)	28
1.1 Підходи до конструювання похідних хіназолін-4(3 <i>H</i> )-ону	29
1.1.1 Синтез похідних хіназолін-4-онів на основі антранілової кислоти	30
1.1.2 Синтез похідних хіназолінонів із бензоксазинонів	35
1.1.3 Інші підходи до конструювання хіназолінонового скафолду	39
1.2 Фармакологічні властивості похідних хіназолін-4(3 <i>H</i> )-ону	40
1.2.1 Хіназолінон у структурі природних речовин	40
1.2.2 Похідні хіназолінону в структурі лікарських засобів	43
1.2.3 Похідні хіназолін-4(3 <i>H</i> )-ону, які діють на ЦНС	47
1.2.3.1 Протисудомна активність похідних хіназолінону та SAR аналіз	47
1.2.3.2 Інгібітори моноамінооксидази серед похідних хінізолін- 4(3 <i>H</i> )-ону	52
1.2.3.3 Седативна та гіпнотична активність похідних хіназолін- 4(3 <i>H</i> )-ону	53
1.2.3.4 Інші впливи на діяльність ЦНС	54
РОЗДІЛ 2 ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ ТА IN SILICO ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ЦІЛЬОВИХ СТРУКТУР	56
2.1 Конструювання загального алгоритму дослідження щодо пошуку нових антиконвульсантів	56

2.2	Побудова цільових структур як протисудомних лігандів	58
2.3	<i>In silico</i> прогнозування афінності до протисудомних біомішеней	63
	Експериментальна частина	72
	Висновки до розділу 2	72
РОЗДІЛ 3	СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 2-ТІОКСО-ХІНАЗОЛІН-4(3H)-ОНУ	75
3.1	Синтез (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти	75
3.2	Синтез N-заміщених 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів	77
3.3	Обговорення результатів протисудомної активності похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів на PTZ-моделі судом	81
	Експериментальна частина	84
	Висновки до розділу 3	90
РОЗДІЛ 4	СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ХІНАЗОЛІН-4(3H)-ОНУ	92
4.1	Синтез похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-ацетамідів	92
4.2	Синтез та фізико-хімічні властивості 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів	95
4.3	Обговорення результатів протисудомної активності похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів на PTZ-моделі судом	99
4.4	Обговорення результатів нейротоксичності N-заміщених 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів	101
4.5	Обговорення результатів вивчення гострої токсичності «сполуки-	104



	хіта»	
4.6	Прогнозування активності «сполуки-хіта» на моделі MES-індукованих судом	105
4.7	Обговорення даних протисудомної активності сполуки-хіта на MES-моделі судом	107
	Експериментальна частина	108
	Висновки до розділу 4	116
РОЗДІЛ 5	МОДИФІКАЦІЯ СТРУКТУРИ 2-(2,4-ДІОКСО-1,4-ДИГІДРОХІНАЗОЛІН-3(2H)-ІЛ)-N-[(2,4-ДИХЛОРОФЕНІЛ)МЕТИЛ]-АЦЕТАМІДУ, ПРОГНОЗУВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРА ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ	119
5.1	Модифікація структури 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду шляхом алкілування	119
5.2	Молекулярний докінг 1-алкілованих похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду	126
5.3	Обговорення результатів скринінгу на PTZ-моделі судом 1-алкілованих похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду	130
5.4	Прогнозування механізму та обговорення результатів активності «сполуки-лідера» на моделях хемоіндукованих судом	132
5.4.1	Прогнозування ГАМКергічного механізму протисудомної дії «сполуки-лідера»	133
5.4.2	Обговорення результатів активності сполуки-лідера на моделі судом, індукованих пікротоксином	135
5.4.3	Прогнозування гліцинергічного механізму та результати активності сполуки-лідера на моделі стрихнін-індукованих судом	136
5.4.4	Прогнозування афінності до аденозинових рецепторів та	139

результати активності сполуки-лідера на моделі кофеїн-індукованих судом	
5.4.5 Прогнозування та результати активності сполуки-лідера на моделі судом, індукованих тіосемікарбазидом	141
5.5 Прогнозування інших можливих механізмів реалізації протисудомної активності сполуки-лідера	143
5.5.1 Прогнозування афінності сполуки-лідера до глутаматних рецепторів	144
5.5.2 Прогнозування афінності сполуки-лідера до вольтаж-залежних калієвих каналів	147
5.5.3 Прогнозування афінності до карбонової ангідрази II типу	148
Експериментальна частина	149
Висновки до розділу 5	155
ВИСНОВКИ	159
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	162
ДОДАТКИ	179

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- A<sub>2</sub>A – аденозинові рецептори 2 типу
- АМРА – α-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія
- ГАМК – гамма-аміномасляна кислота
- ГАМК<sub>A</sub> – рецептор γ -аміномасляної кислоти типу А
- ДМФА – диметилформаїд
- м.ч. – мільйонна частка
- МАО – моноамінооксидаза
- нм – нанометр
- ПАМ – позитивний алостеричний модулятор
- ПСЗ – протисудомні засоби
- ТМС – тетраметилсилан
- ТШХ – тонкошарова хроматографія
- УФ – ультрафіолетова спектроскопія
- ЦНС – центральна нервова система
- ЯМР – ядерний магнітний резонанс
- АсОН – оцтова кислота
- Ar – арил
- VZD – бенздіазепіни
- СА II – карбонова ангідраза
- DBU –діазобіциклоундецен
- Et<sub>3</sub>N – триетиламін
- EtOH – етиловий спирт
- ГАА – концентрована оцтова кислота
- GlyR – гліциновий рецептор

hBCAT – людська амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом  
iGluR – іонотропні глутаматні рецептори  
ILAE – Міжнародна протиепілептична ліга (International League Against Epilepsy)  
KCNQ – потенціал-залежний калієвий канал  
KSP – протеїн кінезинового веретена  
LC/MS – хроматомас-спектрометрія  
MES – максимальний електрошок  
mGluR – метаботропний глутаматний рецептор  
NMDA – N-метил-D-аспартат;  
PLP – піридоксальфосфат  
pTSA – *p*-толуолсульфонова кислота  
PTZ – пентилентетразол  
RMSD – середньоквадратичне відхилення  
RT – кімнатна температура  
TBTU – 2-(бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламініум тетрафлуороборат  
tBuOH – трет-бутанол  
TFA – трифлуорооцтова кислота  
TS – тиміділатсинтаза

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Безсумнівно, що фундаментальним завданням сучасної фармацевтичної та медичної хімії є синтез нових інноваційних молекул із заданими фармакологічними характеристиками, селективністю дії до обраної біомішені та задовільним профілем безпеки. Іноді пріоритетним напрямом є досягнення і мультитаргетності дії з можливістю впливати на різні ланки патогенезу, зокрема це стосується і розробки протисудомних засобів. Для них окрім модуляції ГАМКергічних та/або глутаматергічних рецепторів, розглядається можливість впливу на прозапальні цитокіни та ензими, інгібування карбонової ангідрази, Р-глікопротеїну та інших (W. Löscher, 1980-2023; R.S. Fisher, 1980-2023).

Гетероцикл хіназоліну є унікальним каркасом для конструювання сполук із різноманітними та водночас специфічними біологічними функціями та ефектами, наприклад, антимікробними, протипухлинними, противірусними, протисудомними, протизапальними, антигіпертензивними, антипаркінсонічними, антидепресантними, антигістамінними та іншими. Вважається, що переважним вектором фармакологічного впливу похідних хіназолін-4(3H)-ону є регуляція діяльності ЦНС через виражену позитивну алостеричну модуляцію ГАМК<sub>A</sub> рецептора. Зокрема, яскравим прикладом є препарат метаквалон із потужною протисудомною, гіпнотичною та снодійною активністю. Модифікацією його структури були одержані антиковульсанти зі спектром активності на моделях хемотоксичних та електрошоккових судом, однак наразі жоден не застосовується через здатність викликати звикання. Зважаючи на пріоритетність напрямку раціонального «drug design» щодо варіації структури відомих лікарських засобів для досягнення більш сприятливого фармакологічного профілю, саме модифікація будови хіназолін-4(3H)-ону для пошуку протисудомних засобів є виправданою та обнадійливою.

Крім того, хіназолін є бензанельованим аналоомг піримідину, протисудомні властивості якого відомі з часів відкриття фенобарбіталу та неодноразово доведені як міжнародною науковою спільнотою (М. Matias, 2010-2022), так і науковцями кафедри фармацевтичної хімії НФаУ у (В. А. Георгіянц, Г. І. Северіна 2007-2021).

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

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

### **Мета і завдання дослідження**

Метою дисертаційної роботи є обґрунтувати модифікацію структури хіназолін-4(3H)-ону та здійснити спрямований синтез його алкіл/арилацетамідних похідних, визначення їх фізико-хімічних властивостей, *in silico* прогноз та *in vivo* дослідження фармакологічних властивостей.

Для досягнення визначеної мети необхідно було вирішити такі завдання:

- сформувати дизайн мішень-орієнтованого дослідження щодо пошуку протисудомних агентів серед похідних хіназолін-4(3H)-ону, розглянути сучасні підходи до конструювання хіназолінового циклу, визначити взаємозв'язки між особливостями структури та впливом на ЦНС;
- визначити головний скафолд та, дотримуючись постулатів фармакофорної моделі пошуку ПСЗ, згенерувати віртуальну базу похідних як протисудомних агентів; ранжувати згенеровані похідні за показником афінності до найперспективніших протисудомних біомішеней;
- розробити методики синтезу головних білдинг-блоків дослідження 2,4-діоксо- та (2-тіо-4-оксо-хіназолін-3-іл)оцтових кислот;

- оптимізувати умови та здійснити реакції амідування хіназоліноцтових кислот відповідними алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами;
- підтвердити будову та чистоту синтезованих сполук з використанням ТШХ, елементного аналізу,  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії, ВЕРХ-МС;
- за результатами фармакологічного скринінгу синтезованих сполук на моделі PTZ-індукованих судом, визначити вагомий фармакофорний вплив на протисудомну активність та означити «сполуки-хіти» для подальшого їх вивчення нейротоксичності;
- відібрати найактивнішу похідну, спрогнозувати *in silico* методами активність на моделі MES-індукованих судом та співставити з *in vivo* результатами, обговорити показники токсичності;
- для можливого покращення фармакологічного профілю найактивнішої зі "сполук-хітів" здійснити подальшу модифікацію її структури для проведення скринінгу на протисудомну активність, визначити «сполуку-лідер»;
- спрогнозувати *in silico* та зіставити з результатами *in vivo* досліджень спектра протисудомної активності «сполуки-лідера» на моделях хемотоксичних судом;
- передбачити можливі інші механізми впливу на ЦНС.

*Об'єкт дослідження* – молекулярне моделювання та синтез протисудомних речовин в ряду похідних хіназолін-4(3H)-ону.

*Предмет дослідження* – похідні арил-(алкіл)амідів (2,4-діоксо/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот як потенційні протисудомні агенти: дизайн структури; прогнозування фармакологічних властивостей; методи синтезу, дослідження фізико-хімічних та фармакологічних властивостей; механізми реалізації протисудомної дії.

### **Методи дослідження**

Для синтезу сполук використовували методи органічного синтезу; для доведення перебігу реакцій, хімічної структури, індивідуальності та чистоти одержаних речовин – сучасні фізико-хімічні методи – елементний аналіз,  $^1\text{H}$  та

<sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопію, ВЕРХ-МС. Для визначення афінності до біомішеней застосовували метод гнучкого молекулярного докінгу; для визначення механізму дії досліджуваних сполук визначали взаємозв'язок між *in silico* та *in vivo* експериментами: протисудомної активності на моделях хемотоксичних та електростимулюючих судом, міорелаксантичної активності, гострої та нейротоксичності. Статистичні обчислювання виконано із застосуванням програмного забезпечення Statistica 12.0. Для молекулярного докінгу користувалися програмами AutoDock Vina, BioviaDraw 2021R2, Chem3D, HyperChem 7.5, Discovery Studio Visualizer 2021.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Визначено ефективні методи синтезу та отримано 49 нових не описаних в літературі похідних арил-(алкіл)амідів (2,4-діоксо/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)-оцтових кислот, доведено їх структуру та індивідуальність, вивчено фізико-хімічні властивості, здійснено фармакологічний скринінг на PTZ моделі судом. Окреслено деякі закономірності залежності протисудомної активності від фармакофорної будови синтезованих речовин, зокрема: вагомий внесок фрагменту NHCO хіназоліну, довжини дистальної зони та арильного кільця в ній, а також нівелювання протисудомного ефекту при наявності тіоксогрупи у другому положенні замість оксо-групи.

Розроблено препаративний спосіб синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти як ключового білдинг-блоку дослідження шляхом окиснення гідроген пероксидом 4-оксо-2-тіо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти, одержаної з метилового естеру 2-ізотіоціанобензойної кислоти та гліцину. Досліджено умови та здійснено амідування 2-(2,4-діоксо)- та (2-тіо-4-оксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтових кислот "one-pot" методом шляхом взаємодії з N,N'-карбонілдіімідазолом та алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами.

Доведено ефективність реалізації поетапного застосування *in silico* визначення афінності до біомішені та *in vivo* експериментів щодо механізму реалізації конвульсивної дії хемотоксинів. Це дозволило виявити ряд



інноваційних «сполук-хітів», з подальшим визначенням за найліпшими показниками фармакологічного профілю «сполуки-лідера» – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду.

Доведено афінність «сполуки-лідера» до протисудомних біомішеней, передбачено механізм реалізації активності та визначено кореляцію *in vivo* та *in silico* результатів: антагонізм до PTZ та пікротоксину – стимулювання ГАМКергічних механізмів внаслідок позитивної алостеричної модуляції бензодіазепінового сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора; антагонізм з кофеїном – модуляція аденозинергічної ланки через конкурентне інгібування A<sub>2A</sub> рецепторів; активність на стрихнін-індукованих судамах – гліцинергічний механізм через інгібування Gly-рецепторів

Визначено недоцільність введення бензильних та арилацетамідних радикалів у 1 положення 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів, що обґрунтовано вагомим збільшенням розміру молекул та неспроможністю зануритися в сайти позитивних алостеричних модуляторів ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

Новизна та пріоритет дослідження підтверджено патентом України на корисну модель: пат. 137806 «2-(2,4-Діоксо-1,4-дигідро-2*H*-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію».

### **Практичне значення отриманих результатів**

За результатами дисертаційної роботи синтезовано нові похідні арил-(алкіл)амідів (2,4-діоксо/2-тіо-4-оксо)-хіназолін-3-іл)оцтових кислот, визначено їхні фізичні та спектральні характеристики, що є важливим здобутком для з'ясування будови їх нових структурних аналогів. Розроблений препаративний спосіб синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти, дозволить використовувати його науковцями в подальших дослідженнях для спрямованого пошуку біологічно активних речовин в ряду похідних хіназолін-4(3*H*)-ону.

Виявлені закономірності залежності протисудомної активності від структури синтезованих похідних хіназоліну доповнюють наявні принципи та постулати щодо раціоналізації пошуку інноваційних антиконвульсантів у рядах

нітрогеновмісних гетероциклів, що у поєднанні з *in silico* методами стане вагомим інструментом оптимізації фармакологічних досліджень.

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено в науковий та навчальний процеси кафедр Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (акти впровадження від 02.09.2023 р., 06.03.2023 р., 26.03.2023 р. відповідно).

### **Особистий внесок здобувача**

Автором спільно з науковим керівником розроблено план дослідження, визначено мету та завдання, сформульовано основні напрями синтетичних і фармакологічних досліджень. Дисертант самостійно здійснив аналіз наукової літератури, обрав базовий скафолд для подальшого генерування віртуальної бази сполук з можливою протисудомною активністю. Розроблено та апробовано методики та здійснено синтез усіх описаних в дисертації речовин, здійснено інтерпретацію спектральних даних, узагальнено фізико-хімічні характеристики усіх синтезованих сполук. Дисертант брав участь у плануванні та підготовці проб при фармакологічному скрингу, а також самостійно інтерпретував та описав отримані дані; разом із фармакологами означив «сполуки-хіти», а згодом і «сполуку-лідер». Автором самостійно реалізовано *in silico* експеримент, інтерпретовано, скомпоновано та описано результати, сформульовано прогноз щодо механізму реалізації протисудомної активності. Окреслено основні складові залежності протисудомної дії від фармакофорних фрагментів.

Співавторами наукових робіт є науковий керівник, а також науковці, з якими проводились фармакологічні дослідження. Усі фармакологічні дослідження, які обговорюються у роботі виконано на кафедрі фармакології та фармакотерапії НФаУ аспірантом Залевським С. В. під керівництвом д. м. н. С. Ю. Штриголя.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні результати, положення та висновки роботи подано та обговорено на науково-практичних конференціях: 9th International pharmaceutical conference «Science and practice 2018» (Kaunas, Lithuania, November 9th, 2018), XXVI міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (Харків, 10-12 квіт. 2019 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 19-20 вересня 2019 р.), II Науково-практичних інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019 р.), 10th International pharmaceutical conference «Science and practice 2019» (Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019), VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement (Kyiv, November 21, 2019 р.), Науково-практичній дистанційній міжнародній конференції, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (Івано-Франківськ, 19-20 травня 2020 р.), IX Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова» (г. Алматы, 27 ноября 2020 г.), International scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy «100 years of success and quality» (Kharkiv, October 18th, 2021), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум – 2021» (м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування» (м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р.).

### **Обсяг і структура дисертації**

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 159 найменувань, з них 149 латиницею та 10 кирилицею, 2 додатки. Обсяг основного тексту становить 161 сторінка. Роботу проілюстровано 26 схемами, 50 рисунками та 11 таблицями.

# РОЗДІЛ 1

## ПОХІДНІ ХІАЗОЛІН-4(3*H*)-ОНУ: ПІДХОДИ ДО КОНСТРУЮВАННЯ МОЛЕКУЛ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

### (Огляд літератури)

Нітрогеновмісні гетероцикли, зокрема хіназолін, є унікальним каркасом для конструювання сполук із різноманітними та водночас специфічними біологічними функціями та ефектами. Протягом останнього десятиріччя зусиллями науковців медичної та фармацевтичної хімії створено численну кількість функціональних похідних хіназоліну та розроблено безліч синтетичних та методологічних підходів для їх продуктивного синтезу, що висвітлено у наукових публікаціях провідних видань. Мотивацією до функціоналізації скафолду хіназоліну є розширення кола можливих біологічних ефектів, підвищення їх селективності до бажаної біомішені, а в деяких випадках, досягнення і мультитаргетної дії. Нами було проаналізовано літературні джерела щодо досягнень в синтезі хіназолінового скелета з метою визначення простих, ефективних методик синтезу з використанням легкодоступних вихідних та допоміжних реагентів.

#### 1.1 Підходи до конструювання похідних хіназолін-4(3*H*)-ону

Хіназолін **1** (бензо-1,3-діазин, 5,6-бензопіримідин, 1,3-діазанафталін) є гетероциклічним гібридом, що складається з двох конденсованих шестичленних ароматичних кілець – бензольного та піримідинового [1]. Хіназолінони – це оксо-похідні хіназоліну, а саме хіназолін-4(3*H*)-он (**1.1**) та хіназолін-2(1*H*)-он (**1.2**) (рис. 1.1).

Найбільш вивченими та описаними в літературі є похідні хіназолін-4(3*H*)-ону [2]. Перша похідна хіназолінону – 2-ціано-3,4-дигідро-4-оксохіназолін – була синтезована ще у 1869 році групою вчених під керівництвом Griess [3]. У 1903 році Gabriel та Colman синтезували декілька похідних хіназоліну і детально вивчили їх властивості [4].

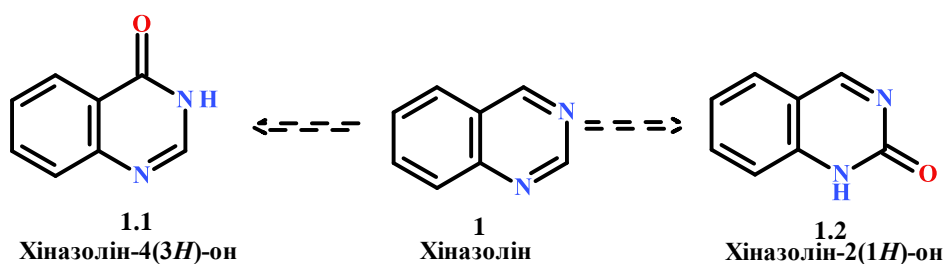


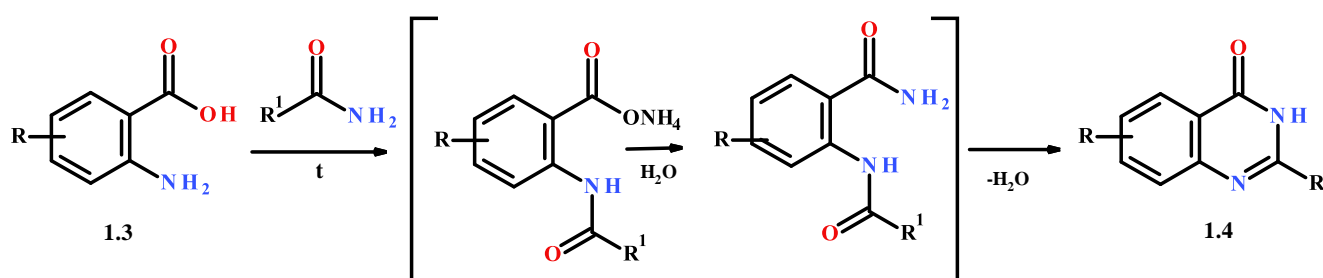
Рис. 1.1 Структура хіназоліну та хіназолінонів

Синтез похідних хіназолін-4(3H)-ону проводився багатьма дослідницькими групами, які застосовували стратегії з використанням різних видів реакцій, каталізаторів та умов проведення реакцій. З року в рік зростає обсяг нових синтетичних методологій та підходів щодо синтезу похідних хіназолінону, що забезпечує прямий доступ до нових, ефективних, структурно різноманітних похідних з легкодоступних субстратів.

#### 1.1.1 Синтез похідних хіназолін-4-онів на основі заміщеної антранілової кислоти

Синтез хіназолінонових продуктів здійснюється на основі антранілових кислот, естерів, гідразидів, ариламідів антранілових кислот. Класичним методом одержання похідних хіназолін-4(3H)-ону (**1.4**) є метод Німентовського, який полягає у взаємодії антранілової кислоти та її похідних (**1.3**) з надлишком алкіл/ариламідів карбонових кислот за нагрівання до 180 °C [5] (схема 1.1).

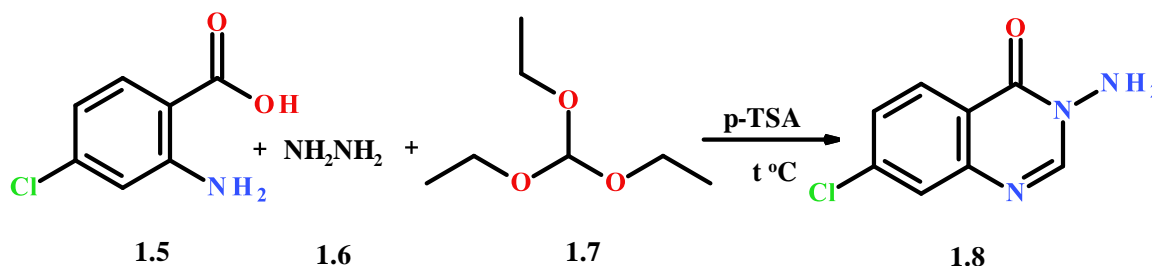
Схема 1.1



Першою стадією цієї реакції є утворення амонієвої солі ацильної похідної антранілової кислоти з подальшим утворенням амиду ацилантранілової кислоти, а наступна конденсація з відщепленням води перетворює його у відповідний хіназолін-4(3H)-он (**1.4**).

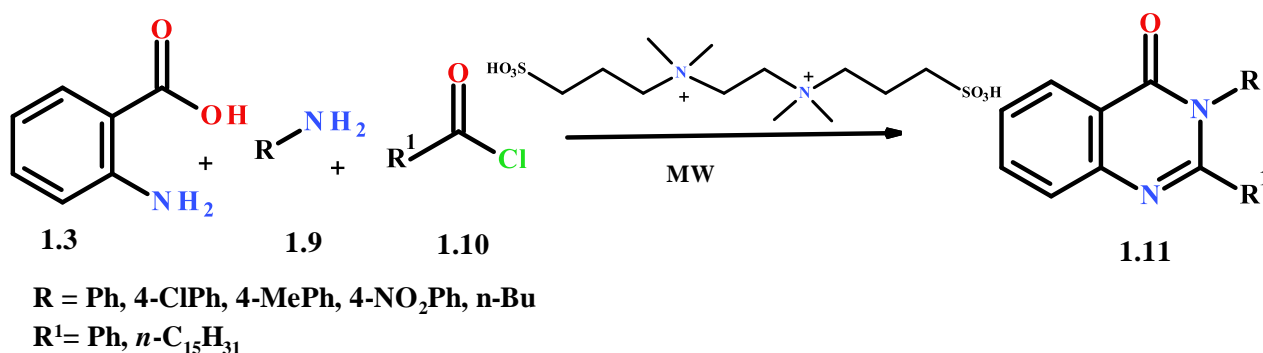
Ugale та співавтори здійснили синтез 3-аміно-7-хлорхіназолін-4(3*H*)-ону (**1.8**) взаємодією хлорозаміщеної антранілової кислоти (**1.5**) з гідразингідратом (**1.6**) триетоксиметан (**1.7**) у присутності *p*-толуолсульфонової кислоти як каталізатора [6] (схема 1.2).

Схема 1.2



Про модифікований підхід до синтезу заміщених хіназолін-4(3*H*)-онів **1.11** з використанням антранілової кислоти **1.3** як вихідного реагенту повідомили Лі та співавтори [7]. Процес складається з конденсації антранілової кислоти **1.3** з арил/алкіламінами **1.9** та ацилхлоридами **1.10** з використанням  $\text{SO}_3\text{H}$ -функціоналізованих кислих йонних рідин як каталізатора в умовах мікрохвильового опромінення (схема 1.3).

Схема 1.3

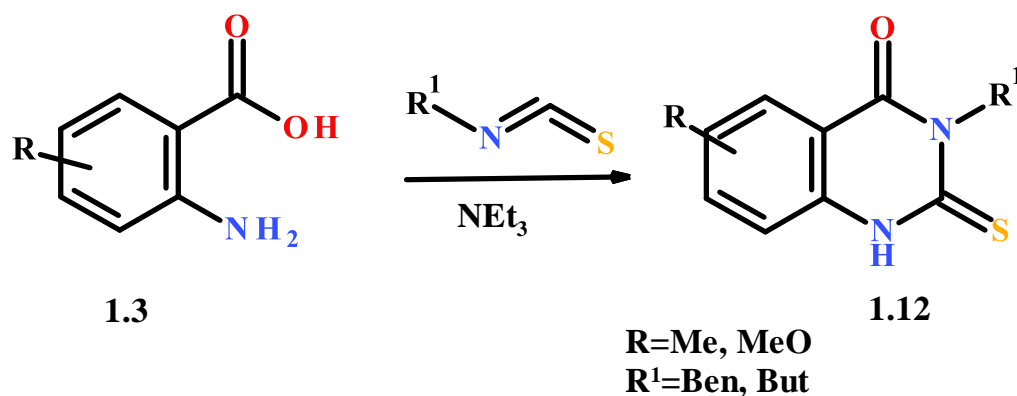


Продукти реакції – 2,3-дизаміщені-хіназолін-4(3*H*)-они **1.11** одержані з високими виходами, а іонні рідини легко відновлюються без втрати каталітичної активності.

Класичним методом одержання похідних 2-тіоксо-хіназолін-4(3*H*)-ону **1.12** є конденсація заміщених похідних антранілової кислоти **1.3** з

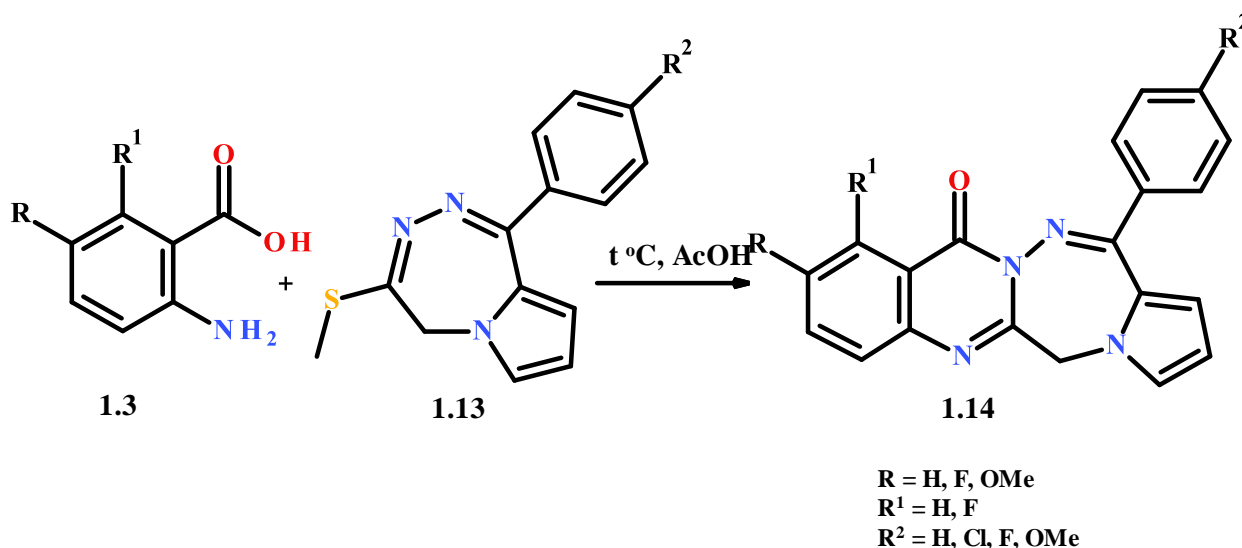
ізоціанатами за умов лужного каталізу. Саме таким методом кип'ятінням зі зворотним холодильником в етиловому спирті або диметилформаміді в присутності триетиламіну науковою групою Abuelizz та ін. [8] одержано 2-тіоксо-2,3-дигідрохіназолін-4-они **1.12** (схема 1.4).

Схема 1.4



Тетрациклічні хіназолінони загальної формули **1.14** вдалося синтезувати із похідних антранілової кислоти **1.3** та пірролотріазепінів **1.13** шляхом кип'ятіння в оцтовій кислоті відповідно до схеми 1.5 [9].

Схема 1.5

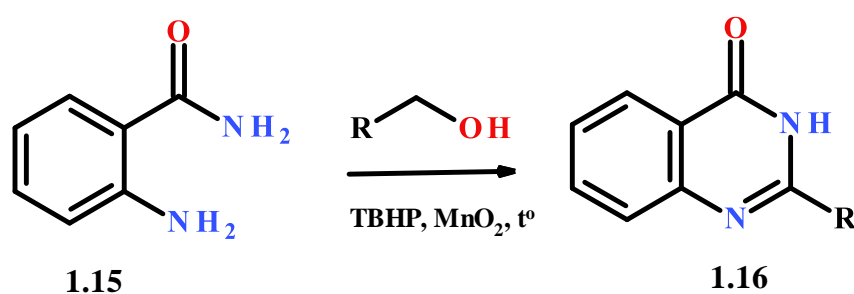


Також для конструювання хіназолінонового скафолду як вихідні реагенти широко застосовуються антраніламіді **1.15**. Ефективну методологію синтезу 2-заміщених похідних хіназолін-4-онів **1.16** запропоновано шляхом окисної



циклізації антраніламідів **1.15** зі спиртами з використанням трет-бутилгідропероксиду як окисника та  $MnO_2$  як каталізатора (схема 1.6) [10]. Визначено, що за використання 1-нафтаденметанолу одержати цільовий хіназолінон **1.16** не можливо, що, вірогідно, пов'язано зі стеричними перешкодами. Водночас гетероциклічні спирти – тієнілметанол, піридилметанол – легко піддавалися окисній циклізації. Виходи продуктів реакції склали 84–98%.

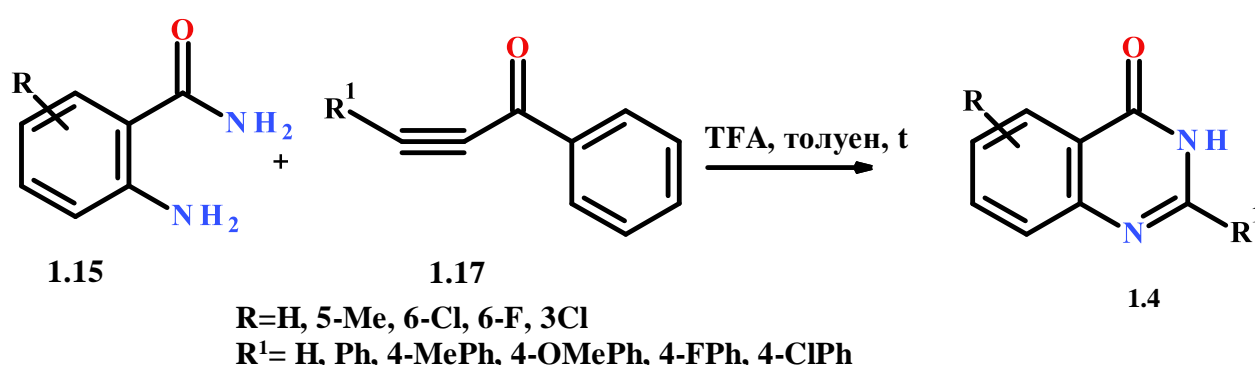
Схема 1.6



$R = \text{H, Me, } n\text{-Pr, } n\text{-Bu, } n\text{-Pent, } n\text{-Hex, Ph, 3-MePh, 4-MePh, 2-MeOPh, 4-MeOPh, 2-FPh, 4-ClPh, 4-BrPh, thienyl-, pyridyl-}$

Розроблено нову методологію синтезу хіназолін-4(3*H*)-онів **1.4** з антраніламідів **1.15** та кетоалкінів **1.17** через селективне розщеплення потрійного зв'язку та утворення двох зв'язків C–N за участі трифлуороцтової кислоти як каталізатора (схема 1.7) [11].

Схема 1.7

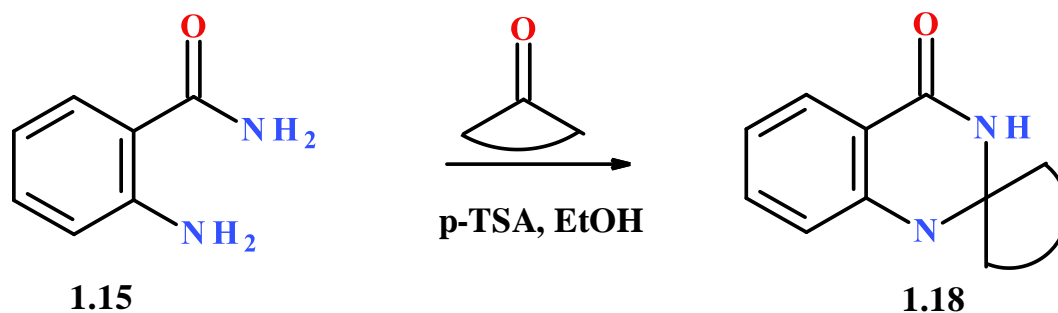


Доведено можливість синтезу цільових хіназолін-4(3*H*)-онів **1.4** із 1,3-дифенілпроп-2-ін-1-ону та 1,3-діарилпроп-2-ін-1-ону з електронодонорними та електроноакцепторними замісниками в арильних радикалах.

«One-pot» реакцією між антраніламідом **1.15** та відповідними кетонами за каталітичної дії *n*-толуолсульфонової кислоти, вдалося синтезувати серію

нових похідних спірохіназолінонів **1.18** (схема 1.8) [12]. Визначено, що реакція найкраще проходить при використанні ізатину, 5-хлорізатину, 5-нітроізатину, аценафтенхінону, циклогексанону, циклопентанону, 1,4-циклогександіону і *n*-бензохінону. Реакція не відбувається з камфорою та циклічними 1,3-дикетонами – димедоном, 1,3-циклогександіоном та кислотою Мельдрума.

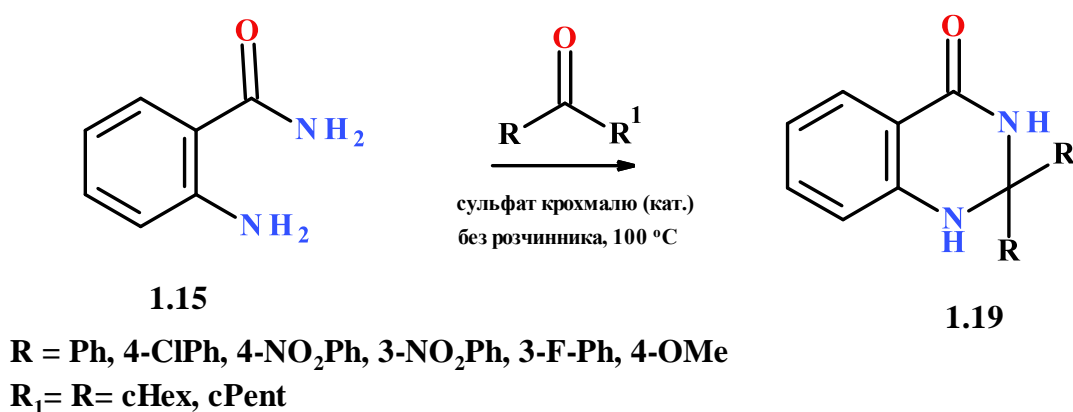
Схема 1.8



Карбонільні сполуки: ізатин, 5-Cl-ізатин, 5-NO<sub>2</sub>-ізатин, норкамфора, циклогексанон, циклопентанон, бензохінон

1,2,3,4-Тетрагідрохіназолін-4-они **1.19** також були одержані взаємодією антраніламідів **1.15** та альдегідів/кетонів за термічних умов без розчинників з використанням сульфату крохмалю як каталізатора (схема 1.9) [13].

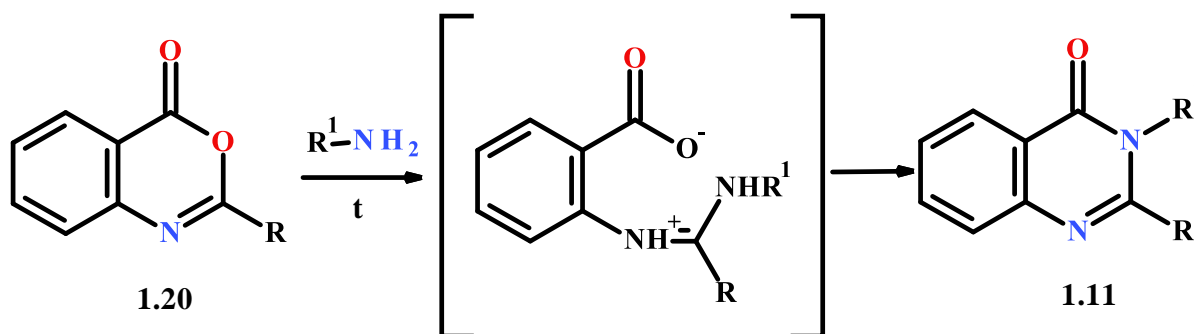
Схема 1.9



### 1.1.2 Синтез похідних хіназолінонів із бензоксазинонів

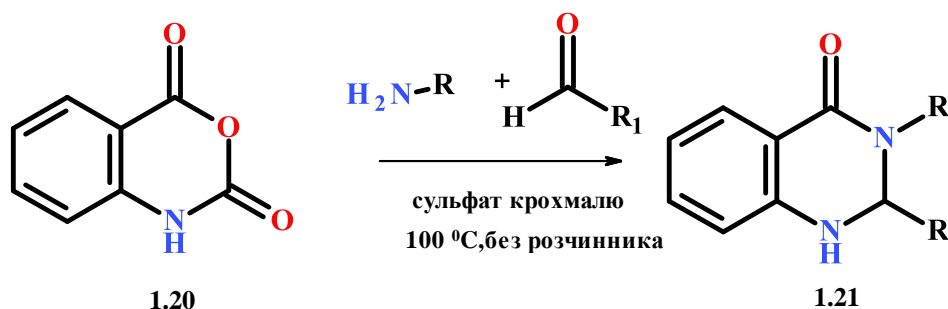
Ще один розповсюджений метод синтезу хіназолін-4(3H)-онів **1.11** є взаємодія бензоксазинонів **1.20** з первинними амінами за нагрівання відповідно до загальної схеми 1.10.

Схема 1.10



Як різновид вищезазначеного синтезу можна розглядати методику запропоновану Shaterian та ін. [13] в абсолютно нових умовах: для синтезу 2,3-дигідро-хіназолін-4-онів **1.21** використано трикомпонентну конденсацію 3,1-бензоксазин-2,4-діону (**1.20**), первинних амінів та ароматичних альдегідів без розчинника за нагрівання до 100 °С з використанням сульфату крохмалю як каталізатора (схема 1.11).

Схема 1.11



$R = \text{Ph}, 4\text{-ClPh}, 4\text{-MePh}, 4\text{-MeOPh}, \text{benzothiazolyl}, \text{benzimidazolyl}$

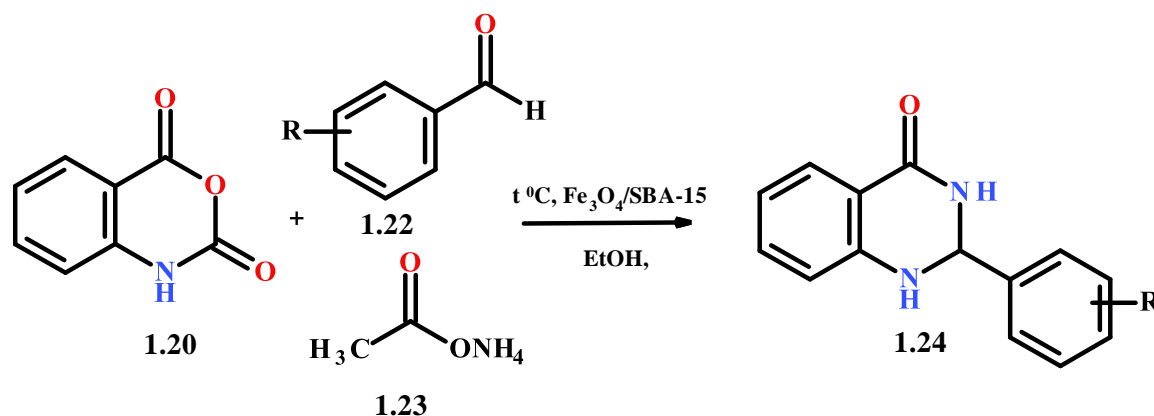
$R_1 = \text{Ph}, 4\text{-ClPh}, 2\text{-ClPh}, 4\text{-MePh}, 4\text{-MeOPh}, 2\text{-OMePh}, 4\text{-NO}_2\text{Ph}, 4\text{-BrPh}, 2,4\text{diClPh}$

Визначено можливість застосування ароматичних альдегідів як з електроноакцепторними, так і електронодонорними замісниками для введення у друге положення піримідинового циклу. Доведено можливість використання

ацетату амонію як амінної компоненти. Продукти реакції одержано з високими виходами.

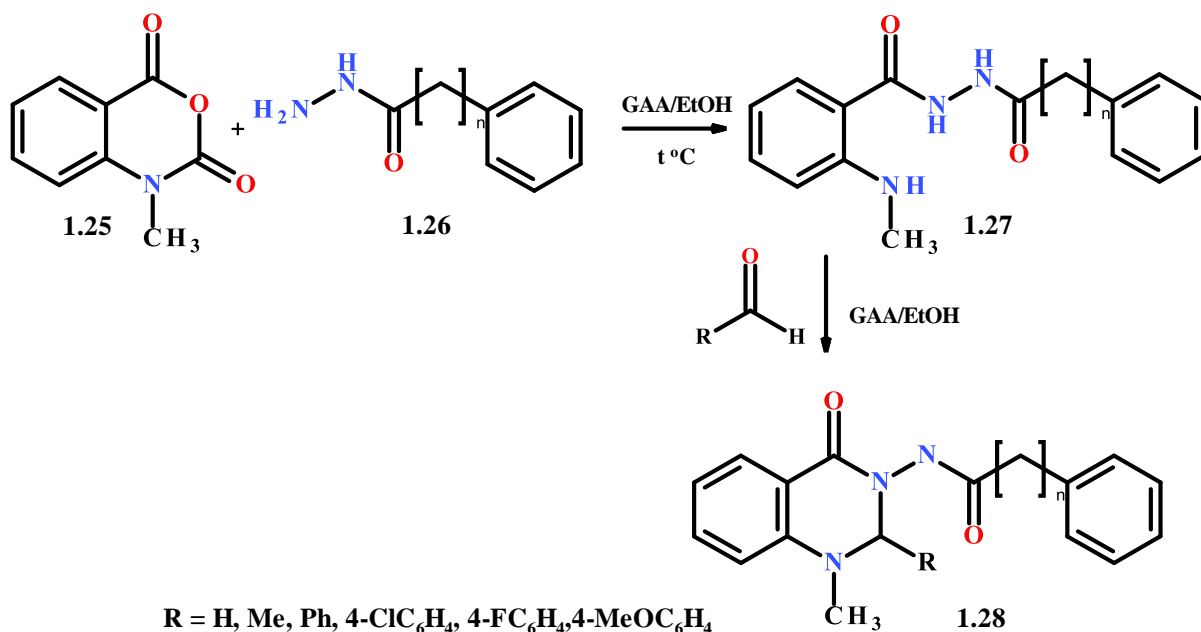
Розроблено ефективний одореакторний трикомпонентний синтез 2,3-дигідро-2-арилхіназолін-4(3*H*)-онів **1.24** (схема 1.12) за участі нанокаталізатора Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SBA-15. Реакцію взаємодії 3,1-бензоксазин-2,4-діону (**1.20**), відповідних бензальдегідів **1.22** та амоній ацетату (**1.23**) запропоновано проводити кип'ятінням в середовищі етилового спирту. Високі виходи цільових продуктів **1.24** та можливість повторного використання каталізатора без значної втрати його каталітичної активності робить представлений метод придатним для широкого використання [14].

Схема 1.12



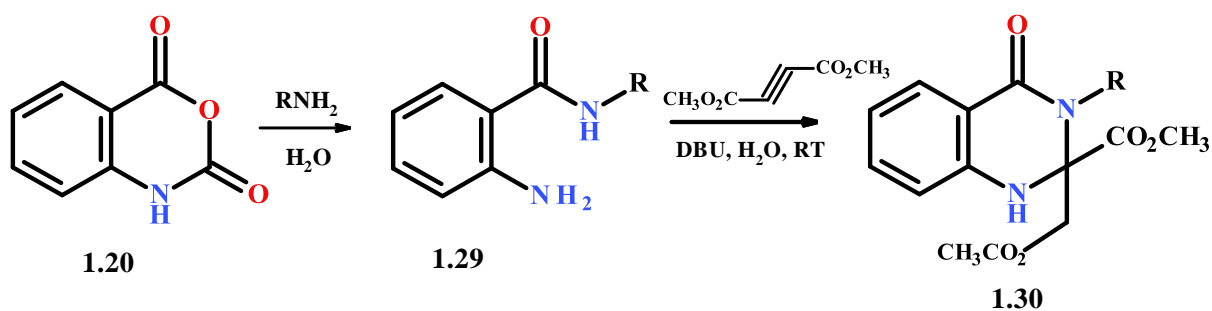
Kothayer та співавтори повідомили про можливість синтезу нових похідних 2,3-дигідрохіназолін-4(1*H*)-ону **1.28** з 1-метил-3,1-бензоксазин-2,4-діону (**1.25**) відповідно до схеми 1.13 [15]. Кип'ятінням діону **1.25** із відповідним гідразидом **1.25** з додаванням каталітичних кількостей льодяної оцтової кислоти одержують проміжні продукти **1.27**. Далі сполуки **1.27** піддають циклізації з формальдегідом/ацетальдегідом/бензальдегідом в середовищі етанолу та льодяної оцтової кислоти, що дозволяє одержати цільові N-(1-метил-4-оксо-2-заміщені-1,2-дигідрохіназолін-3[4*H*]-іл)бензо/ацетаміди **1.28**.

Схема 1.13



Серію нових похідних 1,2,3,4-тетрагідрохіназоліонів **1.30** одержано при взаємодії 3,1-бензоксазин-2,4-діону **1.20** з первинними амінами та подальшою циклізацією одержаних 2-аміно-*N*-заміщених бензамідів **1.29** з диметилацетилендикарбоксилатом у присутності дізабіциклоундецену (DBU) у водному середовищі за кімнатної температури (схема 1.14) [16].

Схема 1.14

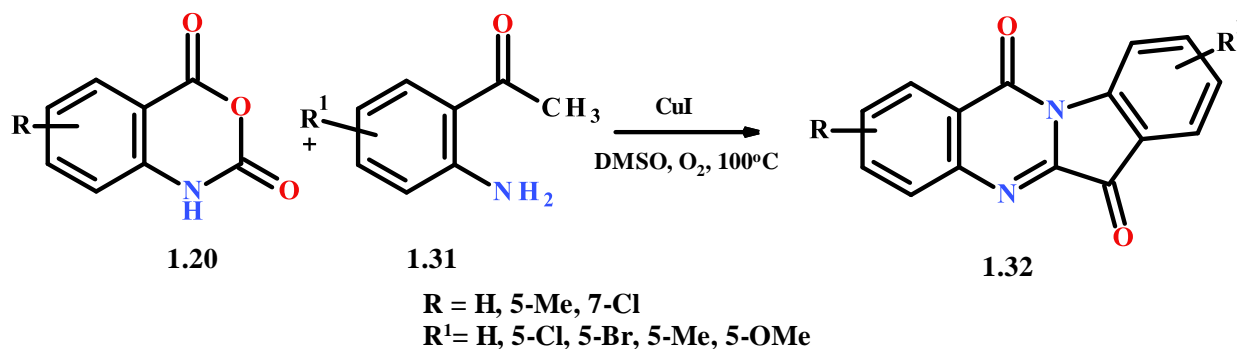


$R = \text{Ph, Bn, 4-FBn, 2-ClBn, } i\text{-Pr, cPr, cPent, allyl, furanyl}$

Реакція досліджувалася на можливість застосування аліфатичних, ароматичних, ациклічних та циклічних замісників у 2-амінобензамідів **1.29** з метою введення різних радикалів у положення 3 хіназолінового циклу. Виходи продуктів варіювалися в межах 70–85%. Також було досліджено можливість застосування різних основ – NaOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, DBU, DABCO, Et<sub>3</sub>N – та визначено, що найбільш ефективною є саме DBU.

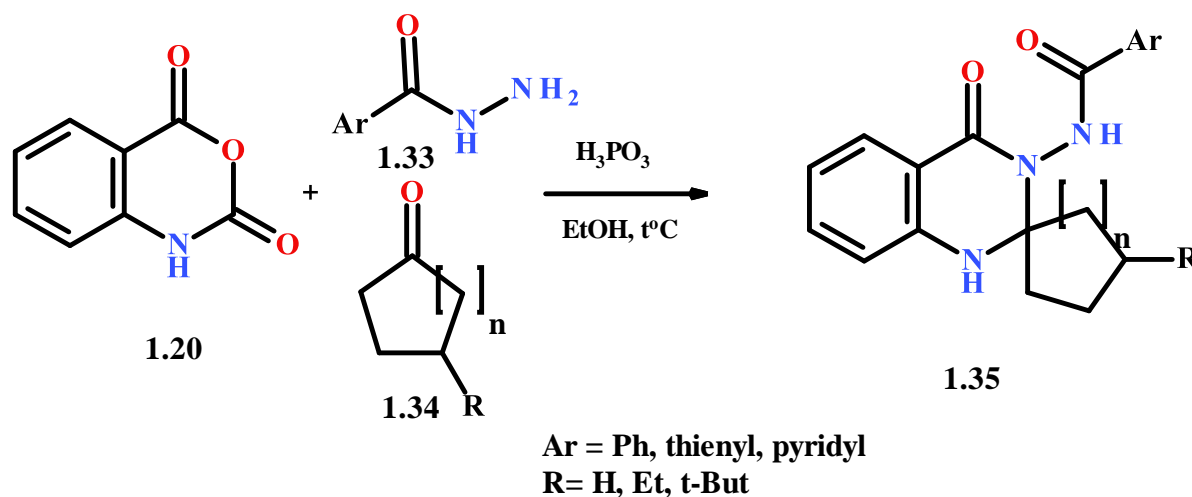
Вперше синтез похідних триптантрину (індоло[2,1-*b*]хіназолінон-6,12-діону) **1.32** було здійснено безпосередньо з 3,1-бензоксазин-2,4-діонів (**1.20**) та 2-аміноарилметилкетонів **1.31** шляхом окиснювальної конденсації, яку каталізували міді йодидом в середовищі диметилсульфоксиду (схема 1.15) [17].

Схема 1.15



Balalaie та співавтори [18] розробили одностадійну методику синтезу спірохіназолінонів **1.35**. Трикомпонентна реакція між 3,1-бензоксазин-2,4-діоном (**1.20**), відповідним арил/гетерилгідразидом **1.33** і циклічним кетоном **1.34** в етанолі, що каталізується фосфорною кислотою, приводить до утворення похідних спіро-2,3-дигідрохіназолін-4(1*H*)-онів **1.35** (схема 1.16). Авторами визначено кореляцію між виходом продуктів реакції та розміром кільця циклічних кетонів: найвищі виходи зафіксовано за використання шестичленних кетонів.

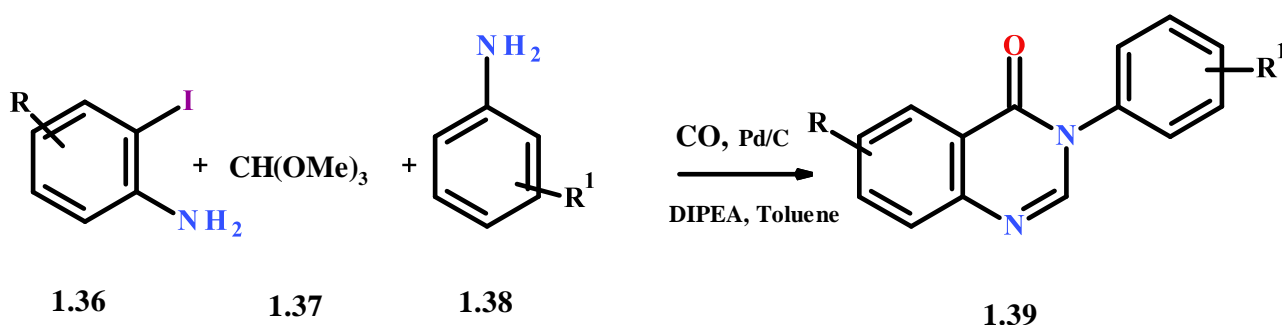
Схема 1.16



### 1.1.3 Інші підходи до конструювання хіназолінонового скафолду

Natte та його наукова група [19] повідомили про багатокомпонентну реакцію між 2-йоданілінами **1.36**, триметилортоформіатом **1.37** та ароматичними амінами **1.38**. Обов'язковим є застосування паладію на активованому вугіллі як гетерогенного каталізатора для карбонілювання 2-йоданілінів **1.36**. Продуктами реакції є цільові 3-арилзаміщені хіназолін-4-они **1.39**, які одержані з чудовими виходами (схема 1.17).

Схема 1.17

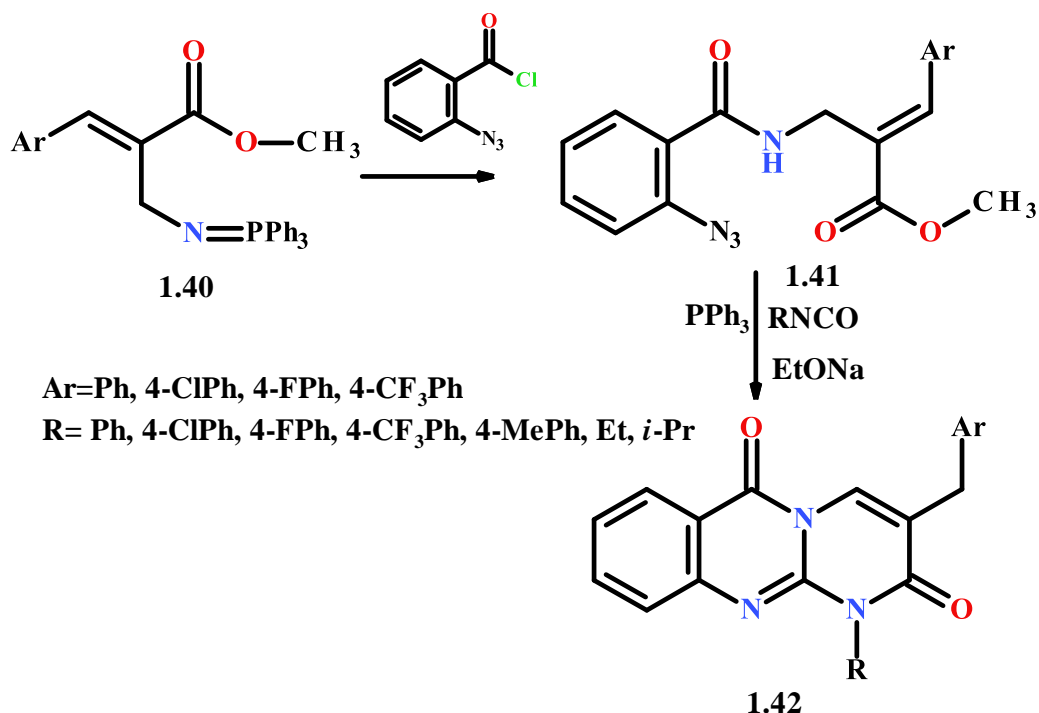


R=H, 4-F, 4-Cl, 4-CN, 5-F

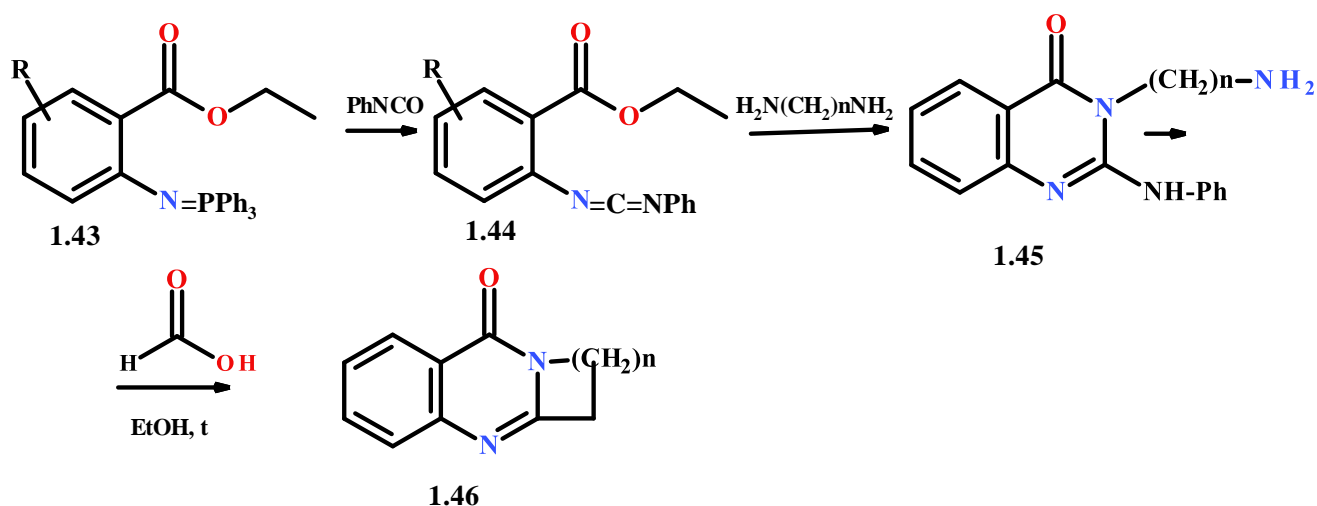
R<sup>1</sup>= H, 4-Me, 4-OMe, 4-SMe, 4-Cl, 4-Br, 4-F, 4-CF<sub>3</sub>, 4-COMe, 4-OH, 4-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>

Запропонований підхід дозволяє уникнути використання в синтезі дорогих фосфінових лігандів, а додатковою перевагою методу є можливість відновлення каталізатора до 4 разів без втрати його активності. До того ж такий метод дозволяє ввести до хіназолінонового каркасу 3,3,3-трифлуоропропільну групу.

Також повідомлося [20] про one-pot синтез 1*H*-піримідо[2,1-*b*]хіназолін-2,6-діонів **1.42** (схема 1.18). Імінофосфорани **1.40**, одержані з аддуктів Бейліса–Хілмана, взаємодіють з 2-азидобензоїлхлоридом з утворенням відповідних азидів **1.41**. Наступна тандемна реакція аза-Віттіга /нуклеофільного приєднання / внутрішньомолекулярної циклізації / ізомеризації між азидами **1.41**, трифенілфосфіном та ізоціанатом у присутності натрій етоксиду приводить до утворення цільових піримідо[2,1-*b*]хіназоліндіонів **1.42**.



Yang і співавтори [21] синтезували з чудовими виходами новий клас трициклічних хіназолін-4-онів **1.46** шляхом внутрішньомолекулярної циклізації вихідних 3-(2-аміноалкіл)-2-(феніламіно)хіназолін-4(3*H*)-онів (**1.43**), каталізуючи перебіг реакції мурашиною кислотою (схема 1.19).



## 1.2 Фармакологічні властивості похідних хіназолінону



Гетероцикл хіназоліну є ключовим та невід'ємним фармакофором різноманітних природних та синтетичних біологічно активних речовин, фармацевтичних та агрохімічних продуктів [22]. Проаналізувавши літературні дані стає очевидним значущий фармакологічний потенціал похідних хіназолінону з різними напрямками для прояву терапевтичних ефектів, зокрема антимікробних [23], протипухлинних [24], протівірусних [25], протисудомних [26], протималарійних [27], протизапальних [28; 29], антигіпертензивних [30], антипаркінсонічних [31], анальгетичних [32], антидепресантних [33], антигістамінних [34] та інших засобів (рис.1.2 ).

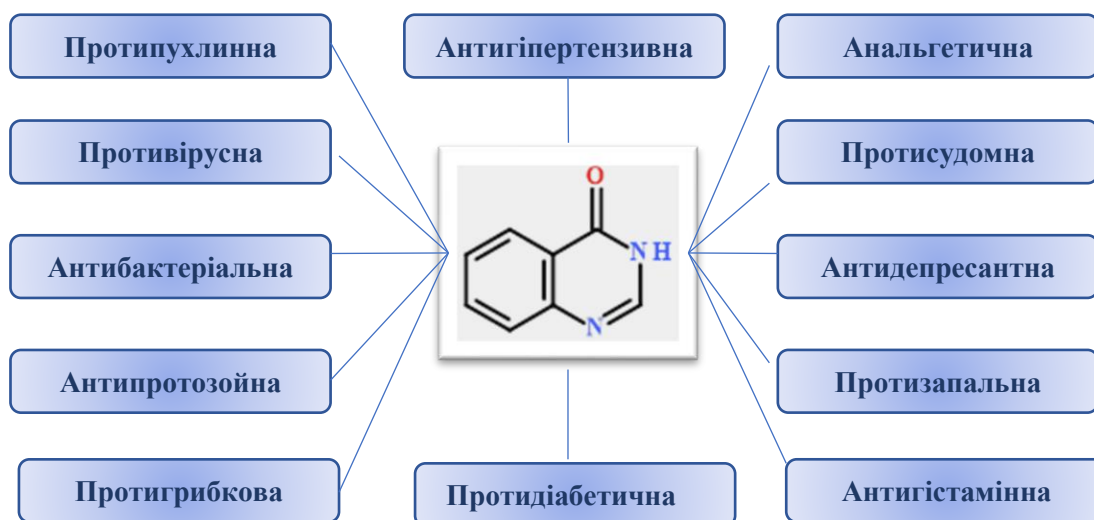
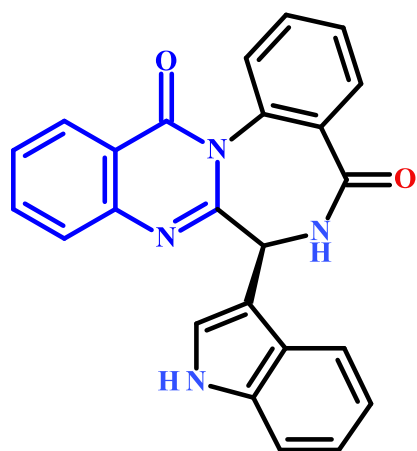


Рис. 1.2 Фармакологічна активність похідних хіназолін-4(3H)-ону

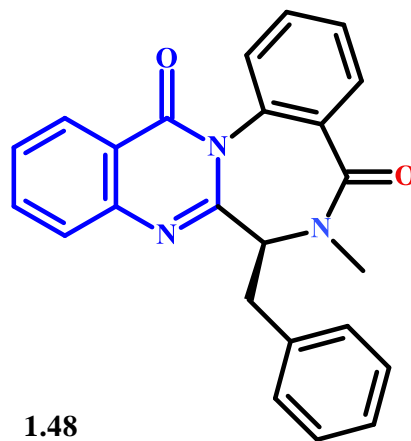
### 1.2.1 Хіназолінон у структурі природних речовин

Хіназолінони [35] є білдинг-блоком більш ніж 150 природних алкалоїдів, виділених із царства рослин, мікроорганізмів і тварин. У структурі деяких алкалоїдів хіназолінон конденсований з іншими гетероциклами, наприклад, з бензодіазепіндіоном – асперліцин С/D, або дикетопіперазином – фуміхіназолін F. Ці природні алкалоїди виділені з різних видів мікроорганізмів: асперліцини

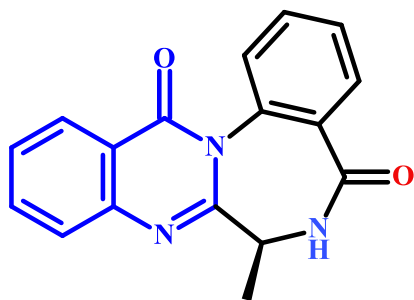
А–Е (**1.47**) ізольовані з *Aspergillus alliaceus*, бензомальвін А–С (**1.48**) – з *Penicillium sp.*, циркумдатін А–Г (**1.49**) – з *Aspergillus ochraceus* та склеротигенін (**1.50**) – з *Penicillium sclerotigenum* [36].



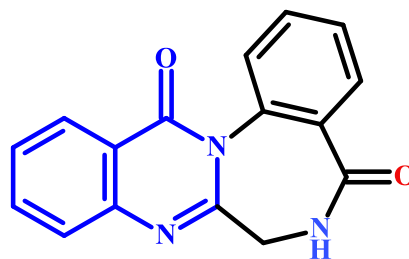
1.47



1.48



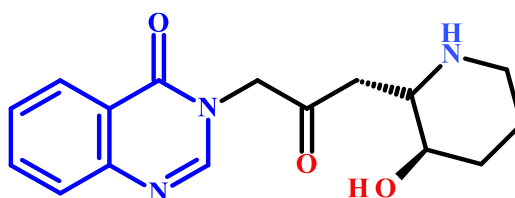
1.49



1.50

Більшість з них вже має визначену біологічну активність, зокрема протипухлинну дію [37]. Асперліцин, наприклад, демонструє потужний антагонізм щодо рецепторів холецистокініну [38].

Протималарійну та антикоксидну дію має природний алкалоїд фебрифугін (**1.51**), вперше виділений з *Dichroa febrifuga*. Рослина традиційно використовується для протималарійних рецептів у Китаї та інших частинах Азії [39]. Клінічне застосування фебрифугіну обмежене через наявність побічних ефектів та його токсичності. Рослина традиційно використовується для протималарійних рецептів у Китаї та інших частинах Азії [39].



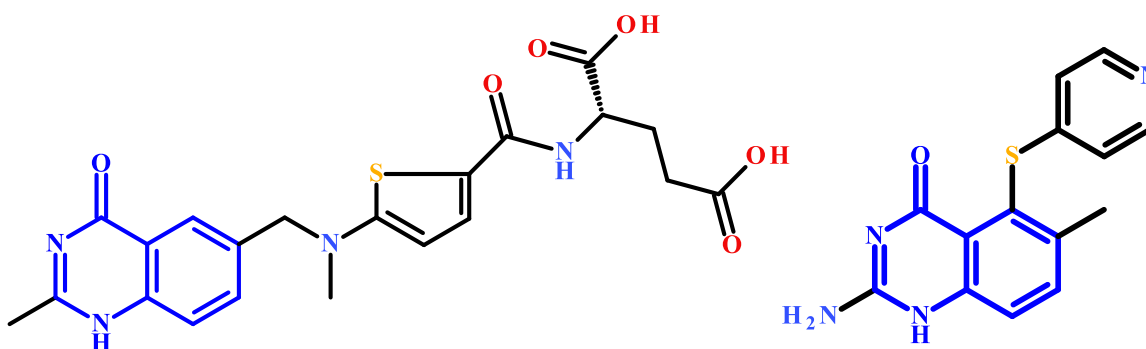
1.51

Крім того, було продемонстровано потенційне застосування аналогів фебрифугіну в боротьбі з фіброзними захворюваннями. Зараз науковці приділяють значну увагу синтезу структурних аналогів фебрифугіну, які б мали вищий терапевтичний потенціал і в той же знижену токсичність [40].

### 1.2.2 Похідні хіназолінону в структурі лікарських засобів

На сьогодні відомо багато синтетичних похідних на основі хіназолінону, які використовуються в клінічній практиці або проходили клінічні випробування для лікування різноманітних захворювань.

Особливу увагу привертає протипухлинна активність похідних хіназолін-4(3*H*)-ону. Широко застосовується як антиметаболічний препарат – ралтитрексед (**1.52**) – антагоніст фолієвої кислоти, селективний та специфічний інгібітор тиміділатсинтази – ензиму, який каталізує метилювання дезоксиуридинмонофосфату з перетворенням його на тимідинмонофосфат [25].



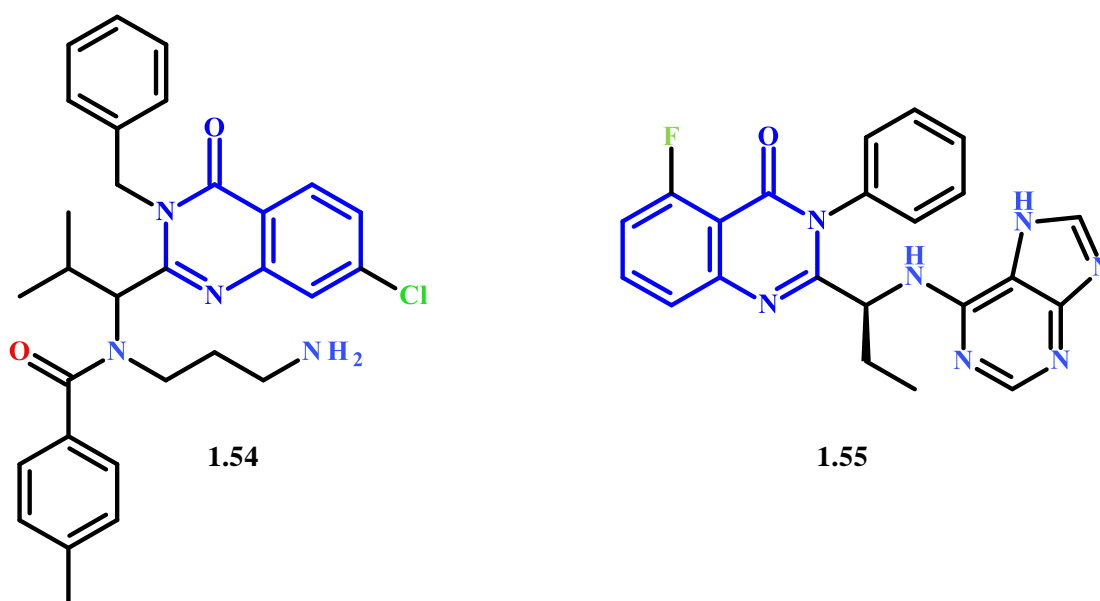
1.52

1.53

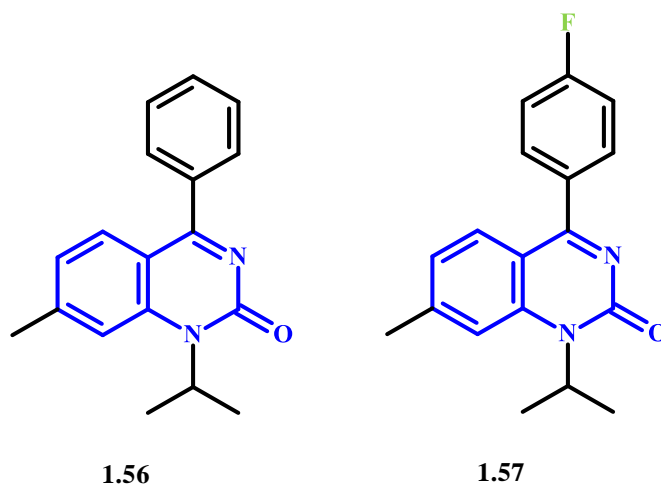
Ралтитрексед є першим специфічним інгібітором TS, який специфічно зв'язується з фолатним активним сайтом TS. Був розроблений як аналог

неселективних інгібіторів TS – флуоропіримідинових похідних. Ралтитрексед схвалено для клінічного застосування при поширеному колоректальному раку. Терапевтичного застосування досяг й інший селективний інгібітор TS – нолатрексед (**1.53**), який було синтезовано як структурний аналог фолієвої кислоти.

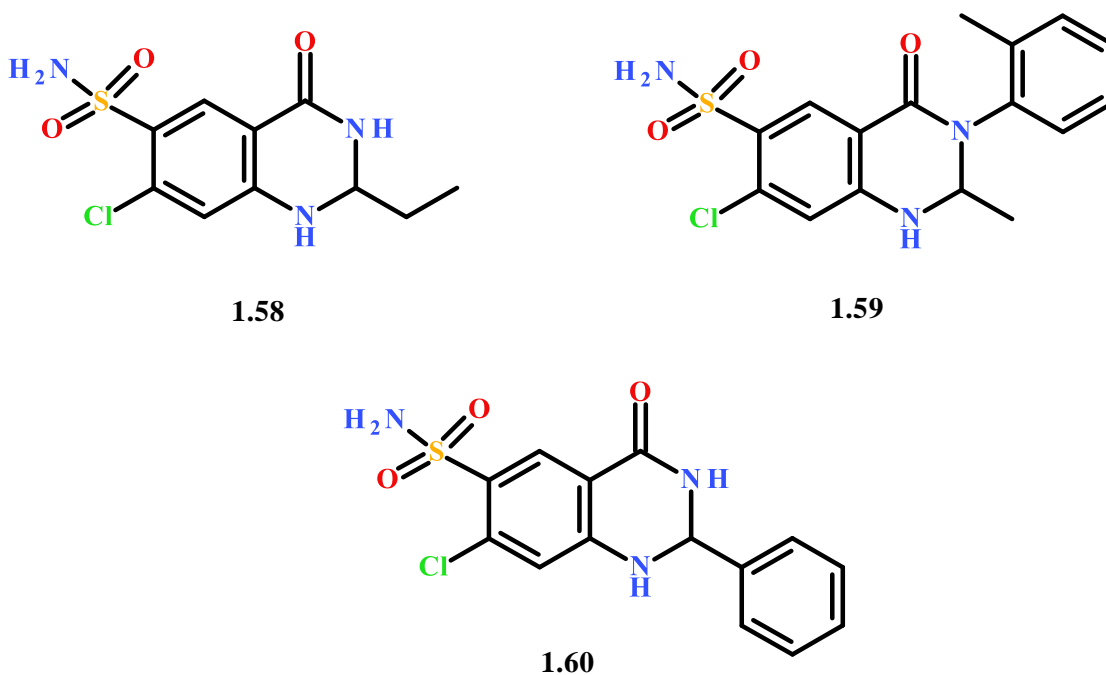
Іспінесиб (**1.54**) селективно пригнічує мітотичний кінезин – протеїн кінезинового веретена (KSP), що належить до родини кінезину-5 та відіграє вирішальну роль під час мітозу та нерегульованої клітинної проліферації [41]. Іделалісіб (Зиделиг) (**1.55**) – лікарський препарат із групи селективних інгібіторів фосфоінозитид-3-кінази, затверджений FDA у 2014 р. для лікування різних видів лейкозу та лімфоми [42]. Механізм дії обумовлений конкурентним заміщенням молекули АТФ в активному сайті фосфоінозитид-3-кінази та спричиняє повну інактивацію ферменту.



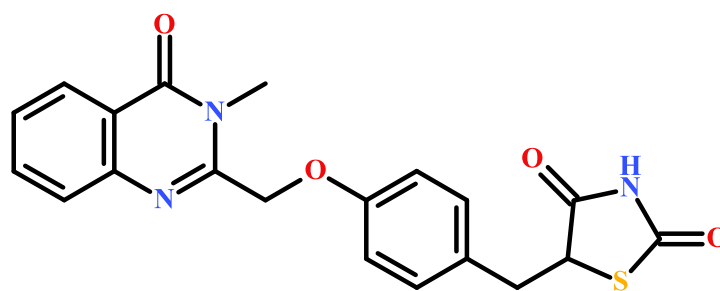
Проквазон (**1.56**) належить до групи нестероїдних протизапальних засобів, який застосовується для лікування артриту та остеоартриту. Проквазон був розроблений як аналог флупроквазону (**1.57**), у якого після тривалого клінічного застосування було виявлено високий рівень гепатотоксичності [43].



Похідні хіназоліну демонструють значну ефективність як антигіпертензивні засоби, зокрема, клас антагоністів  $\alpha 1$ -адренорецепторів – празозин, теразозин, доксазозин селективно діють на рецептори гладкої мускулатури судин та використовуються для лікування доброякісної гіперплазії передміхурової залози [44, 45]. Антигіпертензивну дію виявляють і 4-оксопохідні хіназоліну – квінетазон (**1.58**), зароксолін (**1.59**) та фенквизон (**1.60**) [46], які застосовують для лікування серцево-судинних захворювань. Однак механізм їх антигіпертензивної дії реалізується через діуретичну активність і препарати віднесені до тiazидоподібних діуретиків тривалої дії, що застосовуються при хронічній нирковій недостатності.

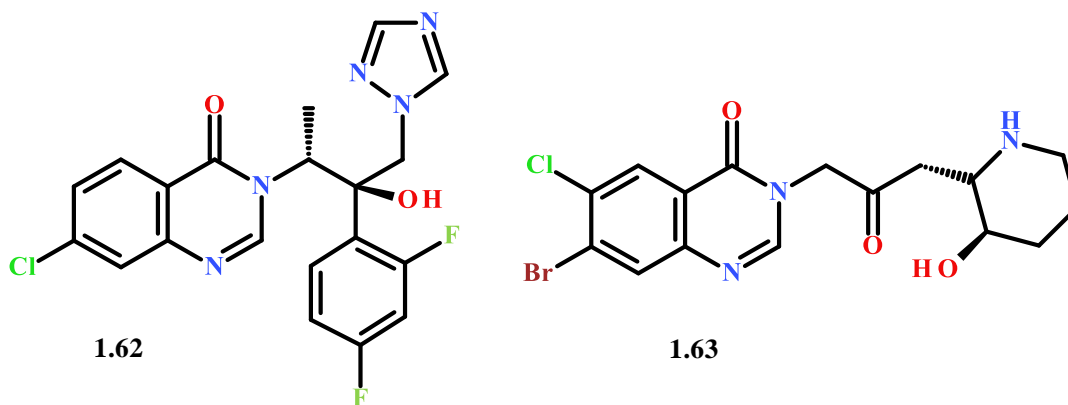


Компанією Dr. Reddy's Laboratories було синтезовано гібридну молекулу, яка містить два гетероциклічні фармакофори – тiazолідиндіон та хіназолін-4-он – балаглітазон (**1.61**) – агоніст рецепторів, які активуються проліфератором пероксисом, та виявляє гіпоглікемічний ефект [47]. Розробка препарату була зупинена після III фази клінічних досліджень у 2011 році, оскільки він не виявив кращої ефективності за наявні на той час аналоги.



1.61

У похідних хіназолін-4-ону визначений і широкий спектр протимікробної активності з різними механізмами дії на мікробну клітину, наприклад, албаконазол (**1.62**) виявляє протигрибкову та антипротозойну активність [1].

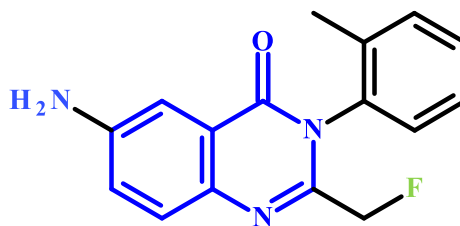


1.62

1.63

Галофугінон (**1.63**) – антималярійний агент, який є синтетичним похідним природного алкалоїду фебрифугіну. Крім того, визначено, що галофугінон є потужним і селективним інгібітором диференціювання 17 типу Т-хелперів (Th17) [48].

У 1970-роках був розроблений афлоквалон (**1.64**) – міорелаксант із седативним ефектом. Пізніше було визначено механізм його дії через агонізм до  $\beta$ -підтипу ГАМК-рецептора. Наразі він не має клінічного застосування через значний фотосенсибілізуючий побічний ефект [49].



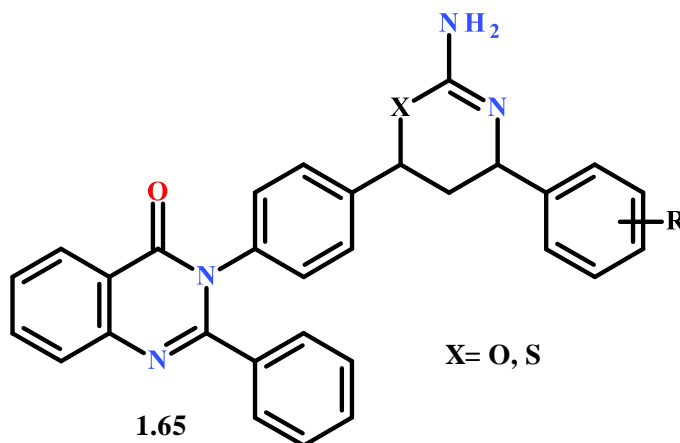
1.64

### 1.2.3 Похідні хіназолін-4(3*H*)-ону, які діють на ЦНС

#### 1.2.3.1 Протисудомна активність похідних хіназолінону та SAR аналіз

Протисудомна активність похідних хіназолін-4(3*H*)-ону привертає увагу багатьох наукових груп, вірогідно, з огляду на доведену можливість модуляції різних напрямків епілептогенезу через афінність до різноманітних таргетів [50].

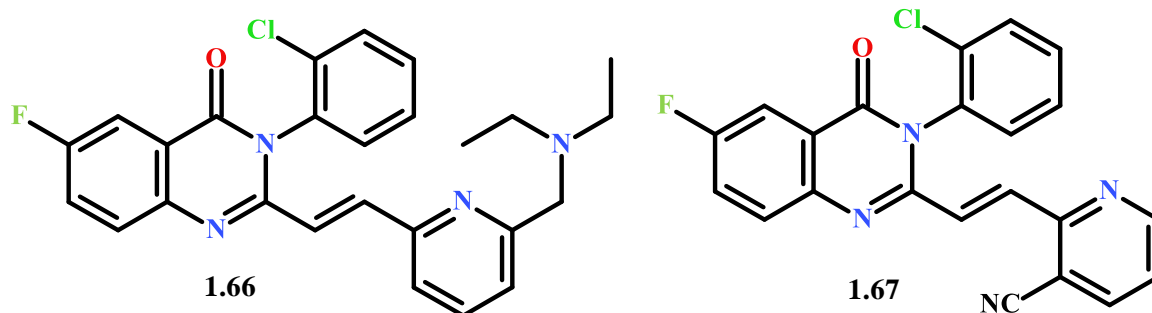
Значний протисудомний потенціал 2-фенілзаміщених похідних хіназолінону **1.65** доведений на моделях MES та PTZ, а відсутність у цих похідних нейротоксичності та впливу на поведінкові реакції доведено у тесті стрижня, що обертається [51].



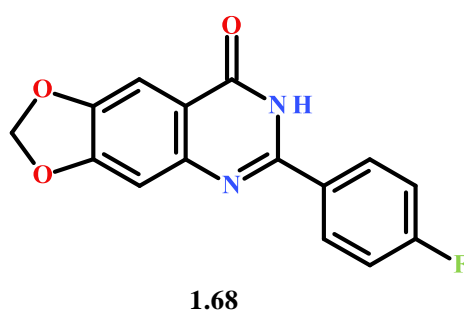
1.65

*In silico* методами визначено високу спорідненість з ГАМК<sub>A</sub>-рецептором. SAR-аналіз показав, що введення оксазину або тіазину в *n*-положення фенільного кільця відіграє важливу роль в активності, а заміщений електронегативною групою -NO<sub>2</sub> аналог виявився значно ефективнішим, ніж незаміщений.

Похідні хіназоліну є цікавим класом специфічних та потужних конкурентних антагоністів глутаматних АМРА-рецепторів з нейропротекторною та антиконвульсантною дією. На початку 2000 років дослідницькою групою Pfizer були розроблені неконкурентні антагоністи АМРА рецепторів – сполуки, що містять каркас хіназолін-4(3*H*)-ону [52; 53]. Сполука CP-465,022 (**1.66**) була протестована в різних фармакологічних дослідженнях і визначена її протисудомна ефективність щодо судом індукованих PTZ [54]. Довести механізм дії через неконкурентний високоспецифічний антагонізм до АМРА рецепторів вдалося радіоактивним ізотопом сполуку CP-526,427 (**1.67**), яка є структурним аналогом CP-465,022, що дозволило визначити місце зв'язування алостеричних модуляторів АМРА рецепторів [55].



У серії 6,7-метилendioксихіназолінів ідентифіковано одну сполуку – 2-(4-флуорфеніл)-6,7-метилendioкси-3*H*-хіназолін-4-он (**1.68**) – з виразною протисудомною активністю в тесті *in vivo* на моделі аудіогенних судом, що відповідає генералізованій епілепсії людини.

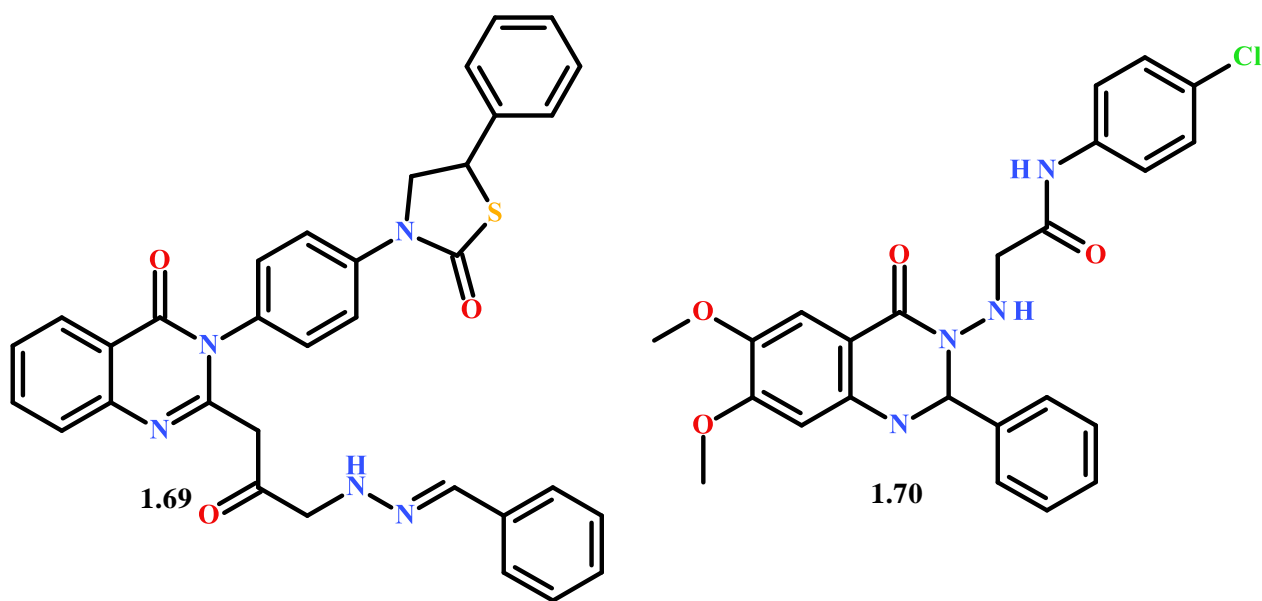


В експерименті визначено цікаву закономірність впливу галогенів у положенні 4 фенільного кільця: активність знижується в ряду



FPh>ClPh>Ph>BrPh. Однак достовірно визначити механізм їх антиконвульсантної дії не вдалося [53].

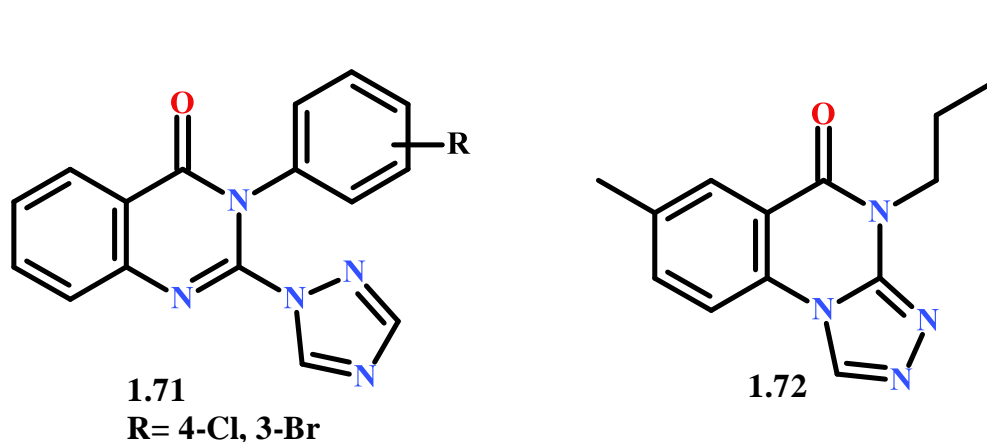
З використанням інструментів *in silico* моделювання сконструйовано ряд перспективних антиконвульсантів похідних 2-(2-заміщених бензиліденгідразиніл-2-оксопропіл)-3-(4-[4-оксо-2-фенілтіазолодин-3-іл]феніл)хіназолін-4(3*H*)-ону. Протиепілептичні ефекти сполук оцінювали у тестах MES та PTZ, а гостру неврологічну токсичність – ротарод-тестом. Найвищу ефективність мали гідразинні похідні, зокрема сполука 2-(2-[4-амінобензиліден]гідразиніл-2-оксопропіл)-3-(4-[4-оксо-2-фенілтіазолодин-3-іл]-феніл)хіназолін-4(3*H*)-он (**1.69**), яка мала широкий спектр протиепілептичної активності без жодних проявів нейротоксичності [56].



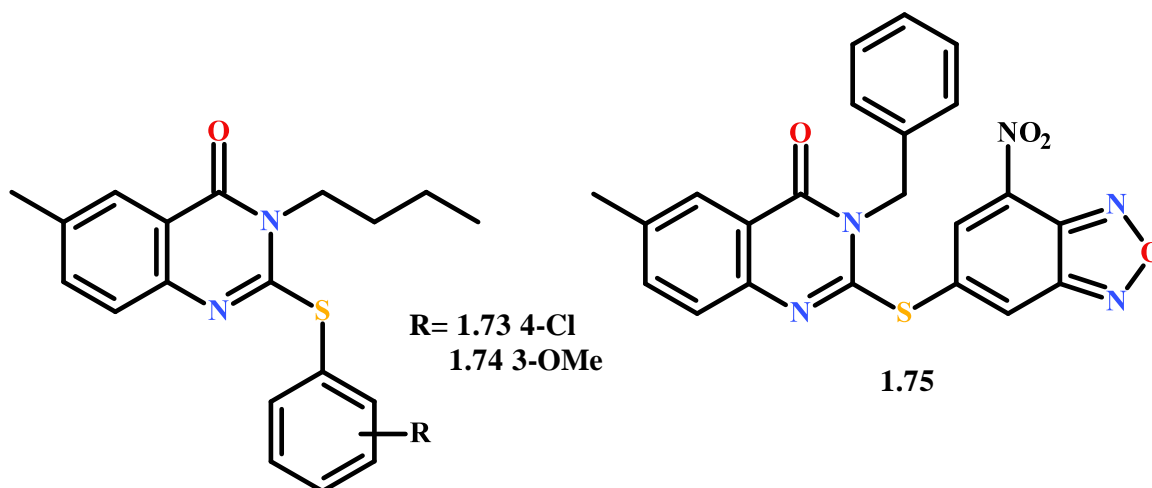
Після дослідження серії з шістнадцяти фенілацетамідних похідних хіназолін-4(3*H*)-ону на моделях MES, scPTZ та в тесті стрижню, що обертається, відмінну протисудомну активність без прояву нейротоксичної дії ідентифіковано у 4-хлорофенілпохідної **1.70**. Дослідження SAR показало, що сполуки, які мають електроноакцепторні замісники у фенільному кільці (F, Cl, F, CF<sub>3</sub> та ін.) у пара-положенні виявляють вищий ступінь активності на відміну від їх орто- та мета-аналогів. Найнижчу активність виявляють MeO- та EtO-

заміщені похідні навіть при високих дозах. Методом віртуального скринінгу було визначено спорідненість до NMDA-рецепторів, з визначеною вагомою функцією карбонілу хіназолінового циклу для взаємодії з залишком Arg 131 [57].

Реалізацією гібридної концепції пошуку БАР [58] створено ряд 4-арил-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]хіназолін-5(4*H*)-онів **1.71**, які містять гетероциклічні замісники, зокрема 1,2,4-тріазол. Результати скринінгу синтезованих похідних **1.72** у тесті MES та ротарод-тесті окреслили перспективність їх вивчення як протисудомних речовин через значно вищий захисний індекс (PI>26.0) відносно наявних препаратів. На додаток до цього похідні мають значну пероральну активність проти MES-індукованих судом у мишей – середньоефективні дози (ED<sub>50</sub>) склали 88,02 і 94,60 мг/кг, відповідно. У той же час трициклічний гібрид – [1,2,4]тріазоло[4,3-а]хіназолін-5-он **1.72** – не виявив таких значних результатів у жодному з тестів (MES, PTZ, ротарод) поступаючись референсам – етосукцимід та фенобарбіталу [8].

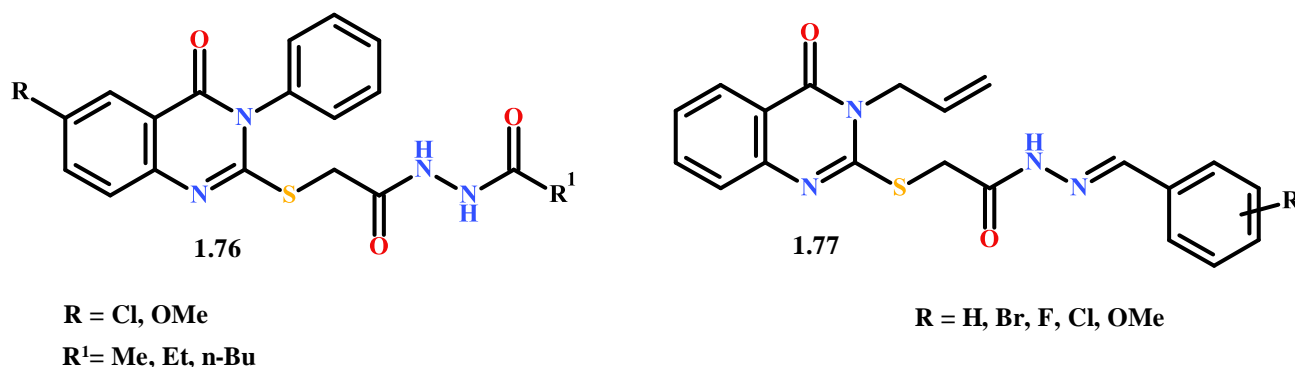


Виявлена ефективність синтезованих 2-тіопохідних хіназолін-4(3*H*)-онів, які було оцінено на протисудомну дію на моделях судом, спричинених максимальним електрошоком та PTZ після внутрішньоочеревинного та підшкірного введення мишам, відповідно [8]. Найактивнішими виявилися похідні **1.73-1.75**, які продемонстрували в чотири рази потужнішу активність, ніж референс препарат етосукцимід та чинили 100% захист від судом, спричинених PTZ.



До того ж речовини виявили низьку нейротоксичність у ротарод-тесті. Аналіз взаємозв'язку між структурою та активністю показав, що бутильний замісник в положенні 3 хіназолінового циклу має значний вплив на запобігання поширенню судомного розряду та подовження латентного періоду, а бензильний замісник – підвищує силу протисудомної дії. Бензодіазоксазольний фрагмент у положенні 2 також посилює протисудомну активність бензилзаміщених у положенні 3 похідних. Для усіх сполук прогнозовано високу афінність до ферменту карбоангідази II людини (CA II) [8].

Протисудомну активність виявили й нові похідні – гідразинокарботіоаміди, бензенсульфогідразиди та фенацетацетогідразиди хіназолін-4(3*H*)-ону [59] на PTZ та пікротоксиновій моделі судом. Похідні **1.76** ідентифіковані як найпотужніші зі 100% захистом від судом, викликаних PTZ порівняно зі стандартним препаратом натрій вальпроатом.

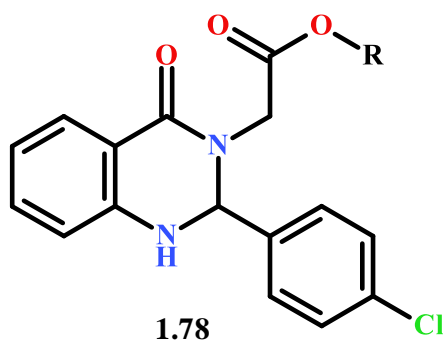


Молекулярне моделювання дозволило отримати інформацію про зв'язування похідних **1.76** з бензодіазепіновим (BZD) сайтом ГАМК<sub>A</sub>-рецептора через гідрофобну взаємодію з амінокислотами Thr56, Gln56 та Gln119.

Ідентифіковано і ряд нових 3-алілзаміщених похідних 2-тіохіназолін-4(3*H*)-ону та їх основ Шиффа з протисудомною активністю **1.77**, оціненою за допомогою MES, PTZ та ротарод-тестів. SAR дослідження виявило доцільність варіації метильної групи в положенні 2 хіназолінового циклу на SCH<sub>2</sub>CO, SCH<sub>2</sub>CONH, SCH<sub>2</sub>COO та/або SCH<sub>2</sub>CONHN та заміщення фенільного кільця в положенні 3 на алільний залишок, що поліпшує показники протисудомної активності. Доведена і значна роль електронної природи та ліпофільності замісників у прояві протисудомної активності [60].

#### 1.2.3.2 Інгібітори моноамінооксидази серед похідних хінізолін-4(3*H*)-ону

Серед нової синтезованої серії естерів та гідразидів амінокислот хіназолінону визначено інгібітори моноамінооксидази – ензимів типу А (MAO-A) та В (MAO-B) [61]. Вищу афінність до MAO-A, ніж MAO-B та конкурентний профіль інгібування щодо стандартного препарату – клоргіліну продемонстрували сполуки формули **1.78**.

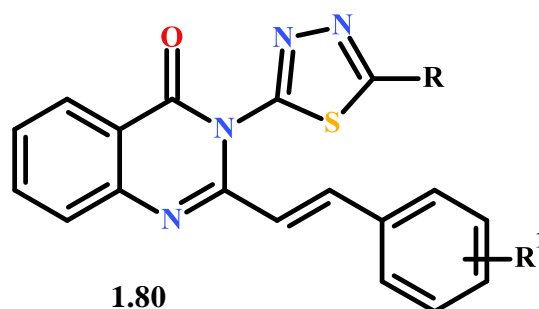
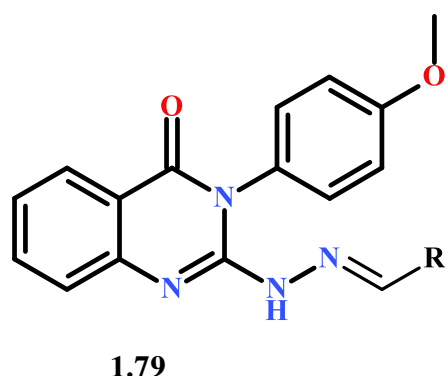


R= Me, Et

Причому індекс селективності до MAO-A визначений молекулярним моделюванням для сполуки **1.78** становив 39524, що перевищує індекс селективності стандартного клоргіліну – 33793.

#### 1.2.3.3 Седативна та гіпнотична активність похідних хіназолін-4(3*H*)-ону

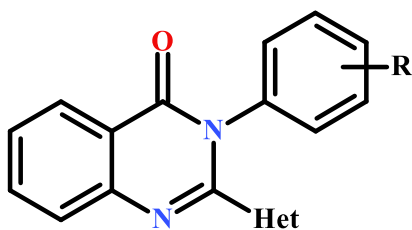
Значна кількість публікацій щодо вивчення седативно-снодійної активності похідних хіназолін-4(3*H*)-ону, ймовірно, обумовлена визначеним ГАМКергічним впливом деяких його похідних. Так, шляхом моніторингу рухової активності піддослідних тварин за допомогою актофотометра визначено седативно-снодійну дію для похідних загальної формули **1.79**. Однак пригнічувальний вплив на ЦНС поступався референс-препарату діазепаму (56,5% щодо 85,9%, відповідно) [28].



R = H, Me  
R<sup>1</sup> = 4-OMe, 3-Cl, 4-Cl

Серія експериментів щодо впливу замісників на пригнічувальну активність нових 1,3,4-тіадіазолзаміщених хіназолін-4(3*H*)-онів (**1.80**) дозволили визначити, що в хіназоліноновому циклі присутність саме СН=С-групи при С-2 та 1,3,4-тіадіазолів при С-3 призводить до підвищення депресивної та седативно-снодійної активності щодо ЦНС та не впливає на протисудомну активність [62].

Седативно-снодійну активність різних 2-гетерилзаміщених хіназолінонів загальної формули **1.81** досліджували вимірюванням впливу на рефлекс випрямлення у мишей. Найменший вплив має тієнільний радикал, тоді як піридинильний та морфоліновий фрагменти суттєво підвищують активність. Специфічну максимальну снодійну активність виявлено для 2-(4-піридил)-3-(2-флуорофеніл)-хіназолін-4(3*H*)-ону: час засинання 3,5 хв при 30 мг/кг, що відповідає показникам метаквалону (5,5 хв) [28].

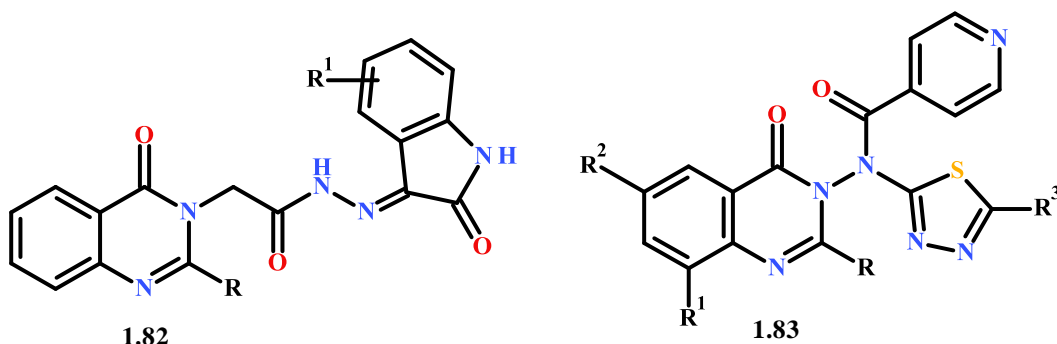


1.81

Het = thienyl, pyridyl, morpholin  
 R = Me, 4-OMe, 3-Cl, 4-Cl, 3-F, 4-F

#### 1.2.3.4 Інші впливи похідних хіназолін-4(3*H*)-ону на діяльність ЦНС

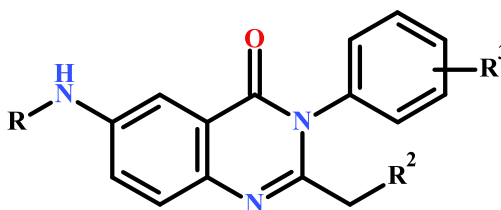
Сполуки з гідразидними залишками загальної формули **1.82** окрім значної анальгетичної дії виявили помірну активність щодо потенціювання наркотичної дії індукованої пентабарбітоном [63]. При цьому визначено, що сполуки з фенільним залишком при С-2 мають як вищі значення анальгетичної дії, так і вищий адиктивний потенціал, що може бути обумовлено збільшенням ліпофільності сполук.



Крім значного протизапального ефекту, який перевищував показники ібупрофену, сполуки формули **1.83** здатні викликати значні поведінкові порушення та дозозалежну депресію у піддослідних тварин [64].

Ще у 1979 році проведено серію експериментів та визначено, що заміна атома кисню на атом сульфуру у положенні 4 хіназолін-4(3*H*)-ону призводить до втрати дії на ЦНС [65]. Депресивну дію щодо ЦНС у тесті стрижня, що обертається, визначено в похідних формули **1.84**. SAR аналіз результатів тестів показав, що заміна одного або двох атомів водню у 2-метильному радикалі атомами флуору призводить до незначного зниження

активності, тоді як 2-трифлуорометильна похідна прискорює втрату рефлексу правосторонньої орієнтації. Також спостерігається і підвищення гострої токсичності зі збільшенням атомів флуору. Авторами обговорено значну роль аміногрупи у положенні 6 хіназолінового циклу для прояву депресивної активності похідних, оскільки її заміна призводить до різкого зниження активності [66].



1.84

За результатами літературного огляду розглянуто існуючі варіанти синтезу похідних хіназолін-4(3*H*)-ону, що вказує на варіабельність скафолду та легкість конструювання бажаних сполук з введенням цільових фармакофорів у структуру гетероциклу. Аналіз результатів вивчення фармакологічної активності похідних хіназолін-4(3*H*)-ону свідчить про пріоритетність їх впливу на ЦНС та доцільність пошуку протисудомних агентів, а вже визначені кореляції щодо взаємозв'язку між фрагментарною структурою та активністю є цінним наробком для раціонального дизайну нових протисудомних лігандів.

## РОЗДІЛ 2

### ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ ТА *IN SILICO* ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ЦІЛЬОВИХ СТРУКТУР

Обмеження традиційних протиепілептичних препаратів (ПЕП), зокрема недостатня ефективність при фармакорезистентних формах та значні побічні ефекти, підкреслюють гостру потребу у розробці нових більш ефективних препаратів для лікування епілепсії особливо рефрактерних форм. Впродовж останніх десятиліть досить жваво розвивався напрямок досліджень щодо конструювання протисудомних засобів (ПСЗ), що дозволило визначити кореляції між структурою та фармакологічною ефективністю та сформулювати загальні висновки, які надають багатонадійні можливості для подальшої раціоналізації експериментальних досліджень. У науковій спільноті вже визнана недоцільність рандомного пошуку ПСЗ шляхом скринінгу великих масивів новосинтезованих сполук і вже постульовано підходи раціонального дизайну біологічно активних сполук [67].

#### 2.1 Конструювання загального алгоритму дослідження щодо пошуку нових антиконвульсантів

Основна мета нашого дослідження полягала в синтезі нових структур зі значними показниками протисудомної активності як потенційних ПСЗ. Успішність розробки нового препарату неабияк залежить від ґрунтового, детального та виваженого проєктування експериментальних досліджень. Нагальним завданням є вибір базового скафолду, а потім поетапне, виважене та комплексне окреслення експериментальних методів доклінічного дослідження з використання *in vivo* моделей скринінгу з урахуванням світових тенденцій та інновацій щодо пошуку ПЕП, зокрема рекомендацій Epilepsy therapy screening program (ETSP) [68] та Anticonvulsant Drug Development Program [69]. Загальний алгоритм досліджень наведено на рис. 2.1.





Рис. 2.1 Загальний алгоритм дослідження щодо пошуку нових антиконвульсантів

## 2.2 Побудова цільових структур як протисудомних лігандів

Вибір ключового скафолду для конструювання сполук є конститутивним та першочерговим етапом експериментальних досліджень щодо пошуку нових біологічно активних речовин. Аналіз літературних джерел свідчить, що гетероцикл хіназоліну є вагомим фрагментом для прояву активності, а також сприятливим та зручним з точки зору органічного синтезу та структурної варіабельності для різнобічного поліпшення властивостей молекул [70]. Вважається, що пріоритетним вектором впливу похідних хіназолінону є модуляція діяльності ЦНС, зокрема це седативно-снодійна та протисудомна дія, що в достатньому обсязі продемонстровано в огляді літератури. Крім того, хіназолін є бензанельованим аналогом піримідину, протисудомні властивості якого відомі з часів відкриття фенобарбіталу та неодноразово доведені експериментальними дослідженнями, які проводяться на кафедрі фармацевтичної хімії НФаУ щодо пошуку антиконвульсантів [71]. Отже, головним скафолдом нашого дослідження обрано хіназолін-4(3*H*)-он (рис. 2.2).

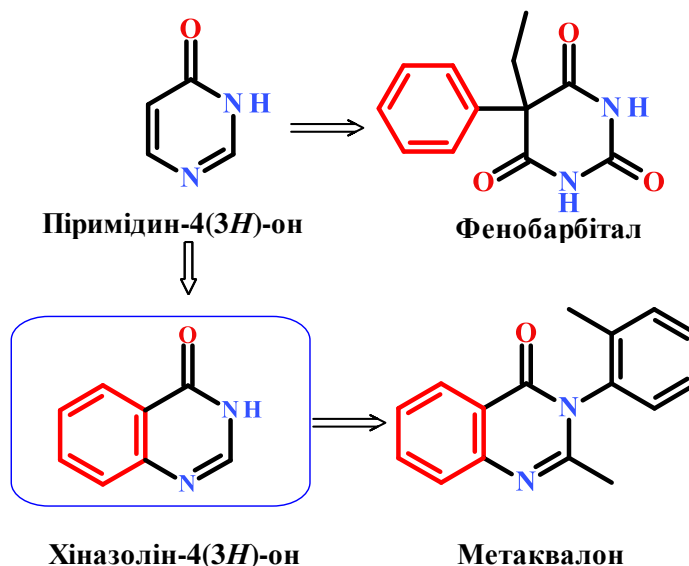


Рис. 2.2 Скафолд для конструювання цільових структур-лігандів

Пріоритетним напрямком раціонального дизайну БАР залишається структурна модифікація вже відомих препаратів, з метою надання їм бажаного

фармакологічного профілю зі зниженими параметрами токсичності, зокрема нейротоксичності. З-поміж похідних хіназолін-4(3*H*)-ону були зареєстровані ПСЗ, але левова частка з них наразі не застосовується через високі показники нейротоксичності та низькі значення захисного індексу [72, 73]. У 1968 році було зареєстровано препарат метаквалон, який сьогодні заборонений у більшості країн світу через розвиток залежності у пацієнтів [74]. Метаквалон дав початок ері вивчення його структурних аналогів як антиконвульсантів та визначення чітких взаємозв'язків структура-активність (рис. 2.3) [50].

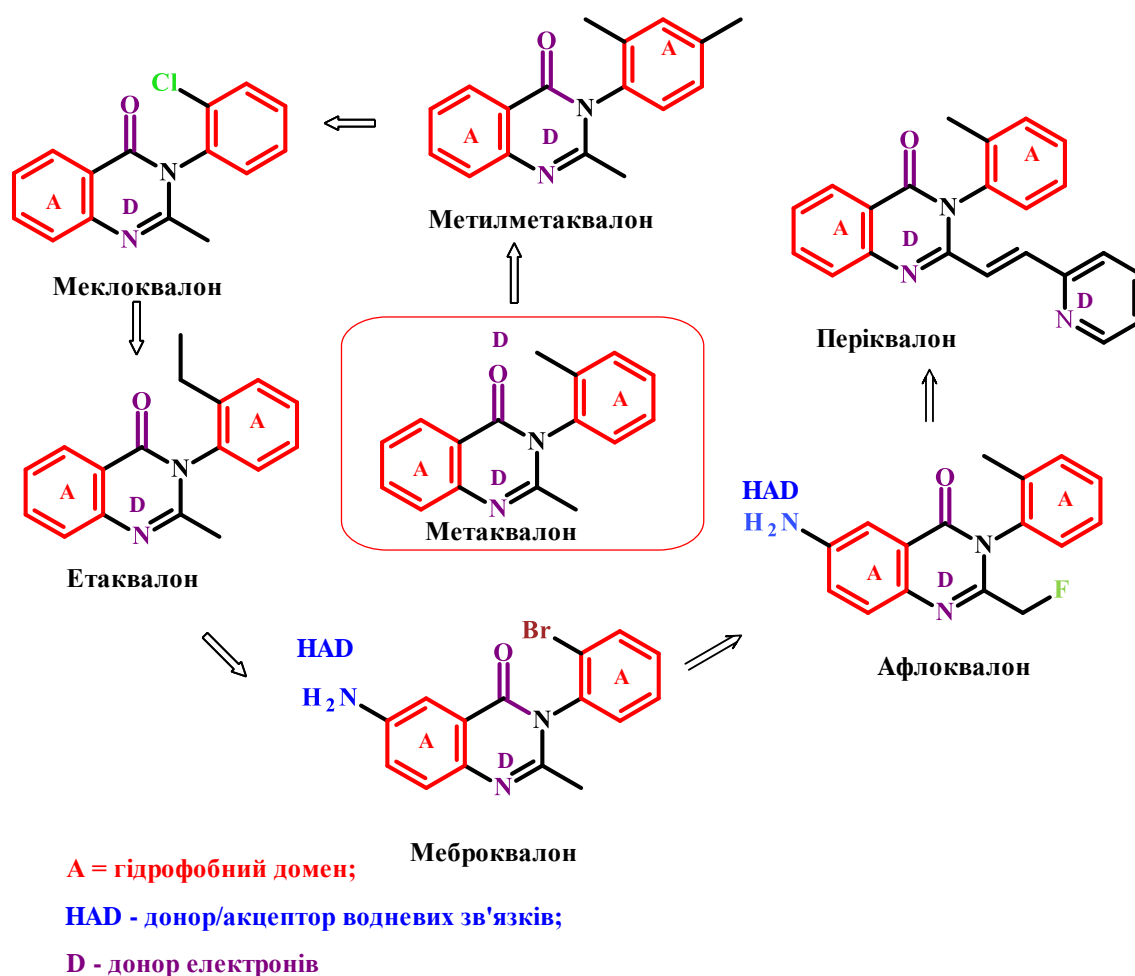


Рис. 2.3 Антиконвульсанти серед структурних аналогів метаквалону та їх фармакофорні фрагменти

Модифікація в третьому положенні хіназолінового кільця дозволила синтезувати потужні антиконвульсанти – метилметаквалон, меклоквалон,

етаквалон, меброквалон, а зміни у 2 положенні – афлоквалон та періквалон, які забезпечували високий ступінь захисту від судом на моделях хемотоксичних та електрошоккових судамах, однак жоден не застосовується на цей час через здатність викликати звикання [8; 75]. За даними SAR аналізу визначено, що висока ліпофільність похідних метаквалону та зокрема ліпофільний фармакофор у третьому положенні відіграє ключову роль і підвищує протисудомну активність сполук, але водночас збільшує і гепатотоксичність та нейротоксичність [50].

Нами проаналізовано структуру цих похідних щодо відповідності їх будови принципам сучасної фармакофорної концепції протисудомних засобів, за якою в структурі має бути гідрофобне арильне кільце (A), донор/акцептор водневих зв'язків (HAD), донор електронів (D) та дистально розміщений ще один гідрофобний центр – ароматичне кільце/його еквівалент (B), доведена необхідність наявності дистальної зони з функціональними групами здатними утворювати водневі зв'язки [76]. Як видно з рис. 2.2 у похідних метаквалону присутні гідрофобні компоненти та донори електронів, а домени водневих зв'язків та дистальні області з фрагментами HAD відсутні або представлені лише аміногрупою (афлоквалон, меброквалон). Тому магістральним напрямком модифікації обрано введення в структуру метаквалону саме дистальної області, що забезпечить формування водневих зв'язків при розміщенні в активному сайті біомішені та ліпшу конформаційну гнучкість молекули-ліганда. Конструювання структур-лігандів з потенційною протисудомною активністю здійснювали дотримуючись постулатів сучасної фармакофорної концепції створення нових ПЕП.

Дистальну зону вирішено сформувати замінивши метилфенільний радикал у положенні 3 метаквалону на залишок оцтової кислоти [77, 78]. Така варіація дозволить поєднати хіназоліновий скафолд із нейротропним медіатором – гліцином, який також може поліпшити показники протисудомної активності [78] (рис. 2.4).

Більшість ПЕП останніх поколінь містять у своїй структурі амідний фрагмент - лакосамід, ретигабін, ралітолін, руфінамід, фелбамат, леветирацетам, бриварацитам та ін. [80]. Перетворення гідрофільної карбоксильної групи в амідну шляхом взаємодії з алкіл- та ариламинами приведе до появи тієї бажаної дистальної зони – додаткового домену водневих зв'язків, які здатні стабілізувати конформацію ліганд-рецептор. У випадку арилзаміщених похідних збільшується дистальна відстань між ароматичними фрагментами молекули у порівнянні з метаквалоном [77, 78].

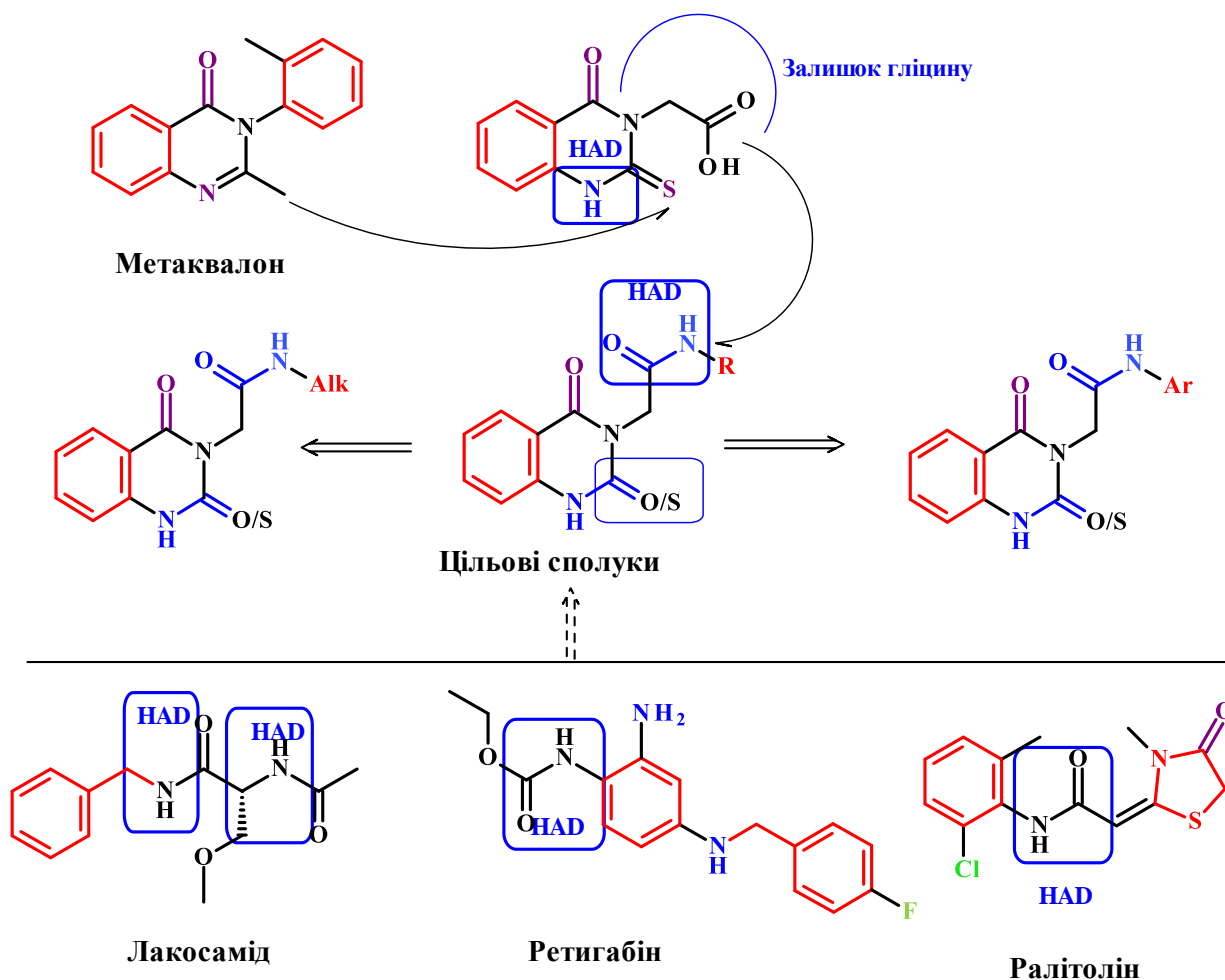


Рис. 2.4 Схема конструювання цільових сполук

Вирішено замінити метильну групу у положенні 2 на тіогрупу, яка не знизить ліпофільність сполуки, однак стане додатковим електронодонорним фрагментом, для утворення можливих сульфідних та електростатичних зв'язків у сайті рецептора. Також наявність тіо-групи у структурі може привести до

інгібування кофактору ферментів, зокрема карбонової ангідрази, яка є новою біомішенню для інноваційних ПСЗ [81]. Крім того, є відомості про вплив атома сульфуру на поліпшення протисудомної активності як на прикладі тіопіримідинів [82], так і, власне, тіохіназолінів [59].

Для визначення ролі замісника у положенні 2 хіназолінового циклу вирішено сконструювати сполуки в яких тіо-група замінена на карбонільну, що зумовить появу циклічної амідної групи, як ще одного НАД домену для фіксації в активному сайті.

Вибір замісників в ацетамідному фрагменті обумовлений літературними даними щодо впливу радикалів на протисудомну активність. Так, вже очевидно є цінність фенільного, бензильного фрагментів, а заміщення їх у пара-положенні на ліпофільні електронодонорні замісники, зокрема алкільні, має вагомше значення у порівнянні з мета- та орто-аналогами [6, 82, 83]. Дискусійним залишається вклад в прояв активності електроноакцепторних замісників у 2 та 4 положеннях ароматичного кільця [45, 84, 85]. Найбільше публікацій щодо ролі галогенідів, які впливаючи на електронну густину ароматичного кільця, поліпшують його гідрофобне зв'язування з амінокислотами активного сайту. Як замісники галогени є слабкими акцепторами водневих зв'язків, тому їх роль розглядається як гідрофобної компоненти. Хлор і бром, зокрема, є гідрофобними за своєю природою і можуть сприятливо взаємодіяти з гідрофобними кишнями активних сайтів. Атом флуору при зв'язуванні з амінокислотами зазвичай заміщує протони [86]. При конструюванні сполук було враховано вже накопичені знання щодо взаємозв'язку структура активність та сформовано віртуальну базу сполук як алкіл- та арилпохідні 2-(2-тіоксо-4-оксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміду (I) та 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміду (II) (рис. 2.4) [87].

Доведений неабиякий фармакофорний внесок амідного фрагменту, зокрема бензиламідного, у структуру багатьох потужних ПСЗ спонукав нас ввести в структуру сполук I та II додаткові залишки бензильного та арилацетамідного фрагментів у перше положення хіназолінового циклу (рис.

2.5). Метою такого заміщення стало введення як додаткового гідрофобного домену, так і створення додаткового дистального регіону з функціоналом для можливих водневих зв'язків, а також подальше визначення ролі циклічного NHCO фрагмента в реалізації протисудомної дії.

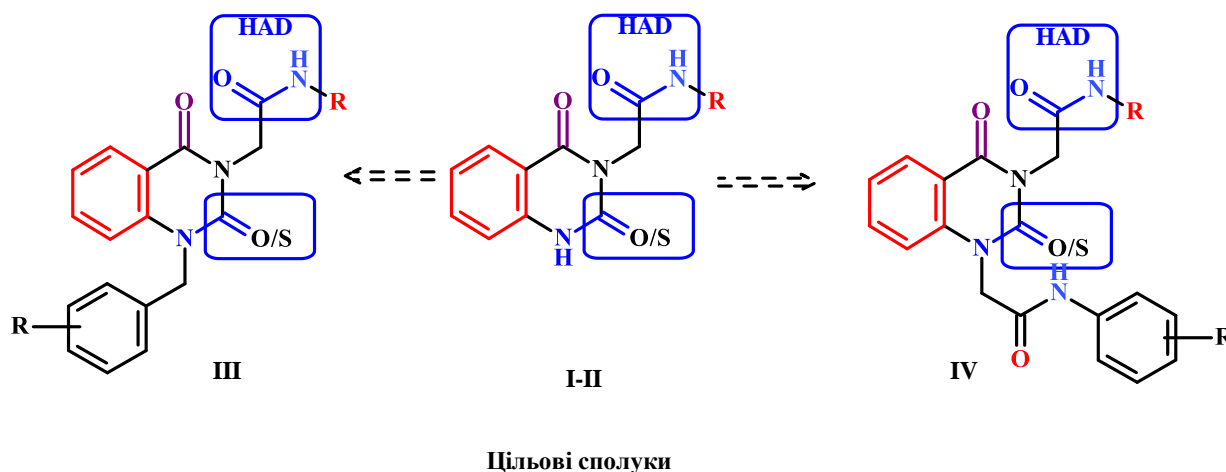


Рис. 2.5 Напрямки конструювання цільових сполук

З огляду на вищесказане сформовано чотири групи структур-лігандів на основі скафолду хіназолін-4(3H)-ону. Віртуальна база згенерованих протисудомних агентів склала 298 сполук. Всі вони перейшли на наступний етап віртуального мішень-орієнтованого скринінгу [87].

### 2.3 *In silico* прогнозування афінності до протисудомних біомішеней

Інструменти *in silico* створені для оптимізації скринінгового пошуку нових біологічно активних речовин в *in vivo* експерименті, що дозволяє зберегти піддослідних тварин, скоротити час і витрати на дослідження, та найголовніше – збільшити ймовірність досягнення бажаного результату. *In silico* методи вже є не просто доцільними, а обов'язковими елементами експерименту на ранніх стадіях програм розробки лікарських засобів. Провідні позиції серед арсеналу *in silico* методів займає молекулярний докінг через доступність та легкість застосування, високу продуктивність та значну достовірність показників за умови валідності використаних методологій. Науковцями кафедри

фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету за результатами масштабних досліджень був розроблений алгоритм пошуку нових ПСЗ з використанням інструментів молекулярного докінгу [88]. Алгоритм ґрунтується на чіткій кореляції між афінністю до біомішені – еталонним референс-лігандом – фармакологічним ефектом – моделлю *in vivo* скринінгу. Його поетапне застосування дозволяє спрогнозувати активність нової речовини на відповідній *in vivo* моделі та передбачити можливий механізм її фармакологічної дії. Саме цей алгоритм ми використали для віртуального скринінгу згенерованої бази похідних хіназолін-4(3H)-ону для попереднього ранжування сполук за перспективністю як протисудомних агентів та для синтетичних досліджень. За алгоритмом для прогнозування ГАМКергічного механізму дії сполук-лігандів та активності на моделі судом, індукованих PTZ, запропоновано визначати афінність та аналізувати конформаційне розміщення щодо референс-лігандів до ГАМКергічних біомішеней: ПАМ ГАМК<sub>A</sub> рецептора – бензамідину [89], агоніста бенздіазепінового (BZD) сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора – діазепаму [90], інгібітора ГАМК-амінотрансферази – вігабатрину [91].

За літературними даними фармакологічна дія метаквалону та інших похідних хіназолін-4(3H)-ону обумовлена модуляцією ГАМК рецепторів типу А, через алостеричне зв'язування з бенздіазепіновим активним сайтом [70, 92, 93]. Тож першою мішенню для віртуального скринінгу обрано BZD-сайт ГАМК<sub>A</sub> рецептора. В Protein Data Bank наразі не має даних щодо структур ГАМК<sub>A</sub> рецептора з хіназоліновим лігандом в активному сайті, тому для докінгу використано макромолекулу людського  $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$  ГАМК-рецептора з агоністом ГАМК в ортостеричному сайті та діазепамом в алостеричному сайті зв'язування – PDB ID 6HUP [90]. Валідацію методології докінгу проведено процедурою редокінгу з розрахунком середньоквадратичного відхилення (RMSD) між експериментальною та референс конформацією діазепаму. Значення RMSD склало 1.952 Å, що відображає відтворюваність експериментальних даних, а методику можна вважати валідною, оскільки значення RMSD в ідеалі має бути < 2 Å [94]. Енергія зв'язування діазепаму становить -9,9 ккал/моль, що



характеризує високу афінність діазепаму до активного сайту ГАМК<sub>A</sub>-рецептора. Відтворено усі взаємозв'язки з амінокислотами кристалізованого активного сайту [90]. Візуалізація референс-докінгу діазепаму зображено на рис. 2.6 [95].

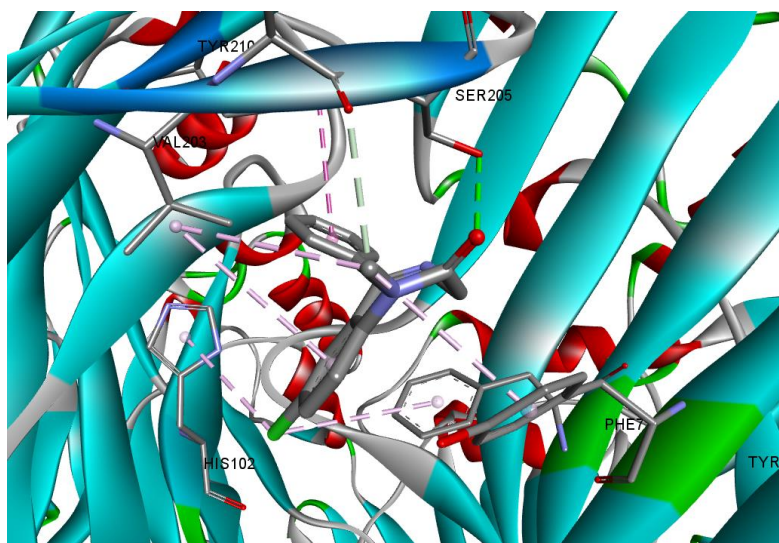


Рис. 2.6 3D зображення конформації діазепаму після ре-докінгу до ГАМК<sub>A</sub>-рецептора

За літературними даними для деяких похідних хіназолін-4(3*H*)-ону було визначено можливість інгібувальної дії до іонотропних NMDA- та AMPA-рецепторів глутамату [6]. При епілептогенезі доведеним є підвищення експресії саме постсинаптичних NMDA-рецепторів, тому здатність лігандів до їх інгібування є важливою ланкою ефективності ПСП. Щодо алгоритму пошуку нових ПСП визначено пряму кореляцію між пригніченням NMDA-рецепторів та ефективністю експериментальних речовин на PTZ-кіндлінговій моделі судом, а інгібування AMPA-рецепторів глутамату має ефективність у запобіганні судомних нападів викликаних електрошоком.

Для молекулярного докінгу до NMDA-рецепторів використано гетеротетрамерну макромолекулу, що складаються з гліцин-зв'язуючих субодиниць GluN1 і GluN3 та з глутамат-зв'язуючих субодиниць GluN2 – PDB ID 4KFQ [96]. Вважається, що саме селективні антагоністи, які розрізняють гліцинові ділянки субодиниць GluN1 і GluN3, є цінними фармакологічними інструментами для регуляції неврологічних захворювань, зокрема й епілепсії.

Тому як референс-ліганд слугував нативний антагоніст гліцину NMDA-рецептора – 1-тіоксо-1,2-дигідро-[1,2,4]триазоло[4,3-а]хіноксалін-4(5*H*)-он (ТК-40) зі значним протисудомним ефектом [97]. Процедураю ре-докінгу було розраховано значення енергії зв'язування ТК-40, яка склала -7.8 ккал/моль. Відповідність амінокислотних взаємодій експериментально описаним (рис. 2.7) та величина RMSD 1,89 доводять валідність методології докінгу, яку було застосовано.

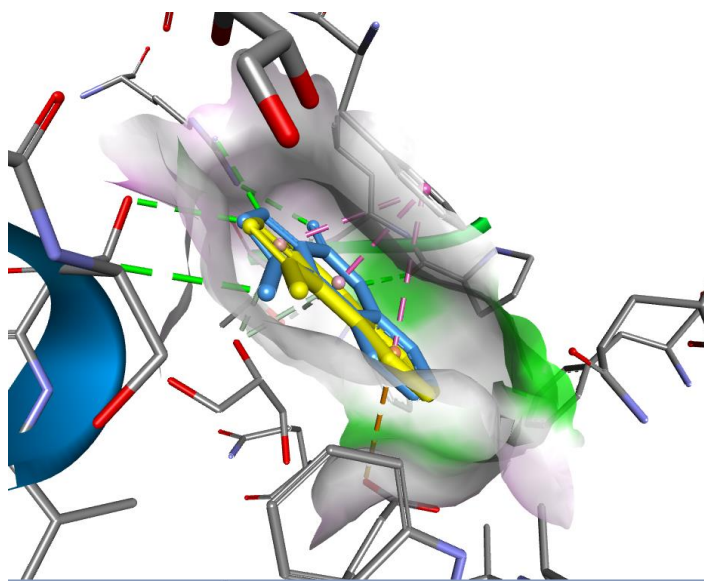


Рис. 2.7 3D зображення конформації експериментальної та референс конформації ТК-40 після ре-докінгу до NMDA-рецептора

Для молекулярного докінгу до AMPA-рецепторів використано GluR2 субодиницю гомотетрамерної структури макромолекули, кристалізованої з інноваційним ПСП перампанелем – PDB ID 5L1F [98]. Гідрофобна кишеня перампанеля розміщується між внутрішньомембранним фрагментом спіралі M1 та позаклітинних ділянок спіралей M3 та M4. Відповідно, тетрамерний рецептор має 4 еквівалентні сайти зв'язування неконкурентних інгібіторів, симетрично розташованих на межі між іонним каналом, трансмембранним та ліганд-зв'язуючими доменами. Валідацію методології докінгу проведено щодо відтворюваності експериментально визначеної конформації інгібітора та продемонстровано на рис. 2.8. При докінгу референс-ліганду відображаються усі основні зазначені в літературі гідрофобні [98], водневі та електростатичні

взаємодії. Відмінністю від експериментальних даних є відсутність зв'язку з серином (Ser788) та фенілаланіном (Phe517), хоча залишки візуалізуються в найближчому оточенні ліганду. Свідченням високої афінності перампанелю до активного сайту АМРА-рецептору є низьке значення енергії зв'язування (-10.6 ккал/моль).

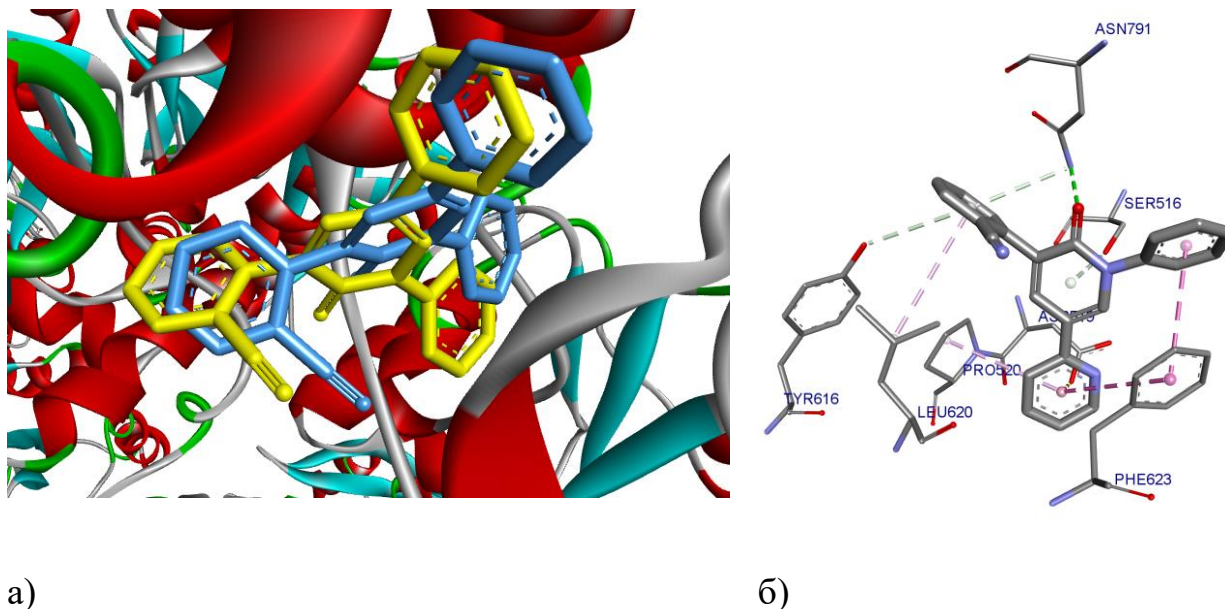


Рис. 2.8 3D зображення конфорації (а) експериментальної та референс конфорації перампанелю після ре-докінгу до АМРА-рецептора та (б) референс-взаємодії з амінокислотними залишками

Ще однією макромолекулою для оцінки перспективності сконструйованих сполук як протисудомних агентів було обрано II ізоформу карбонової ангідрози людини (СА II), яка є новим та багатонадійним таргетом для пошуку ефективних ПСП. Визначальним серед мультифакторного механізму протисудомної дії препаратів нової генерації – лакосаміду, топірамату та зонісаміду – є інгібування саме СА II [99, 100]. Доведено, що препарати мають різні місця зв'язування в ензимі, зокрема топірамат та зонісамід фіксуються за участю іону цинку, який є кофактором ферменту, як і більшість сульфонамідних інгібіторів СА [101]. Лакосамід же виявляє свою інгібувальну здатність до СА II через фіксацію у кумариновій кишені зв'язування без утворення комплексу з іоном цинку, бо не

досягає місця його розміщення натомість створюючи сприятливі ван-дер-ваальсові взаємодії з Phe131, Asn67, Thr200 та Gln92 на вході до кишені звязування сульфонамідів. Саме цей активний сайт лакосаміду було використано для оцінки афінності нових похідних до СА II – PDBID 3IEO [99]. Валідацію методології докінгу та відповідність розміщення нативного та референс лакосаміду наведено на рис. 2.9.

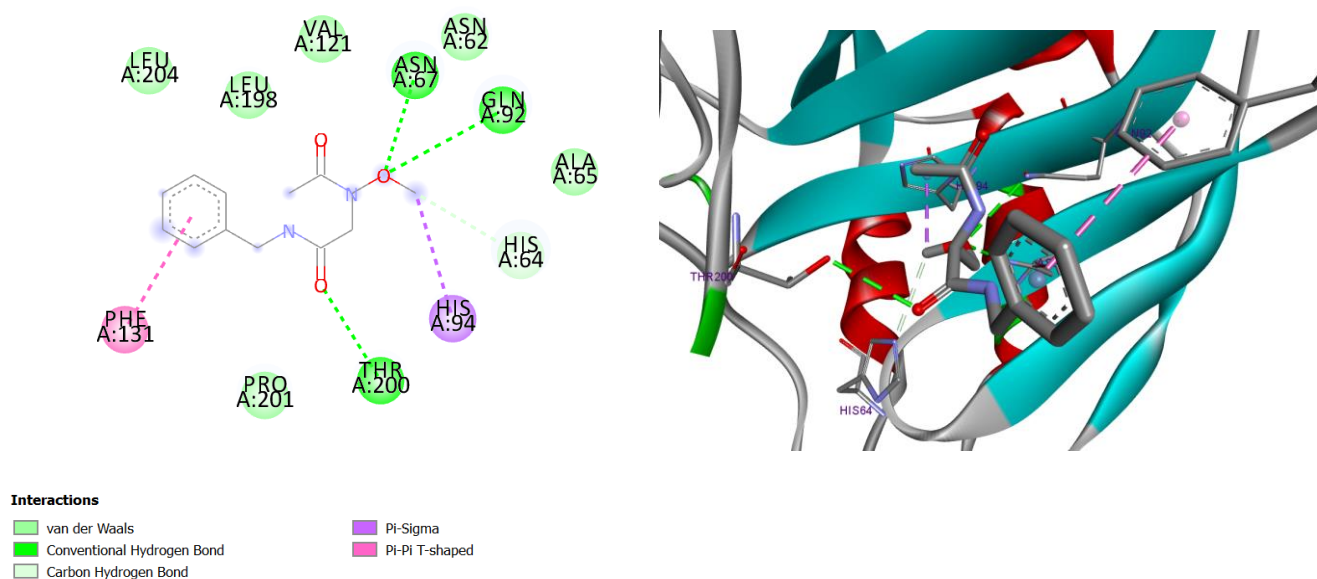


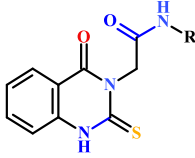
Рис. 2.9 2D та 3D візуалізація розміщення нативного та референс ліганду лакосаміду в сайті СА II

Для лакосаміду скорингова функція склала  $-5,8$  ккал/моль, а всі взаємодії з амінокислотами відповідають рентгеноструктурно визначеним (за винятком молекул води, які видаляються при підготовці молекули протеїну до стикування).

Ступінь афінності до відповідних протисудомних біомішеней сконструйованих та відібраних для подальшого синтезу сполук-лігандів похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо/оксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів представлені в таблиці 2.1 та 2.2.

Таблиця 2.1

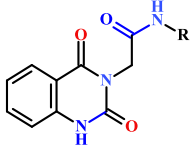
## Афінність похідних 2-тіо-4-оксо-хіназолінів до протисудомних біомішеней

Ліганд	Біомішень (рецептор/фермент)			
	ГАМК <sub>A</sub> (6HUP)	NMDA (4KFQ)	AMPA 5L1F	САП (3IEO)
	Енергія зв'язування (ккал/моль)			
Нативний референс-ліганд	-9,9 (діазепам)	-7,8 (ТК-40)	-10,6 (перампанель)	-5,8 (лакосамід)
				
CH <sub>3</sub>	-6,4	-6,8	-7,0	-7,2
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-6,4	-6,0	-7,4	-7,4
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-6,2	-6,6	-7,6	-7,3
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-6,3	-6,7	-7,2	-7,4
CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-6,8	-6,9	-7,3	-7,2
CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	-6,5	-6,4	-7,4	-7,4
цC <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	-6,3	-6,8	-8,4	-7,6
Bn	-7,2	-8,9	-9,6	-7,6
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4	-7,7	-8,1	-9,0	-7,4
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (Cl)-2,4	-7,8	-8,2	-9,1	-7,0
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-2	-7,2	-8,8	-9,3	-7,2
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-4	-7,3	-7,2	-9,0	-7,4
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-7,4	-7,8	-8,2	-7,9
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4	-7,0	-7,2	-8,2	-7,5
(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-7,6	-7,8	-8,0	-7,6
Ph	-7,0	-7,2	-8,0	-7,2
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-2	-7,0	-7,8	-8,0	-7,9
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-4	-7,0	-7,2	-8,2	-7,5

Серед 2-тіоксопохідних хіназоліну спрогнозовано високі значення скорингової функції до ГАМК<sub>A</sub> рецептору (>-7,7 ккал/моль), що виявилось дещо неочікуваним через літературні дані щодо їх можливого ГАМКергічного впливу (табл. 2.1).

Таблиця 2.2

## Афінність похідних 2,4-діоксо-хіназоліну до протисудомних біомішеней

Ліганд	Біомішень (рецептор/фермент)			
	ГАМК <sub>A</sub> (6HUP)	NMDA (4KFQ)	AMPA 5L1F	САП (3IEO)
	Енергія зв'язування (ккал/моль)			
Нативний референс-ліганд	-9,9 (діазепам)	-7,8 (ТК-40)	-10,6 (перампанель)	-5,8 (лакосамід)
				
CH <sub>3</sub>	-8,4	-6,8	-8,0	-5,2
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-8,4	-7,0	-8,4	-5,4
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-8,2	-7,6	-8,6	-5,3
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-8,3	-7,7	-8,2	-5,4
CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-8,8	-7,9	-8,6	-5,2
CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	-8,5	-7,4	-8,2	-5,4
цC <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	-8,3	-7,8	-8,4	-5,6
Bn	-9,2	-9,9	-8,6	-5,6
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4	-10,1	-10,1	-10,3	-8,4
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (Cl)-2,4	-10,6	-10,2	-10,1	-8,0
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-2	-9,9	-9,8	-9,3	-8,2
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-4	-9,8	-9,2	-9,0	-7,4
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-9,9	-8,8	-9,2	-8,9
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4	-9,2	-8,2	-9,2	-8,5
(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-9,2	-8,8	-9,0	-8,6
Ph	-9,0	-8,2	-9,0	-8,2
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-2	-9,0	-8,8	-10,0	-8,9
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-4	-9,0	-8,2	-10,2	-8,5

Натомість заміна тіоксогрупи у положенні 2 на карбонільну привела до значного зниження енергії зв'язування та, відповідно, для 2-оксо похідних спрогнозовано ліпшу афінність до ГАМК<sub>A</sub> рецептора що співставлялася або перевищувала афінність референс-діазепаму (-10,6 до -8,2 ккал/моль).

В обох групах похідних прослідковується чітка закономірність збільшення афінності в ряду  $Alk < Ar < Bn$ , а серед бензилзаміщених похідних найвищу афінність мають хлорзаміщені похідні.

Також відстежено закономірність зниження афінності при подовженні арилалкільного радикалу  $\underline{CH_2}C_6H_5R > \underline{CH_2}C_6H_5 > (\underline{CH_2})_2C_6H_5 > (\underline{CH_2})_2C_6H_4R > (\underline{CH_2})_3C_6H_5 > (\underline{CH_2})_3C_6H_5R$ . Для синтезу були обрані фенільні радикали заміщені метокси-групами та атомами хлору у положеннях 4 та 2,4.

До сайту інгібітора NMDA-рецептора афінність була також вищою у оксопохідних та зіставлялася або перевищувала показники референс-інгібітора ТК-40 ( $< -7,8$  ккал/моль). Найліпші показники мали хлор- та дихлорбензильні похідні в обох згенерованих групах ( $< -10,0$  ккал/моль у оксо- та  $< -8,0$  ккал/моль у тіо-похідних хіназоліну).

Загалом дещо поступалися значенню енергії зв'язування перампанелю представники обидвох груп: жодна зі сполук-лігандів не перевищила  $-10,6$  ккал/моль перампанелю. Хоча і до AMPA-рецепторів дещо ліпші інгібувальні властивості прогноуються для оксопохідних.

Натомість саме для 2-тіоксопохідних розраховано високі показники афінності до сайту інгібітора САП: скорингові функції відібраних для синтезу речовин склали  $< -8,0$  ккал/моль щодо  $-5,8$  ккал/моль у лакосаміду. Слід відзначити, що ступінь афінності до кумаринового сайту різко зростає при заміні алкільних радикалів в ацетамідному залишку на арильні та бензильні фрагменти.

Гнучкий молекулярний докінг згенерованих структур-лігандів у обрані сайти зв'язування протисудомних біомішеней проводили використовуючи пакет програм AutoDock Vina [102]. Підготовку білків і рецепторів проводили згідно з алгоритмом дослідження стикування [103], а параметри були детально описані в експериментальній частині. Виділення у структурі білка фармакологічно значущих активних центрів було визначено на експериментальних даних з літератури. Валідацію методології стикування здійснили шляхом порівняння результатів докінгу нативного ліганду з відповідним активним центром з

подальшим детальним конформаційним аналізом. Центр ліганду визначали за програмою VMD1.9.3, а конструкція електростатичної решітки вузла прив'язки побудована за допомогою програми AutoDockTools. Конформаційний пошук для розміщення в активному центрі проводили за допомогою генетичного алгоритму.

### *Експериментальна частина*

Молекулярний докінг проводили з використанням програм AutoDock Vina та AutoDockTools 1.5.6 [103].

Ліганди. Побудову сполук-лігандів здійснено з використанням програми BIOVIADraw 2021 (формат файлу – mol). Оптимізацію будови проводили програмою Chem3D за MM2 – молекулярно-механічним алгоритмом (формат файлу pdb), програмою AutoDockTools-1.5.6 (формат файлу pdbqt) [103]. Розрахунок RMSD – онлайн ресурс ProFit Results.

Макромолекули. Як макромолекули використано білки з Protein Data Bank [104]: ГАМКА ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ) – PDB ID 6HUP; NMDA – PDB ID 4KFQ; AMPAR – PDB ID 5L1F. Видалення води, експериментальних лігандів, іонів металу та допоміжних молекул проведено програмою Discovery Studio Visualizer 2021 Client (формат файлу pdb). Додавання до будови макромолекули полярних атомів гідрогену здійснено програмою AutoDockTools-1.5.6 (формат файлу pdbqt)

Параметри, координати та центр Grid box розраховано AutoDockTools-1.5.6 за експериментальним лігандом:

ГАМК<sub>A</sub> (6HUP):  $x = 117,44$ ,  $y = 157,46$ ,  $z = 110,46$ ; розмір  $x = 26$ ,  $y = 28$ ,  $z = 20$ ;

AMPAR(5L1F):  $x = -34,85$ ,  $y = -6,07$ ,  $z = -39,15$ , розмір  $x = 32$ ,  $y = 30$ ,  $z = 26$ ;

NMDA 4KFQ):  $x = 26,91$ ,  $y = 34,35$ ,  $z = 46,85$ ; розмір  $x = 22$ ,  $y = 24$ ,  $z = 20$ .

### Висновки до розділу 2

1. Розроблено загальний дизайн дослідження щодо пошуку протисудомних засобів серед похідних хіназолін-4(3H)-ону



2. Визначено головний скафолд дослідження та ґрунтуючись на постулатах сучасної фармакофорної моделі протисудомної активності згенеровано 298 структур-лігандів.
3. Спрогнозовано афінність структур-лігандів до протисудомних біомішеней: сайт бенздіазепінів ГАМК<sub>A</sub> рецептора, сайти інгібіторів NMDA та AMPA – рецепторів, а також – інгібітора карбонової ангідрази II. Здійснено ранжування структур-кандидатів для синтезу за показником афінності до ГАМКергічних, глутаматергічних біомішеней, а також карбонової ангідрази II та обрано 50 сполук для синтезу.

*Результати досліджень цього розділу наведено в наступних публікаціях:*

1. El Kayal W. M., Shtrygol S. Y., Zalevskyi S. V., Shark A. A., Tsyvunin V. V., Kovalenko S. M., Bunyatyan N. D., Perekhoda L. O., Severina H. I., Georgiyants V. A. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134-142. (Особистий внесок – дизайн дослідження, проведення експериментальних докінгових та синтетичних досліджень, оброблення та аналіз результатів).
16. El Kayal W., Severina H., Tsyvunin V., Zalevskyi S., Shtrygol' S., Vlasov S., Golovchenko O., Kovalenko S., Georgiyants V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69. (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, синтетичні дослідження та інтерпретація спектральних даних, проведення докінгових досліджень, підготовка статті до друку)
2. Северина А. И., Ель Кайял В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пиримидин- и хиначолин-4(3H)-онов. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* :

- матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
3. El Kayal W. M., Severina H. I., Georgiyants V. A. Molecular docking studies of the N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide of the active site of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub>. *Science and practice 2019 : the 10th International pharmaceutical conference*, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 109.
  4. Северина А. И., Ель Каял В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Дизайн потенциальных антиконвульсантов среди производных хиназолин-4(3H)-онов. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали наук.-практ. дистанційної міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. с. 139.*
  5. Северіна Г., Ель Кайал В., Абу Шарк А., Головченко О., Георгиянц В.. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1H-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021 : мат. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 82*
  6. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3H)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування: мат. Міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7-10.*

## РОЗДІЛ 3

### СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 2-ТІОКСО-ХІАЗОЛІН-4(3H)-ОНУ

Відповідно до результатів докінгових досліджень для синтезу речовин з протисудомною активністю та ймовірним ГАМКергічним та/або глутаматергічним механізмом її реалізації основним скафолдом обрано хіназолін-4(3H)-он. Підходи до формування хіназолінового циклу характеризуються значною різноманітністю, тому вибір синтетичної стратегії в першу чергу залежить від бажаних фрагментів у цільовій структурі та потребує обґрунтування з точки зору раціональності синтезу.

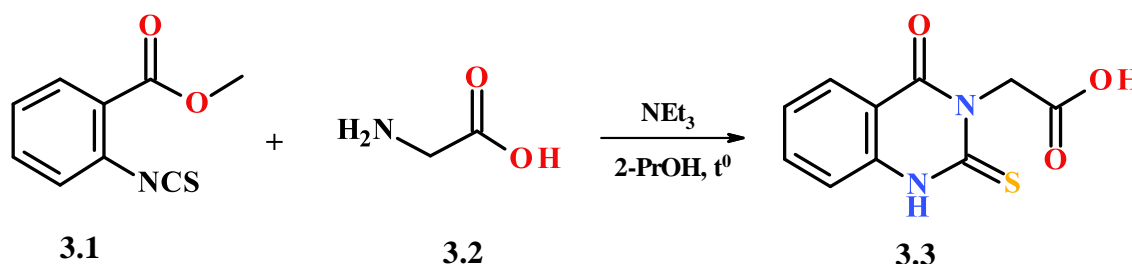
#### 3.1 Синтез (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти

Для досягнення поставленої мети щодо синтезу згенерованих похідних 4-оксо-2-тіоксохіназоліну необхідно було визначитися зі стратегією синтезу для напрацювання головного білдинг-блоку для можливих подальших варіацій структури. Підходи, що ведуть до похідних хіназоліну, які містять 2-тіоксо-4-оксопіримідиновий фрагмент, ґрунтуються на циклізації N,N'-заміщених похідних тіосечовини, які утворюються *in situ* взаємодією алкілантранілатів з ізотіоціанатами або 2-(метилкарбоксі)бензенізотіоціанатів з первинними амінами [105]. За літературними даними саме другий підхід є більш універсальним, дозволяє одержати продукти з ліпшими виходами та не вимагає довготривалого кип'ятіння та використання токсичних та з високими залишковими кількостями розчинників як у першому випадку (зазвичай, піридин або ДМФА). До того ж можливість використання широкого спектру первинних амінів – аліфатичних, первинних ароматичних амінів, амінокислот, гідразинів, гідразидів, сульфогідразидів, тіосемікарбазидів – дозволяє вже на цьому етапі досягти різноманіття замісників у положенні 3 хіназолінового циклу.

Оскільки першорядним завданням було введення залишку гліцину, як додаткового фармакофору, у положення 3 хіназолінового циклу ми використали

саме цей підхід для синтезу основного інтермедіату – (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) [105]. Реакцію циклізації метилового естеру 2-ізоціанобензойної кислоти (**3.1**) з гліцином (**3.2**) здійснювали за кип'ятіння в середовищі пропанолу-2 впродовж 30 хвилин у присутності триетиламіну (схема 3.1). Цільову кислоту **3.3** одержано з високим виходом 98%.

Схема 3.1



Одержаний блідо-жовтий кристалічний порошок 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) вже описаний в літературі [106]. Про одержання індивідуального напівпродукту **3.3** достатнього рівня чистоти свідчать результати хроматомас-спектрометрії (рис. 3.1).

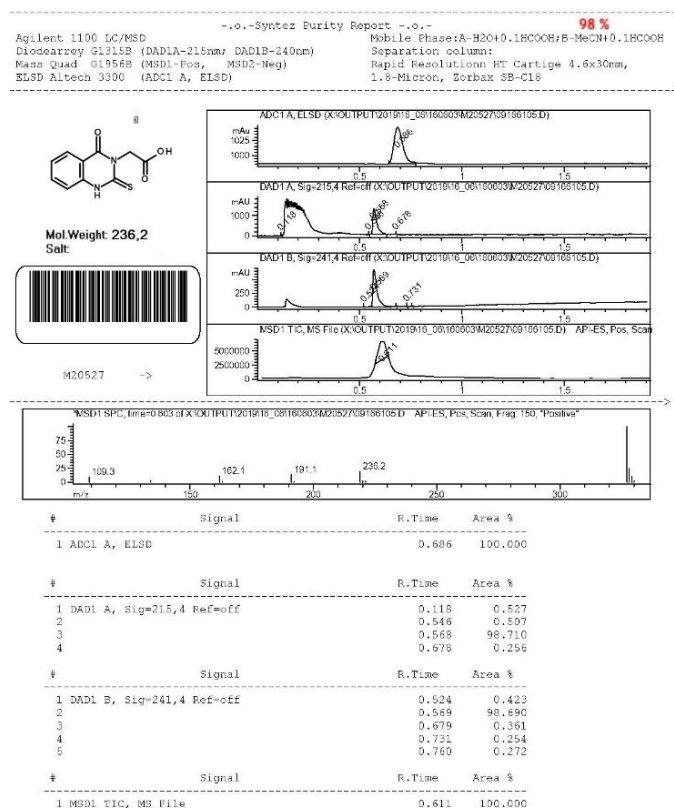


Рис. 3.1 LC/MS-спектр 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**)

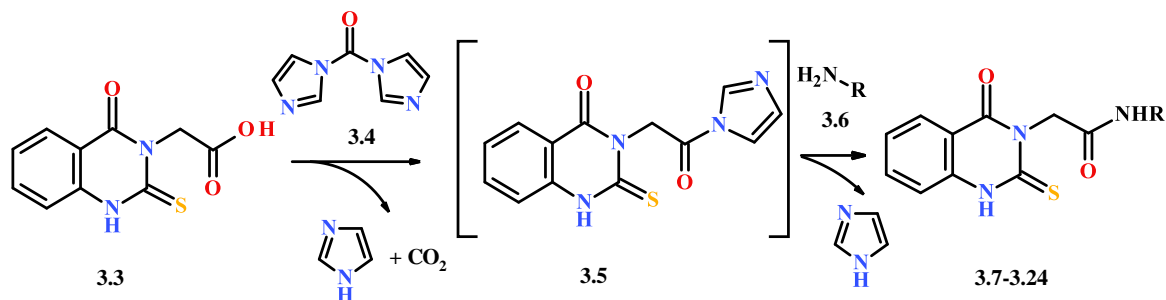
### 3.2 Синтез N-заміщених 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів

Наступним етапом досліджень було одержання відповідних амідних похідних на основі (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**). При виборі методики подальшого амідування синтезованої кислоти **3.3** ми уважно вивчили літературні дані. Карбонілдіімідазол широко застосовується як реагент для активації карбоксильної групи в синтезі амідів і складних естерів [107-109]. Для цих цілей можуть застосовуватися різні реагенти: дициклогексилкарбодіїмід [110],  $\text{ArB}(\text{OH})_2$  [111], хлорсульфонілізоціанат [112] та ди-трет-бутилдикарбонат для синтезу амідів захищених амінокислот і пептидів [113] та ін. Наш вибір на користь застосування саме N,N'-карбонілдіімідазолу зумовлений не лише його відносною доступністю, відсутністю побічних хімічних процесів, задовільними виходами кінцевих продуктів (табл. 3.1), а й утворенням безпечних побічних продуктів - діоксиду карбону та імідазолу, що робить цей метод одержання амідів найприйнятнішим та найдоцільнішим у синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів [114] і узгоджується з принципами "зеленої хімії".

Синтез цільових карбоксамідів **3.7** було здійснено однореакторним "one-pot" методом реакцією (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) з N,N'-карбонілдіімідазолом (**3.4**) під час кип'ятіння у діоксані та подальшою взаємодією проміжного ацилімідазолу – 3-(2-імідазол-1-іл-2-оксо-етил)-2-тіоксо-1*H*-хіназолін-4-он (**3.5**) з відповідними алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами **3.6** (схема 3.2) [87, 115-117].

Синтезовані речовини **3.7-3.24** – білі або злегка жовтуваті кристалічні речовини, легко розчинні в пропанолі-2, діоксані, диметилформаміді, не розчинні у воді, з чіткими температурами плавлення.

Структуру та молекулярні маси одержаних похідних **3.7-3.24** підтверджено методами  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії відповідно, склад – елементним аналізом, індивідуальність – методами ТШХ та хромато-мас-спектрометрії (LC/MS) (табл. 3.1).



R = 3.7 CH<sub>3</sub>; 3.8 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 3.9 C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; 3.10 C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; 3.11 CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 3.12 CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>; 3.13 цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>;  
 3.14 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 3.15 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(Cl)-4; 3.16 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(Cl)<sub>2</sub>-2,4; 3.17 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-2; 3.18 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-4;  
 3.19 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 3.20 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(Cl)-4; 3.21 (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 3.22 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 3.23 C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-2; 3.24 C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-4.

За результатами LCMS аналізу у результаті реакції амідування виділені індивідуальні речовини, а маса квазімолярного іону відповідає зазначеній структурі (рис. 3.2).

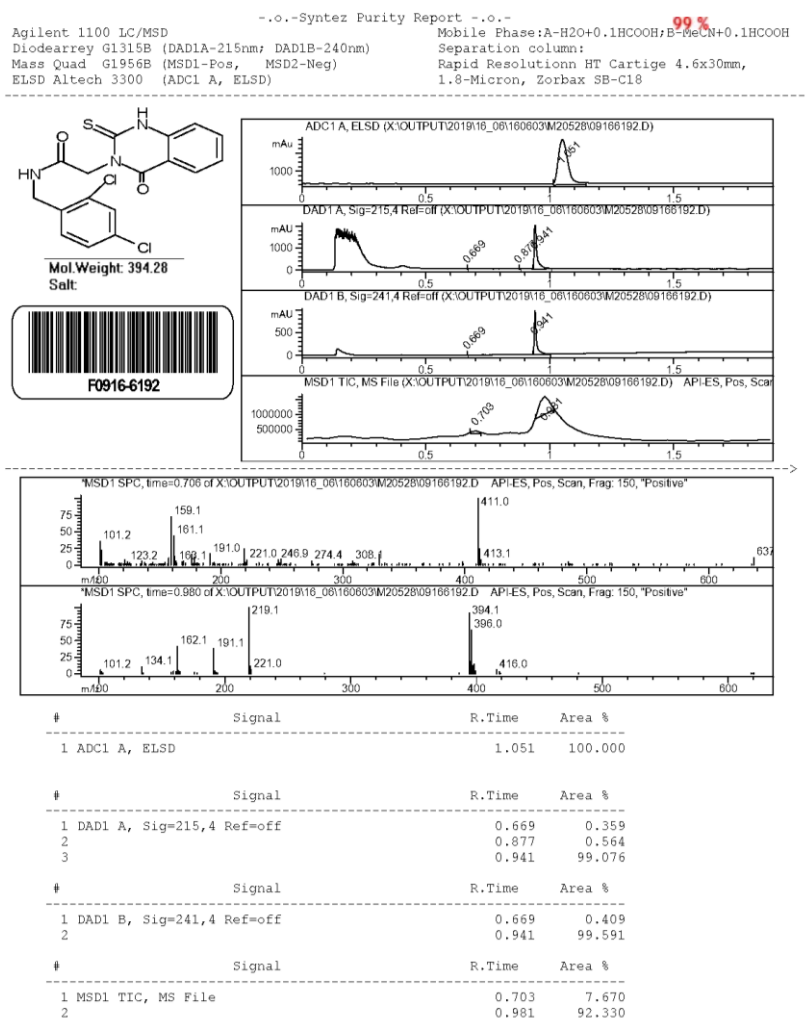


Рис. 3.2 LC/MS-спектр N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідроїназолін-3(2H)-іл)ацетаміду (3.16)

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР спостерігаються всі необхідні сигнали протонів, які за значенням інтегральних смуг і мультиплетності відповідають структурі синтезованих похідних **3.7-3.24**. Протон гетероциклічної NH-групи проявляється в слабкому полі на ділянці 13.05-12.80 м.ч., як правило, у вигляді розширеного синглета. Ароматичні протони хіназолінового циклу проявляються у вигляді двох дублетів (H-5, H-8) і двох триплетів (H-6, H-7), характерних для ABCD-систем (рис. 3.3).

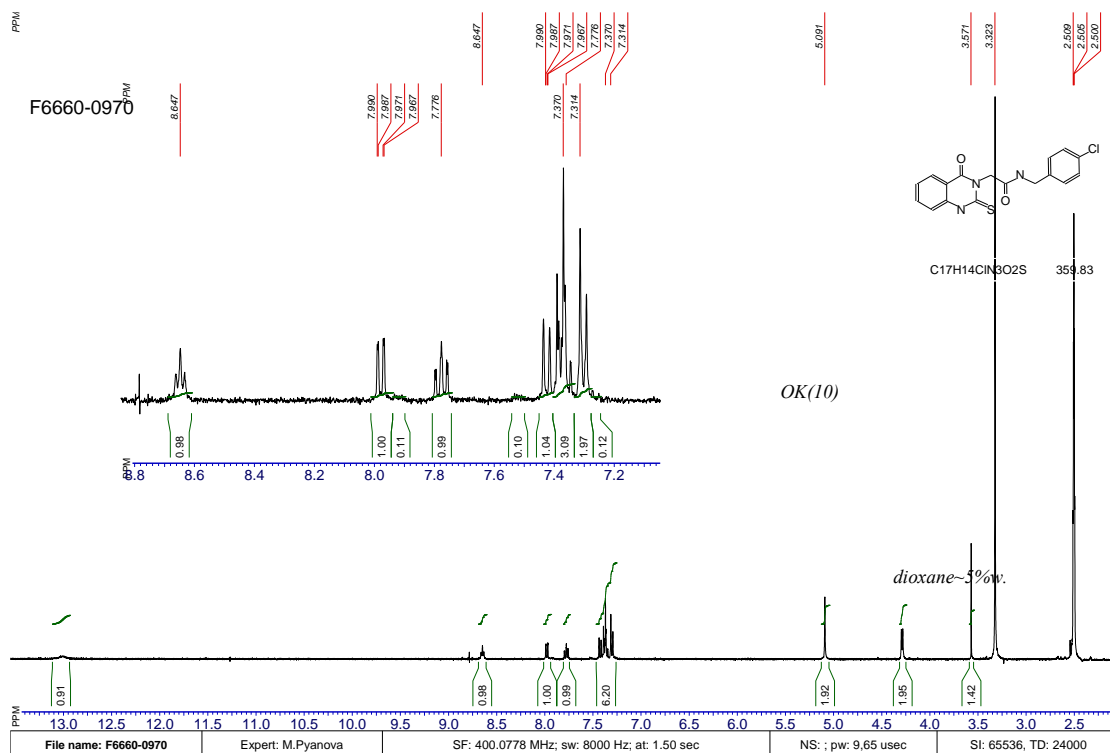


Рис. 3.3  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр N-[(4-хлорофеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетаміду (**3.15**)

Сигнал амідного протона резонує на ділянці 10,05-7,95 м.ч. у вигляді синглету у похідних **3.22-3.24**, квадруплету у похідної **3.7** та триплету у всіх інших речовин. Слід зазначити, що для похідних **3.10** та **3.13** сигнал амідного протона NH накладається на мультиплет ароматичних протонів в області 8,02-7,9 м.ч. Метиленовий протон  $\text{NCH}_2$  традиційно резонує як синглет в області 5,36-4,95 м.ч. Протони метильної та інших алкільних груп проявляються у характерній області сильного поля та за мультиплетністю відповідають сусідньому протонному оточенню, наприклад у сполуки **3.7**  $\text{CH}_3$  група резонує у вигляді дублета, а у **3.8** – триплету.

**Фізико-хімічні характеристики N-заміщених 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів (3.7-3.24)**

№	Вихід, %	Тпл., °C	Молекулярна- формула	Вираховано, %				LC/MS m/z (%)
				Знайдено, %				
				C	H	N	S	
3.7	68	272-4	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>53,00</u> 52,91	<u>4,45</u> 4,43	<u>16,86</u> 16,90	<u>12,84</u> 12,80	248,2 [M-H] <sup>-</sup> (96)*
3.8	80	292-4	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>54,74</u> 54,56	<u>4,98</u> 4,96	<u>15,96</u> 16,00	<u>12,18</u> 12,15	264,0 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.9	74	260-2	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>56,30</u> 56,07	<u>5,45</u> 5,42	<u>15,15</u> 15,12	<u>11,56</u> 11,51	278,0 [MH] <sup>+</sup> (95)
3.10	79	302-4	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>57,71</u> 57,47	<u>5,88</u> 5,85	<u>14,42</u> 14,36	<u>11,00</u> 10,96	292,0 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.11	75	308-10	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>57,71</u> 57,49	<u>5,88</u> 5,86	<u>14,42</u> 14,43	<u>11,00</u> 10,97	292,0 [MH] <sup>+</sup> (96)
3.12	78	298-300	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>56,71</u> 56,49	<u>4,76</u> 4,74	<u>15,26</u> 15,19	<u>11,64</u> 11,60	274,2 [M-H] <sup>-</sup> (97)*
3.13	81	318-20	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>60,55</u> 60,33	<u>6,03</u> 6,01	<u>13,24</u> 13,27	<u>10,10</u> 10,06	318,2 [MH] <sup>+</sup> (95)
3.14	84	285-7	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>62,75</u> 62,50	<u>4,65</u> 4,63	<u>12,91</u> 12,95	<u>9,85</u> 9,81	326,0 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.15	63	310-2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>56,44</u> 56,39	<u>3,92</u> 3,90	<u>11,68</u> 11,70	<u>8,91</u> 8,88	360,0 [MH] <sup>+</sup> (95)
3.16	68	310-2	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>51,79</u> 51,63	<u>3,32</u> 3,18	<u>10,66</u> 10,64	<u>8,13</u> 8,09	394,0; 396,0 [MH] <sup>+</sup> (98)
3.17	72	308-10	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	<u>60,83</u> 60,62	<u>4,82</u> 4,79	<u>11,82</u> 11,84	<u>9,02</u> 8,99	356,2 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.18	88	312-4	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	<u>60,83</u> 60,59	<u>4,82</u> 4,80	<u>11,82</u> 11,85	<u>9,02</u> 8,99	356,2 [MH] <sup>+</sup> (96)
3.19	86	308-10	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>63,70</u> 63,45	<u>5,05</u> 5,02	<u>12,38</u> 12,40	<u>9,45</u> 9,43	340,2 [MH] <sup>+</sup> (95)
3.20	82	309-11	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>57,83</u> 57,72	<u>4,31</u> 4,29	<u>11,24</u> 11,20	<u>8,54</u> 8,54	373,1 [MH] <sup>+</sup> (96)
3.21	82	310-2	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>64,57</u> 64,37	<u>5,42</u> 5,41	<u>11,89</u> 11,87	<u>9,07</u> 9,05	354,0 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.22	78	292-4	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<u>61,72</u> 61,63	<u>4,21</u> 4,19	<u>13,50</u> 13,45	<u>10,30</u> 10,26	312,1 [MH] <sup>+</sup> (99)
3.23	82	292-4	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	<u>59,81</u> 59,68	<u>4,43</u> 4,41	<u>12,31</u> 12,28	<u>9,39</u> 9,35	342,0 [MH] <sup>+</sup> (97)
3.24	65	308-10	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	<u>59,81</u> 59,72	<u>4,43</u> 4,42	<u>12,31</u> 12,34	<u>9,39</u> 9,36	342,0 [MH] <sup>+</sup> (99)

\* режим ресстрації негативних іонів



У  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах характеристичним є сигнал атома карбону групи  $\text{C}=\text{S}$ , який дає резонансний сигнал у слабкому полі (175,5-176,8 м.ч.). Крім того, у спектрах спостерігаються два сигнали атомів карбону гетероциклічної та амідної карбонільних груп  $\text{C}=\text{O}$  (159,3-170,0 м.ч.), ароматичних фрагментів (115,3-149,3 м.ч.) та аліфатичних груп (11,2-55,8 м.ч.), положення та кількість яких повністю відповідає структурі сполук **3.7-3.24** (рис. 3.4).

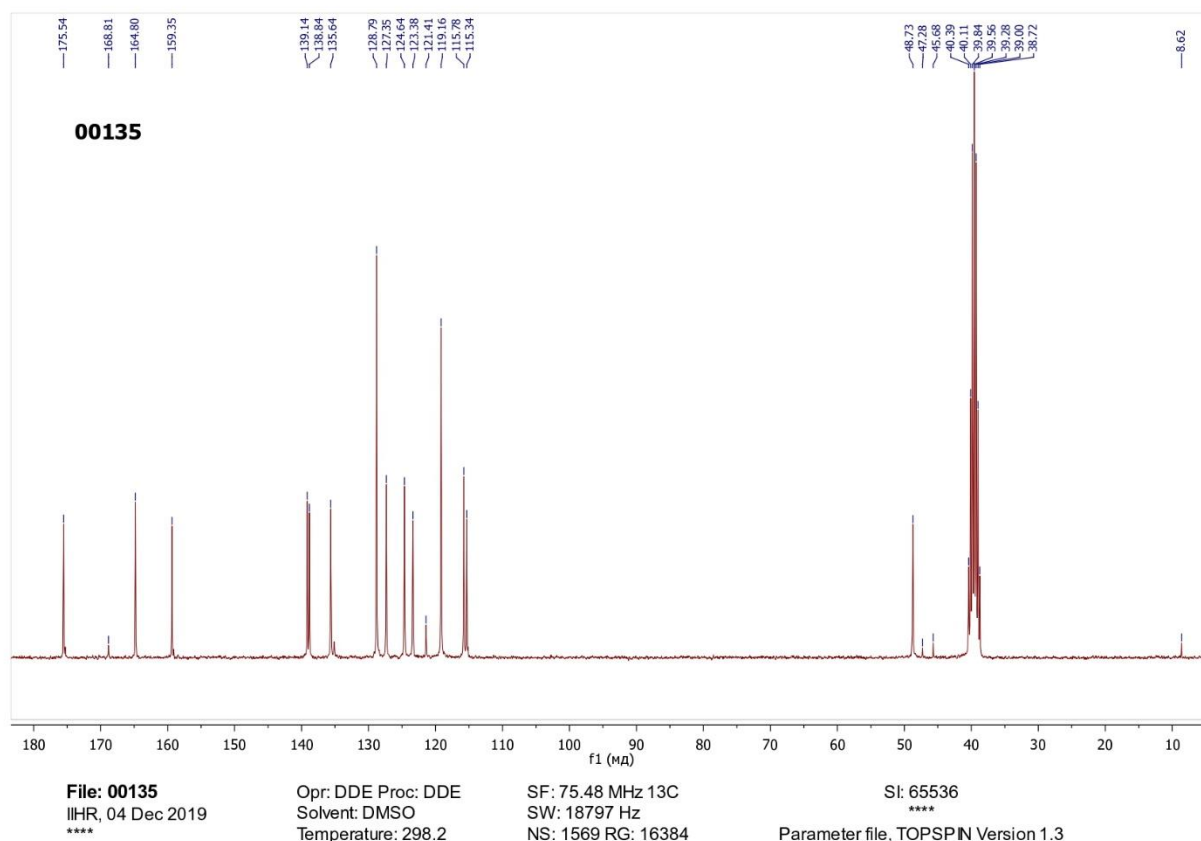


Рис. 3.4  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр N-феніл-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (**3.22**)

### 3.3 Обговорення результатів протисудомної активності похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів на PTZ-моделі судом

Наступним етапом експериментальних досліджень стали фармакологічні дослідження синтезованих похідних на протисудомну активність. З огляду на те, що на етапі віртуального скринінгу за показником афінності до BZD сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора синтезовані похідні 2-тіоксохіназолін-4-ону **3.7-3.24**

поступалися референс-ліганду діазепаму, ймовірність ГАМКергічного механізму протисудомної дії є досить сумнівною. Скринінговими моделями, які ототожнюються саме з ГАМКергічним епілептогенезом є хемотоксичні судоми, викликані введенням пентилентетразолу (PTZ) та пікротоксину. Провідною є PTZ-модель – "золотий стандарт" скринінгових тестів та неодмінний крок, регламентований Міжнародною протиепілептичною лігою (ILAE) для первинного скринінгу нових ПСЗ [80, 118]. Тому фармакологічний скринінг протисудомної активності було здійснено на моделі PTZ-судом у мишей, однак в дослідження *in vivo* взяли лише 10 із 17 синтезованих 2-тіохіназолін-4-онів, які мали найліпші показники афінності до BZD сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

Похідні 2-тіохіназолін-4-ону **3.7-3.24** досліджували на кафедрі фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету під керівництвом доктора медичних наук, професора С. Ю. Штриголя. Експеримент проводили у порівнянні з референс-препаратом натрій вальпроатом у дозі 300 мг/кг та контрольною групою без будь-якої фармакокорекції. Метаквалон не використовували, бо наразі він не застосовується у клінічній практиці в країнах ЕС та не затверджений FDA. Натрій вальпроат був обраний через його широкий діапазон застосування при різних формах епілепсії та механізм дії, пов'язаний з нівелюванням ГАМКергічних негативних ефектів конвульсантів [119].

Одержані результати фармакологічного скринінгу на цій моделі судом виявилися для нас дуже несподіваними (рис. 3.5) [116]. Жодна з досліджуваних речовин не виявила статистично значущої протисудомної дії за критерієм інтегрального захисного ефекту – зменшення летальності порівняно з контролем (рис. 3.5).

Дві сполуки **3.13** з *N*-циклогексильним та **3.19** *N*-фенетильним замісниками продемонстрували слабку протисудомну дію, зменшуючи летальність на 21 та 4,2 % щодо контролю (87,5 %), і покращували лише по одному показнику тяжкості судомного синдрому. Зокрема, сполука **3.13** із циклогексильним замісником достовірно збільшувала час життя тварин до

загибелі, а сполука **3.19** зменшувала кількість клоніко-тонічних судом на 1 тварину (рис. 3.6).

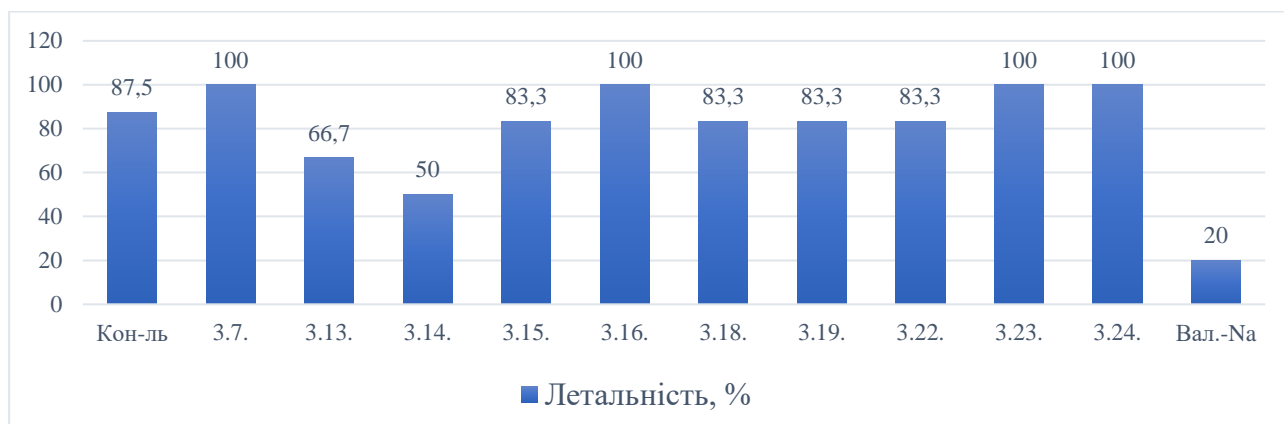


Рис. 3.5 Показники летальності на тлі введення похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів (**3.7-3.24**)



Рис. 3.6 Тривалість латентного періоду та час до загибелі на тлі введення похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів (**3.7-3.24**)

Сполуки **3.7, 3.14, 3.18, 3.22** виявилися індіферентними до PTZ судом, не спричинивши достовірного впливу на жоден з показників їхнього перебігу за летальності, що досягала від 50 до 100%, і достовірно поступалися за цим показником препарату порівняння – натрій вальпроату.

Варто зазначити про зовсім неочікувані дані, виявлені у похідних **3.16** з 2,4-дихлоробензильним, **3.23** та **3.24** з 2-/4-метоксифенільними замісниками, які продемонстрували помірні проконвульсивні властивості: летальність мишей на тлі їх введення становила 100%, тяжкість судом максимальна – 6,00 балів. 2,4-Дихлоробензильна похідна **3.16** скорочувала час життя тварин до загибелі у 2 рази порівняно з контролем. Попри те, що сполука **3.16** достовірно зменшувала латентний період судом у 1,5 рази та знижувала кількість клоніко-тонічних нападів у 1,7 рази, але на тлі скорочення часу життя до загибелі ці результати є несприятливими, бо свідчать, що вже перші напади були смертельними для піддослідних тварин. Про це ж свідчить і достовірне зменшення тривалості судомного періоду у 2,5 рази. Є багато повідомлень про те, що атоми хлору в арильному радикалі підвищують протисудомний ефект сполук [84, 85]. Крім того, у структурі протиепілептичного препарату ламотриджину міститься 2,3-дихлороарильний замісник. Водночас одержані в даному експерименті результати щодо їх впливу на збільшення летальності тварин абсолютно корелюють із раніше отриманими нами результатами на прикладі ацетамідних похідних піримідин-4-ону [120]: зі збільшенням кількості атомів хлору в арильному фрагменті молекули, збільшується летальність та час перед загибеллю піддослідних тварин.

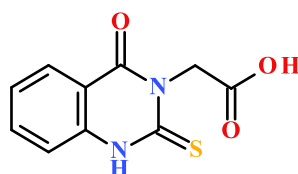
Оскільки PTZ є класичним проконвульсантом, дія якого заснована на антагонізмі до ГАМК-сайту бензодіазепінового рецепторного комплексу та пригніченні ГАМКергічних гальмівних процесів у ЦНС, можна зробити висновок про слабкі ГАМК-позитивні властивості сполук 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів (**3.7-3.24**), що корелює з результатами докінгу.

#### *Експериментальна частина*

У роботі використовували реактиви виробництва фірми Sigma-Aldrich, USA. Контроль за реакціями проводили за допомогою методу ТШХ (елюент – етилацетат – гексан 1:2) на пластинках "SorbfilUV-254". Проявлення

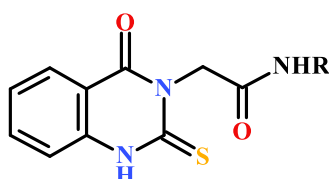
хроматограм проводили в УФ-світлі приладу "Опромінювач хроматографічний УФС 254/365" (режим 254 нм). Температури плавлення (°C) визначали в капілярі на електротермічному цифровому приладі IA9100X1 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Uk). Елементний аналіз проводили на мікроаналізаторі Euro Vector EA-3000 (Eurovector SPA, Redavalle, Італія). Результати елементного аналізу перебували в межах  $\pm 0,4\%$  від теоретичних значень.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектри реєстрували на спектрометрах Varian Mercury-400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) (500 МГц і 100 МГц, відповідно). Розчинник диметилсульфоксид (ДМСО- $d_6$ ), внутрішній стандарт – ТМС. Спектри LC/MS реєстрували за допомогою рідинного хроматографа AP ESCIEXAPI 150E X.

*Синтез 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти (3.3).*



7,5 г (0,1 моль) гліцину (3.2) розчиняють у суміші 150 мл води та 14 мл (0,1 моль) триетиламіну. Одержаний розчин при перемішуванні додають до теплого розчину 19,2 г (0,1 моль) метилового естеру 2-ізотіоціанатбензойної кислоти (3.1) у 200 мл пропанолу-2. Розчин кип'ятять впродовж 30 хвилин і підкислюють хлоридною кислотою (10-12,5 мл) до рН=2 і залишають на 12 годин. Осад, що утворився, фільтрують, промивають водою і кип'ятять при перемішуванні в 200 мл ацетону. Після охолодження осад відфільтровують і промивають двічі 20 мл ацетону. Вихід 23,1 г (98%). Тпл. 273-274 °C. LC/MS m/z (%) 236,2 [M-H]<sup>+</sup> (98). Характеристика сполуки наведена в статті [106].

*Загальна методика синтезу N-R-2-(4-оксо-2-тіоксо-1H-хіназолін-3-іл)ацетамідів (3.7).*



До суспензії (0,1 моль) 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) у 200 мл безводного діоксану додають (0,12 моль) карбонілдіімідазолу. Суміш кип'яють впродовж 2-4 годин, контролюючи проходження реакції методом ТШХ. Після завершення реакції до реакційної суміші додають відповідний амін (0,12 моль) і кип'яють ще 2 години. Після охолодження реакційну суміш розбавляють 500 мл води і залишають на 12 годин. Осад, що випав, відфільтровують, промивають 50 мл пропанолу-2 і перекристалізують (за необхідності) із суміші 50 мл ДМФА і 200 мл пропанолу-2.

*N*-метил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (**3.7**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ) 12,99 (с, 1H, NH), 7,95 (кв, 1H,  $J = 5,4$  Гц, CONH), 7,99 (д, 1H,  $J=8$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-7), 7,44 (д, 2H,  $J=8,4$ , H-8), 7,35 (т, 1H,  $J=7,6$ , H-6), 4,98 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,53 (д, 3H,  $J=6,2$ , CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 175,6 (C=S); 166,4 (C=O); 159,4 (C=O); 139,2; 135,5; 127,3; 124,5; 115,6; 115,6; 48,3 (NCH<sub>2</sub>); 25,6 (NHCH<sub>3</sub>).

*N*-етил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (**3.8**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ) 12,95 (с, 1H, NH), 8,03 (т, 1H,  $J = 5,4$  CONH), 7,95 (д, 1H,  $J=8,2$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-7), 7,4 (д, 2H,  $J=8,2$ , H-8), 7,3 (т, 1H,  $J=7,6$ , H-6), 4,95 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,05 (квін, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>), 0,98 (т, 3H,  $J=5,2$  -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

*N*-пропіл-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (**3.9**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ) 12,95 (уш. с, 1H, NH), 7,98 (т, 1H,  $J = 5,4$  CONH), 7,92 (д, 1H,  $J=8,0$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7,1$ , H-7), 7,4 (д, 2H,  $J=8,0$ , H-8), 7,35 (т, 1H,  $J=7,1$ , H-6), 5,01 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,98 (кв, 2H,  $J=2,2$ , -NH-CH<sub>2</sub>-), 1,35 (сек, 2H,  $J=2,2$  -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0,9 (т, 3H,  $J=2$ , -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 1176,7 (C=S); 170,7 (C=O); 161,6 (C=O); 139,1, 132,4, 127,8, 124,8, 119,8, 115,5, 55,3 (NCH<sub>2</sub>), 42,2 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,1 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11,2 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

*N*-бутил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (**3.10**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ) 12,95 (с, 1H, NH), 8,02-7,9 (м, 2H, H-5, CONH), 7,65 (т, 1H,  $J=6,4$ , H-7), 7,45-7,25 (м, 2H, H-8,6), 4,95 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,0 (кв, 2H,  $J=2,4$ , -NH-CH<sub>2</sub>-), 1,05-1,55 (м, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0,8 (т, 3H,  $J=2,4$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

*N*-ізобутил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.11). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) 12,8 (уш. с, 1H, NH), 8,05 (т, 1H, *J* = 5,7 CONH), 7,95 (д, 1H, *J*=6,2, H-5), 7,75 (т, 1H, *J*=7, H-7), 7,42-7,29 (м, 2H, H-6, 8), 5,0 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,9 (т, 2H, *J*=2,4, -NHCH<sub>2</sub>-), 1,7-1,6 (м, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,85 (д, 6H, *J*=6.4 -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

*N*-алліл-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.12). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) 12,95 (с, 1H, NH), 8,2 (т, 1H, *J* = 6,2 CONH), 7,95 (д, 1H, *J*=6,8, H-5), 7,75 (т, 1H, *J*=8,4, H-7), 7,45 (д, 2H, *J*=8,4, H-8), 7,35 (т, 1H, *J*=8, H-6), 5,75-5,85 (м, 1H, -CH=), 5,19, 5,06 (дд, 2H, *J*=12,0 =CH<sub>2</sub>), 4,95 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,6 (т, 2H, -NHCH<sub>2</sub>-).

*N*-циклогексил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.13). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) 12,95 (уш. с, 1H, NH), 7,9-7,81 (м, 2H, H-5, CONH), 7,72 (т, 1H, *J*=6,4, H-7), 7,39 (д, 1H, *J*=8, H-8), 7,32 (д, 1H, *J*=8, H-6), 5,0 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), циклогексил: 3,5-3,32 (м, 1H, -CH-), 1,7 (т, 4H, *J*=20,0), 1,52 (д, 1H, *J*=13,3), 1,25-1,0 (м, 5H).

*N*-бензил-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.14). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,00 (с, 1H, NH), 8,55 (т, 1H, *J* = 6,2 CONH), 7,92 (д, 1H, *J*=8,4, H-5), 7,75 (т, 1H, *J*=8,4, H-7), 7,41 (д, 1H, *J*=6,4, H-8), 7,25-7,17 (м, 6H, H-6, Ph), 5,05 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,25 (д, 2H, -NHCH<sub>2</sub>-).

*N*-[(4-хлорофеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.15). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,02 (уш. с, 1H, NH), 8,64 (т, 1H, *J* = 5 CONH), 7,99 (д, 1H, *J*=8, H-5), 7,77 (т, 1H, *J*=7,2, H-7), 7,44 (д, 2H, *J*=8, H-8), 7,33 (т, 1H, *J*=7,6, H-6), 7,31 (д, 2H, *J*=8,4, H-3',5'), 7,29 (д, 2H, *J*=8,4, H-2',6'), 5,09 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,25 (д, 2H, *J*=6,4, -NHCH<sub>2</sub>-). <sup>13</sup>C NMR (100 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ: 176,8 (C=S), 171,0 (C=O), 160,7 (C=O), 140,2, 136,9, 134,6, 132,5, 132,3, 128,6, 124,9, 127,8, 119,9, 115,4, 55,2 (NCH<sub>2</sub>), 43,3 (NHCH<sub>2</sub>).

*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.16). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,05 (уш. с, 1H, NH), 8,65 (т, 1H, *J*=4,8 CONH), 7,95 (д, 1H, *J*=8,2, H-5), 7,75 (т, 1H, *J*=8, H-7), 7,45-7,38 (м, 3H, H-8, H-5',6'), 7,58 (с, 1H, H-3'), 7,33 (т, 1H, *J*=8,4, H-6), 5,1 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,35 (д,

2H,  $J=6,4$  -NHCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ: 176,7 (C=S), 167,27, 161,96, 150,15, 139,55, 135,44, 135,17, 132,86, 132,26, 130,05, 128,56, 127,45, 127,28, 122,61, 115,24, 113,84, 42,75, 41,93.

*N*-[(2-метоксифеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.17). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 12,95 (уш. с, 1H, NH), 8,50 (т, 1H,  $J=4,6$  CONH), 7,95 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-5), 7,74 (т, 1H,  $J=8$ , H-7), 7,40 (д, 2H,  $J=8,4$ , H-8), 7,34 (т, 1H,  $J=8$ , H-6), 7,15-6,98 (м, 3H, Ar), 5,05 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,2 (д, 2H,  $J=6,4$ , -NHCH<sub>2</sub>-), 3,75 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>).

*N*-[(4-метоксифеніл)метил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.18). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 12,95 (уш. с, 1H, NH), 8,45 (т, 1H,  $J=6$  CONH), 7,95 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-5), 7,77 (т, 1H,  $J=8$ , H-7), 7,44 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-8), 7,33 (т, 1H,  $J=8$ , H-6), 7,25 (д, 2H,  $J=8$ , H-2',6'), 6,8 (д, 2H,  $J=8$ , H-3',5'), 5,1 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,25(д, 2H,  $J=5$ , -NHCH<sub>2</sub>-), 3,75 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>).

*N*-(фенетил)-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.19). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 12,98 (с, 1H, NH), 8,18 (т, 1H,  $J=5,3$  CONH), 7,98 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=8$ , H-7), 7,45-7,35 (м, 2H, H-6, 8), 7,28-7,15 (м, 5H, Ph), 5,0 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,25 (кв, 2H,  $J=4,2$ , -NH-CH<sub>2</sub>-), 2,7 (т, 2H,  $J=8$ , -CH<sub>2</sub>Ph).

*N*-[2-(4-хлорофеніл)етил]-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.20). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,02 (с, 1H, NH), 8,19 (т, 1H,  $J=5$  CONH), 7,96 (д, 1H,  $J=8$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-7), 7,43 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-8), 7,37 (т, 1H,  $J=7,6$ , H-6), 7,34 (д, 2H,  $J=8,4$ , H-2',6'), 7,25 (д, 2H,  $J=8,4$ , H-3',5'), 5,01 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,33 (кв, 2H,  $J=5$ , -NH-CH<sub>2</sub>-), 2,70 (т, 2H,  $J=8$  -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

*N*-(3-фенілпропіл)-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.21). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 12,95 (с, 1H, NH), 8,10 (т, 1H,  $J=5$  CONH), 7,94 (д, 1H,  $J=9$ , H-5), 7,70 (т, 1H,  $J=7$ , H-7), 7,39 (д, 1H,  $J=9$ , H-8), 7,30 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-6), 7,28-7,15 (м, 5H, Ph), 5,00 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,05 (кв, 2H,  $J=5$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,65 (т, 2H,  $J=4,2$ , -CH<sub>2</sub>Ph), 1,65 (квин, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

*N*-феніл-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.22). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,01 (с, 1H, NH), 10,05 (с, 1H, CONH), 7,98 (д, 1H,  $J=9$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7$ , H-7), 7,41 (д, 1H,  $J=9$ , H-8), 7,5 (д, 2H, H-2',6'), 7,28 (т,



2H, H-3',5'), 7,0 (т, 1H, H-4'Ar), 7,30 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-6), 5,25 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175,54, 168,81, 164,8, 159,35, 139,14, 138,84, 135,64, 128,79, 127,35, 124,64, 123,38, 121,41, 119,16, 115,78, 115,34, 48,73.

*N*-(2-метоксифеніл)-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.23). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,01 (уш. с, 1H, NH), 9,6 (с, 1H, CONH), 7,98 (д, 1H,  $J=8$ , H-5), 7,85 (д, 1H,  $J=8$ , H-6'), 7,75 (т, 1H,  $J=7$ , H-7), 7,44 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-8), 7,37 (т, 1H,  $J=7,2$ , H-6), 7,11-7,06 (м, 2H, H-3',5'), 6,88-6,93 (м, 1H, H-4'), 5,36 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,84 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175,58, 164,94, 159,29, 149,31, 139,14, 135,72, 127,39, 127,18, 124,69, 121,44, 120,29, 115,78, 115,31, 111,29, 66,39, 55,77, 48,85.

*N*-(4-метоксифеніл)-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (3.24). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 13,05 (с, 1H, NH), 10,05 (с, 1H, CONH), 7,95 (д, 1H,  $J=8,4$ , H-5), 7,75 (т, 1H,  $J=7$ , H-7), 7,45-7,35 (м, 3H, H-8, H-4',6'), 7,30 (т, 1H,  $J=7$ , H-6), 6,86 (с, 2H, H-3',5'), 5,25 (с, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,75 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>).

#### *Фармакологічний скринінг*

Скринінг 10 сполук із серії **3.7-3.24** на протисудомну активність проводили на базовій моделі PTZ судом у мишей [121]. Експерименти з тваринами проводили згідно з міжнародними правилами – Директивою 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради Європейського Союзу від 22 вересня 2010 року щодо охорони тварин, які використовуються в наукових цілях. Детальна методика визначення, кількість груп та характеристика показників для оцінки захисного протисудомного потенціалу сполук описана в статті [122]. Як конвульсант використано – PTZ ("Sigma", США) у дозі 90 мг/кг підшкірно у вигляді водного розчину, як референс-препарат – натрій вальпроат ("Депакін", Sanofi-Aventis, Франція) у дозі 300 мг/кг через зонд у шлунок за 30 хв до введення PTZ; досліджувані сполуки **3.7-3.24** в дозі 100 мг/кг через зонд інтрагастрально у вигляді суспензії в твіні-80 за 30 хв перед ін'єкцією PTZ. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми "STATISTICA 8.0" Windows.

### Висновки до розділу 3

1. Оптимізовано умови та здійснено синтез головного білдинг-блоку дослідження (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти реакцію циклізації метилового естеру 2-ізотіоціанобензойної кислоти з гліцином при кип'ятінні в середовищі пропанолу-2 впродовж 30 хвилин у присутності триетиламіну.
2. "One-pot" методом здійснено синтез нових не описаних в літературі *N*-заміщених-2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів взаємодією (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти з *N,N'*-карбонілдіімідазолом при кип'ятіння у діоксані та подальшою взаємодією проміжного ацилімідазолу з відповідними алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами.
3. Структуру синтезованих речовин доведено методами <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопією, склад – елементним аналізом, індивідуальність та чистоту – хромато-мас-спектрометрією.
4. Для 10 синтезованих похідних проведено фармакологічний скринінг на PTZ моделі судом та визначено низькі показники протисудомної активності. Здійснено SAR-аналіз та виявлено певні закономірності.

*Результати досліджень цього розділу наведено в наступних публікаціях:*

1. El Kayal Wassim, Abu Sharkh A.I., Burian G. O. Perspectives of biologically active compounds creation in the range of (2,4-dioxo-(2-thio-4-oxo) -quinazolin-3-yl) acetic acid derivatives. *9th international conference of pharmacy science and practice 2018 : the book of abstracts of 50<sup>th</sup> Conference, Kaunas, Lithuania, Novemver 9th, 2018. Kaunas, 2018. P. 52.*
2. El Kayal W., Abu Sharkh A.I., Burian G.O. Synthesis of biologically active compounds in the range of (2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-2*H*-quinazolin-3-yl)-acetamide derivative. *Topical issues of new medicines development: мат. XXVI міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 10-12 квіт. 2019 р., м. Харків: НФаУ, 2019. С. 9–10.*

3. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Дизайн потенциальных антиконвульсантов среди производных хиназолин-4(3H)-онон. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення : від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. дистанційної міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. с. 139.
4. Северіна Г., Ель Кайал В., Абу Шарк А., Головченко О., Георгіянц В.. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1H-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021*: мат. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 82
5. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3H)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування* : мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7–10.

## РОЗДІЛ 4

### СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ХІНАЗОЛІН-4(3*H*)- ОНУ

Відповідно до дизайну експерименту наступною групою речовин для синтезу мали бути ацетамідні похідні 2,4-діоксохіназоліну. За результатами молекулярного докінгу саме діоксопохідним прогнозовано вищу ймовірність прояву протисудомної активності через модуляцію VZD сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора та, відповідно, активність щодо запобігання судомним нападам на PTZ моделі.

#### 4.1 Синтез похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-ацетамідів

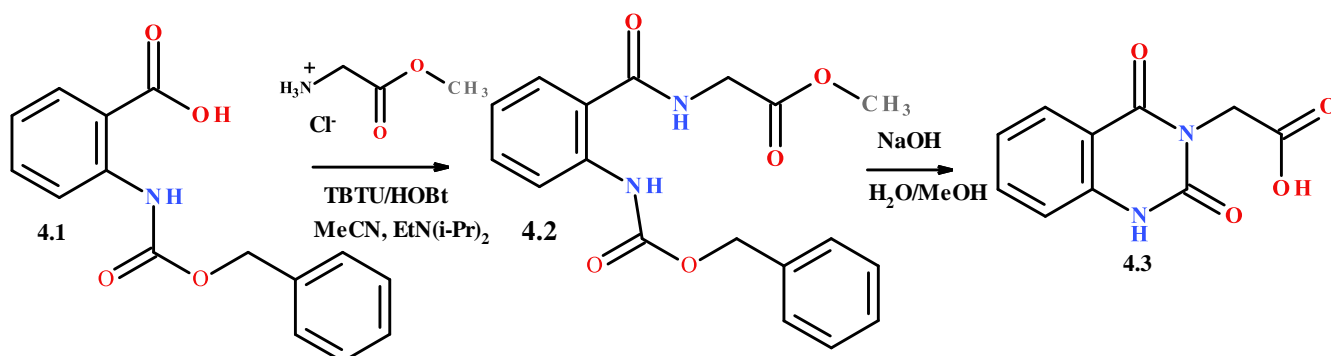
Підходи до формування хіназолінового циклу характеризуються значною різноманітністю, тому вибір синтетичної стратегії в першу чергу залежить від бажаних фрагментів у цільовій структурі та потребує обґрунтування з точки зору раціональності синтезу.

На цьому етапі досліджень основною задачею була розробка ефективного способу синтезу для напрацювання ключового білдинг-блоку – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**4.3**) з високим виходом та достатнім рівнем чистоти. Для цього було апробовано різні підходи оскільки введення залишків амінокислот в структуру гетероциклів це завжди ускладнене завдання.

Першою спробою (спосіб А) синтезу цільової кислоти **4.3** стало відтворення методики запропонованого Philipova та співавторами з використанням *N*-захищеної антранілової кислоти **4.1** як вихідного реагенту шляхом взаємодії з комерційно доступним метилгліцинат гідрохлоридом (схема 4.1) [123, 124]. Метод потребує використання специфічних допоміжних реагентів 2-(бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламініум тетрафлуороборату

(TBTU) в ацетонітрилі у присутності 1-гідроксibenзотріазолу (HOBT) і N,N-диізопропілетиламіну EtN(iPr)<sub>2</sub>.

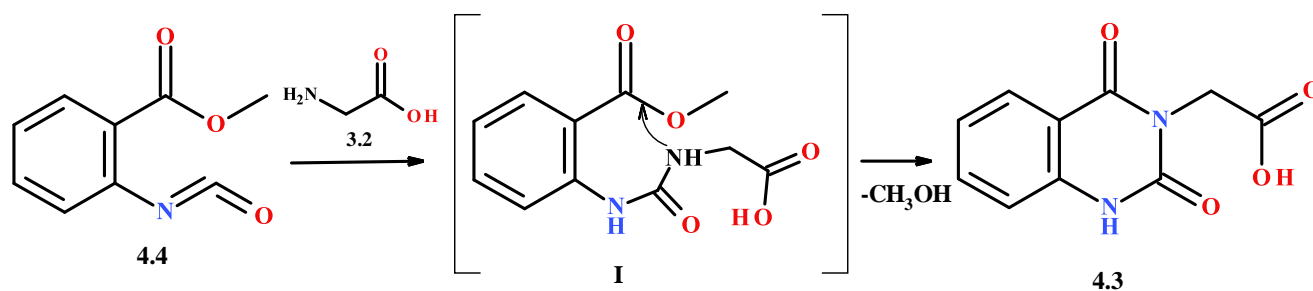
Схема 4.1



Напівпродукт метил 2-[(2-амінобензоіл)аміно]ацетат (4.2) одержано з виходом лише 58% тоді як автори методики повідомляли про 88%. Спроба перетворити 4.2 N-захищену карбонову кислоту у відповідну кислоту 4.3 шляхом обробки спиртовим розчином натрій гідроксиду впродовж 70 годин привела до цільової 2,4-діоксохіназолін-3-оцтової кислоти (4.3) з кількісним виходом (схема 4.1). Метод точно не є препаративним потребує специфічних реактивів та дає низький вихід продукту реакції.

Щоб одержати ключовий білдинг-блок 4.3 в одну стадію ми застосувати методику запропоновану Саппе та співавторами (спосіб Б) [125], що полягає у конденсації метил 2-ізоціанатбензоату з α-амінокислотами (схема 4.2). Механізм реакції полягає у нуклеофільній атаці аміногрупи α-амінокислоти ізоціанатної групи з утворенням о-карбометоксиурейдного інтермедіату (I) та подальшою внутрішньо молекулярною циклізацією з елімінуванням метанолу.

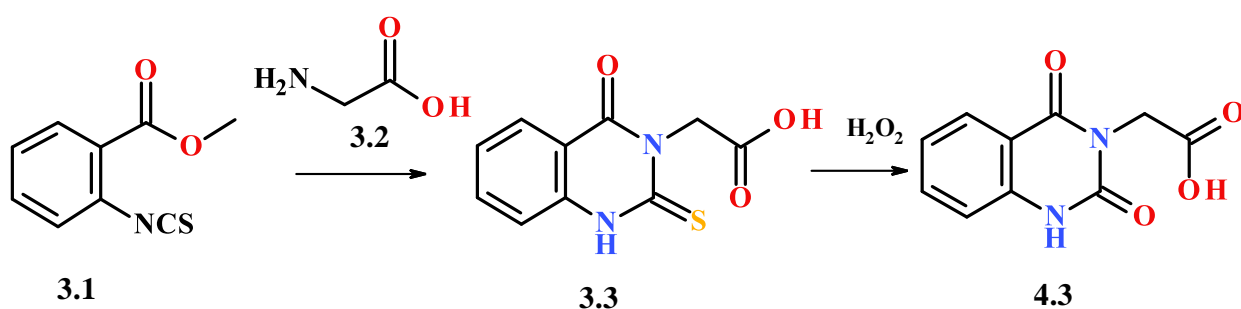
Схема 4.2



Взаємодію метил 2-ізоціанатбензоату **4.4** з гліцином **3.2** проводили у суміші діоксану та води в лужному середовищі (рН 8-9) за кімнатної температури. Цільова кислота **4.3** одержана з виходом лише 43%. Навіть при спробі підвищити вихід обережно нагріваючи реакційну суміш до 70 °С вдалося збільшити вихід лише на 10 %. Тож цей метод синтезу не є препаративним через низький вихід продукту реакції.

Нами було запропоновано та відпрацьовано новий спосіб синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**4.3**) шляхом окиснення гідрогену пероксидом 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) (схема 4.3), одержаної на попередньому етапі досліджень (розділ 3) із метилового естеру 2-ізоціанобензойної кислоти (**3.1**) та гліцину (**3.2**) (спосіб В) [126].

Схема 4.3



Такий варіант синтезу цільової кислоти **4.3** виявився ефективним, оскільки вихід після двостадійного синтезу склав 90%. Про вдалий та повний перебіг реакції окиснення можна стверджувати за результатами хромато-мас-спектрометрії. Зафіксовано утворення одного піку квазімолярного іону з одним часом утримання, що різниться від часу утримання тіоксопохідної **3.3** – 0,838 щодо 0,686, відповідно (рис. 4.1 та 3.1). Тож виділена кислота **4.3** є індивідуальною речовиною з прийнятним ступенем чистоти – 99% (рис. 4.1) [126, 127].

Про вдалий перебіг реакції свідчать і дані <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопії: сигнал групи NHC=O хіназолінового циклу дещо зміщений у в бік сильного поля щодо

протону групи  $\text{NHC}=\text{S}$ : 11,56 щодо 13,01 м.ч., відповідно (експериментальна частина).

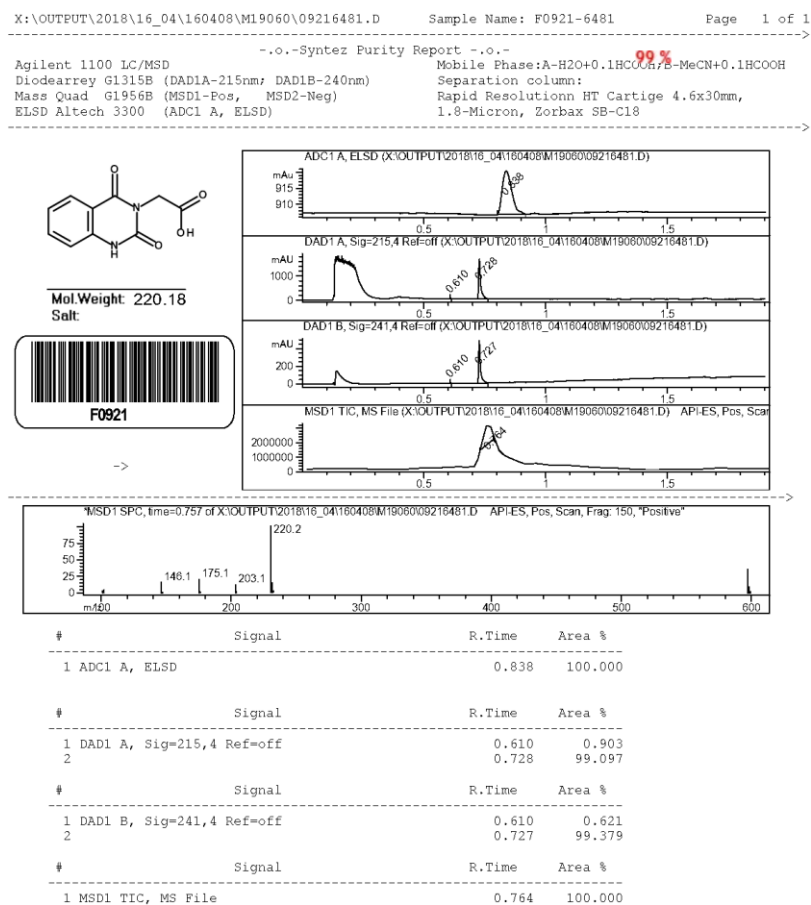
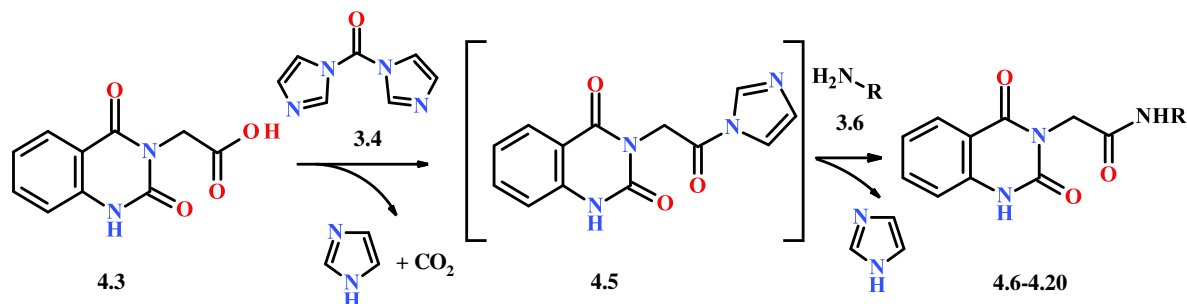


Рис. 4.1 Хромато-мас-спектр синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти (4.3)

#### 4.2 Синтез та фізико-хімічні властивості 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів

Для вирішення наступної задачі експериментальних досліджень щодо одержання 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів (4.5-4.18) було здійснено послідовну взаємодію 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти (4.3) з N,N'-карбонілдіімідазолом (3.4) і відповідними амінами (3.6) у діоксані (схема 4.4).

Хіназолінкарбонова кислота 4.3 в реакції з N,N'-карбонілдіімідазолом утворює ацилімідазол – 3-(2-імідазол-1-іл-2-оксоетил)-1H-хіназолін-2,4-діон (4.5) як проміжний продукт, а діоксид карбону, що виділяється під час реакції, є каталізатором реакції з відповідними амінами [128, 129].



R= 4.6 CH<sub>3</sub>; 4.7 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 4.8 C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; 4.9 C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; 4.10 CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 4.11 CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>; 4.12 цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>;  
 4.13 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 4.14 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(Cl)-4; 4.15 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(Cl)<sub>2</sub>-2,4; 4.16 CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-2; 4.17 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
 4.18 (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 4.19 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; 4.20 C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)-4.

Синтезовані речовини **4.6-4.20** є білими кристалічними речовинами з чіткими температурами плавлення, добре розчинні у 2-пропанолі, діоксані, диметилформаміді, не розчинні у воді (табл. 4.1) [87, 126].

За даними LC/MS аналізу у результаті реакції амінування утворюються індивідуальні речовини, а маса квазімолярного іону відповідає зазначеній структурі (рис. 4.2, табл. 4.1).

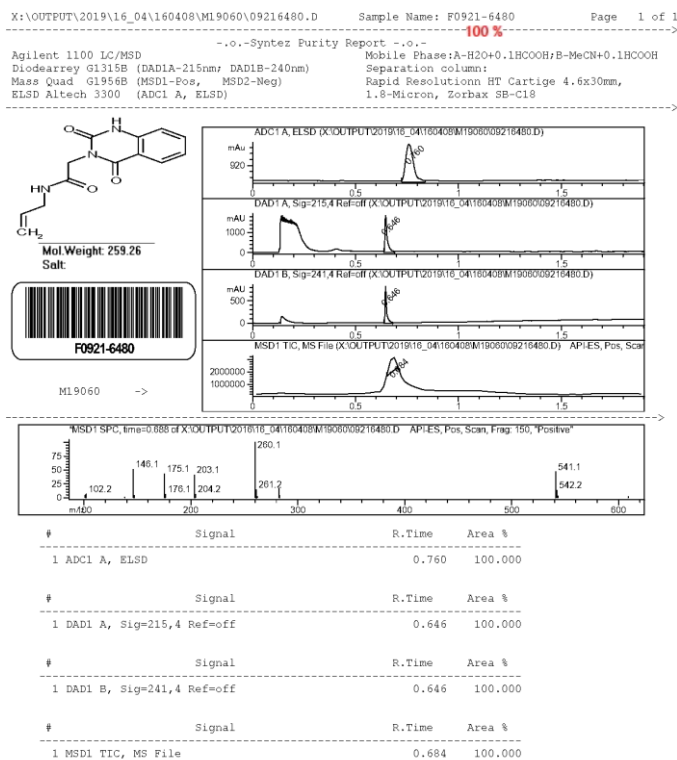


Рис. 4.2 LC/MS спектр 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-(проп-2-ен-1-іл)ацетаміду (**4.11**)



Структуру та молекулярні маси одержаних похідних **4.6-4.20** підтверджено методами  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії, відповідно (табл. 4.1, експер. частина).

Таблиця 4.1

**Фізико-хімічні характеристики N-заміщених 2-(2,4-оксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів (4.6-4.20)**

№	Вихід %	Тпл., °C	Молекулярна-формула	Вирахувано, %			LC/MS m/z (%)
				Знайдено, %			
				C	H	N	
4.6	80	292-294	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$	55,50	4,50	18,00	234,0
				56,65	4,75	18,02	$[\text{MH}]^+(98)$
4.7	84	268-270	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	58,05	5,17	17,29	248,0
				58,29	5,30	17,09	$[\text{MH}]^+(97)$
4.8	82	312-314	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	59,46	5,65	16,03	262,0
				59,76	5,79	16,08	$[\text{MH}]^+(98)$
4.9	75	292-294	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$	61,02	6,17	15,03	276,2
				61,08	6,22	15,26	$[\text{MH}]^+(95)$
4.10	82	270-272	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$	61,17	6,36	15,06	276,0
				61,08	6,22	15,26	$[\text{MH}]^+(98)$
4.11	80	272-274	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	60,11	5,12	16,36	260,1
				60,23	5,05	16,21	$[\text{MH}]^+(98)$
4.12	86	308-310	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$	63,63	6,18	13,82	302,2
				63,77	6,36	13,94	$[\text{MH}]^+(99)$
4.13	84	294-296	$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	66,12	4,78	13,36	310,0
				66,01	4,89	13,58	$[\text{MH}]^+(99)$
4.14	88	300-302	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3$	66,00	5,15	13,20	344,1
				66,01	5,30	13,00	$[\text{MH}]^+(96)$
4.15	78	310-312	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$	58,00	6,12	15,20	378,0
				58,30	6,20	15,26	$[\text{MH}]^+(98)$
4.16	85	292-294	$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$	60,00	4,55	11,60	340,2
				60,83	4,82	11,82	$[\text{MH}]^+(98)$
4.17	69	300-302	$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$	66,63	5,22	13,08	324,2
				66,86	5,30	13,00	$[\text{MH}]^+(94)$
4.18	82	315-317	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$	63,00	6,10	17,00	338,2
				63,68	6,12	17,09	$[\text{MH}]^+(94)$
4.19	75	294-296	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	61,55	4,20	13,20	296,0
				61,72	4,21	13,50	$[\text{MH}]^+(94)$
4.20	78	298-300	$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$	62,81	4,60	12,90	326,0
				62,91	4,62	13,12	$[\text{MH}]^+(96)$

На  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах присутні усі сигнали протонів у відповідності до будови синтезованих сполук **4.6-4.20** (рис. 4.3, експер. частина). Вдалий перебіг реакції амідуювання доводить відсутність уширеного синглетного сигналу карбоксильної групи вихідної кислоти **4.3** при 13,22 м.ч., натомість з'являються сигнал амідного протону та характерні сигнали протонів алкільних та арильних замісників. Порівнюючи спектри 2,4-діоксопохідних **4.6-4.20** із спектрами 4-оксо-2-тіоксопохідних **3.7-3.24** слід відзначити, що сигнал групи  $\text{NHC}=\text{O}$  хіназолінового циклу у всіх синтезованих сполук дещо зміщений ( $\sim 0,5-1,45$  м.ч.) у бік сильного поля щодо протону групи  $\text{NHC}=\text{S}$ . Для жодної сполуки **4.6-4.20** цей сигнал не перевищив значення 13,0 м.ч. та резонує у вигляді класичного синглету, тоді як у тіоксопохідних синглет має уширений вигляд. Інших суттєвих відмінностей у характері протонних спектрів не спостерігається.

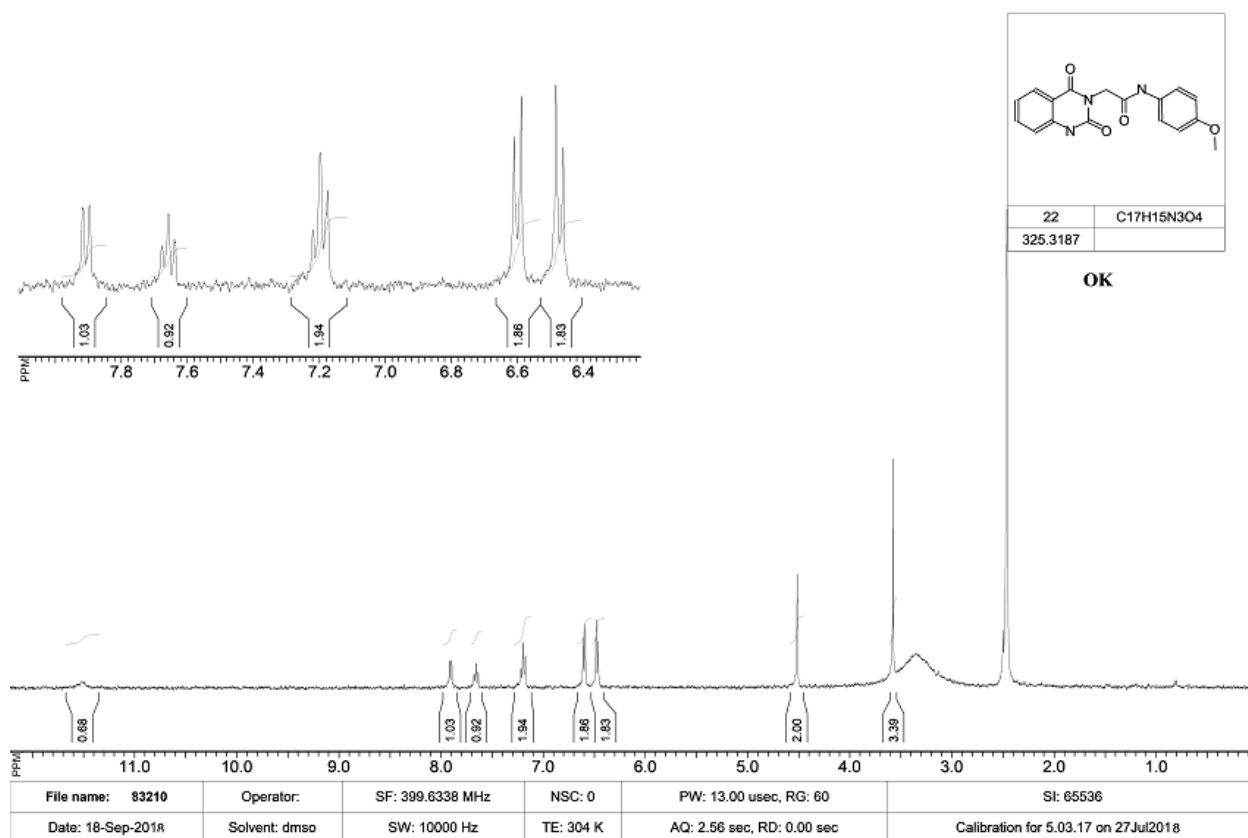


Рис. 4.3  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр N-феніл-2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетаміду (**4.22**)

У  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах слід відзначити зникнення характеристичного резонансного сингала атома карбону групи  $\text{C}=\text{S}$  у слабкому полі (175,5-176,8 м.ч.). Натомість фіксується два сигнали амідних карбонільних груп – хіназолінонової та ацетамідної – на ділянці 161,8-166,48 м.ч. (рис. 4.4). Положення та кількість інших сигналів атомів карбону відповідає структурі сполук **4.6-4.20**.

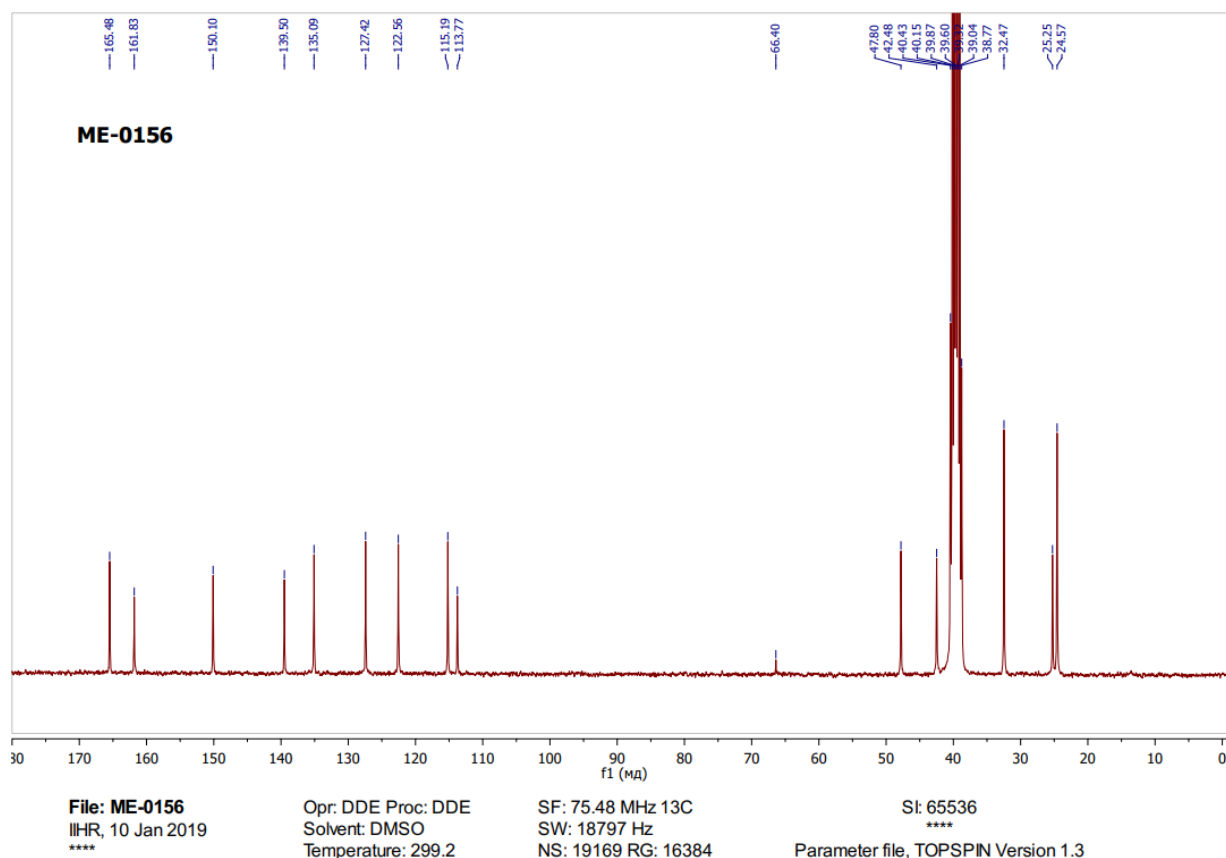


Рис. 4.4  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(4-хлорофеніл)метил]-ацетаміду (**4.14**)

#### 4.3 Обговорення результатів протисудомної активності похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів на PTZ-моделі судом

Похідні 2,4-діоксохіназолін-4-ону **4.6-4.20** досліджували на кафедрі фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету під керівництвом доктора медичних наук, професора С. Ю. Штриголя.

Експеримент проводили в аналогічних умовах та в тих же дозах щодля 2-тіо-4-оксохіназолінів **3.7-3.24** для можливості встановлення взаємозв'язку структура-активність. З урахуванням неоднозначних результатів скринінгу тіоксохіназолінів в цьому дослідженні в *in vivo* експеримент взяли десять речовин з найліпшими показниками афінності до BZD-сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

Серед досліджуваних діоксохіназолінів **4.6-4.20** виявлено чотири вискоєфективні похідні, які за критерієм інтегрального захисного показника – зменшення летальності порівняно з контролем – проявили достовірний протисудомний ефект. Це сполуки з Pr (**4.8**), 2,4-diClBn (**4.15**), (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Ph (**4.18**), Ph (**4.19**) замісниками в ацетамідному фрагменті (рис. 4.5) [125, 126, 129].

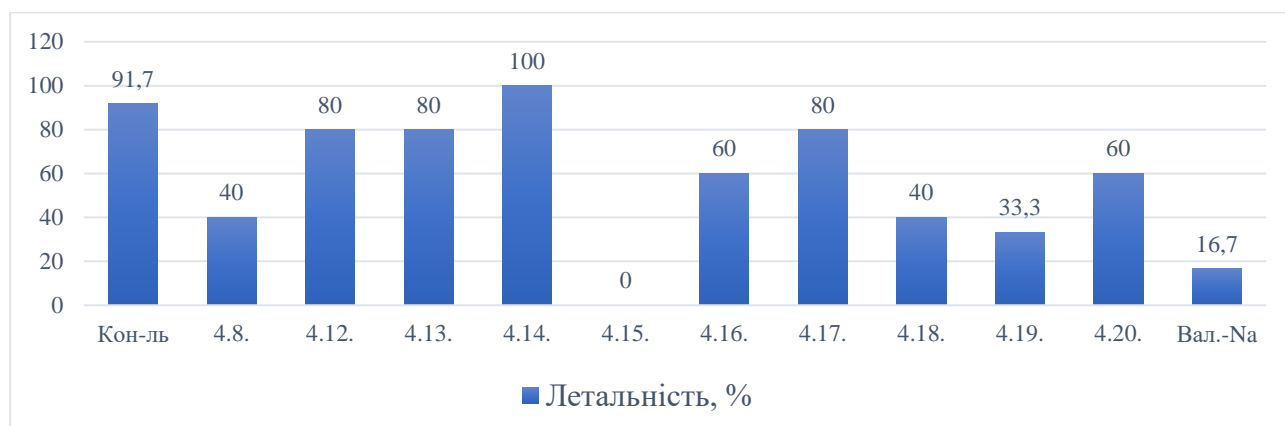


Рис. 4.5 Показники летальності на тлі введення похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамідів (**4.6-4.20**)

За показником летальності прослідковується кореляція між збільшенням карбонового ланцюга в ацетамідному залишку та зменшенням летальності в ряду NHCH<sub>2</sub>Ph > NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph > NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph. Така ж закономірність спостерігається і зі значенням афінності до ГАМК<sub>A</sub> рецептору (розділ 3.3).

Абсолютним лідером визначено дихлоробензильну похідну **4.15**, яка повністю захищала піддослідних тварин від летальності (проти 91,7 % летальності у контролі та 16,7 – у референс-групі) та не поступалася натрій вальпроату за жодним з показників впливу на судомний стан. Похідна **4.15** у 3,52 раза подовжувала тривалість латентного періоду, максимально скорочувала кількість клоніко-тонічних судом на 1 тварину до 1,00 проти 3,58 у контролі та

інші показники. Тяжкість судом при введенні похідної **4.15** склала лише 2,8 бала щодо 5,83 (зменшення у 2,1 раза) – у контролі та 2,83 – у натрій вальпроату. Значне зниження тривалості судомного періоду – у 26,7 раза щодо контролю та 16,9 щодо референс-препарату (рис. 4.6).



Рис. 4.6 Тривалість судомного нападу на тлі введення похідної **4.15**

Ще три сполуки **4.8**, **4.18**, **4.19** окрім вже згадуваного достовірного зменшення летальності статистично значуще позитивно впливали на ще п'ять ознак перебігу судомного нападу. Однак усі вони виявили лише тенденцію щодо подовження тривалості латентного періоду початку судомного нападу (рис. 4.7). Для фенілзаміщеної **4.19** похідної слід відзначити значне зниження кількості тонічних судом – мали місце лише в 55,5 % проти контролю, похідна **4.18** – 80 %, а **4.8** – взагалі не впливала на цей показник.

Три похідні **4.12**, **4.17**, **4.20** виявили тенденцію до зменшення летальності (60-80 %) та продемонстрували слабкий протисудомний ефект, покращуючи лише 2 показники тяжкості перебігу судомного нападу. Нейтральними щодо PTZ-судом виявилися сполуки **4.12** та **4.13**.

Слід зазначити, що с 4-хлоробензилацетамідна похідна **4.14** виявила помірні проконвульсивні властивості: летальність тварин на тлі її застосування дорівнювала 100 %, а час до загибелі піддослідних тварин достовірно скоротився майже у 2 рази щодо контрольної групи.



Рис. 4.7 Тривалість латентного періоду та час до загибелі на тлі введення похідних 2-(4,2-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів (**4.6-4.20**)

Чіткої залежності між довжиною алкільного радикалу та показниками протисудомної активності виявлено не було. Натомість похідні з ароматичним кільцем в структурі **4.13-4.20** мають кращі показники протисудомної активності, що може бути пов'язане з підвищенням ліпофільності молекул і полегшенням їх проникнення через гематоенцефалічний бар'єр. Посиленню активності також сприяє наявність електронноакцепторних замісників. Одночасна наявність двох атомів хлору у 2 і 4 положеннях бензильного замісника виводить сполуку **4.15** в абсолютні лідери, наявність лише одного атома хлору у 4-положенні призводить до появи проконвульсивних властивостей у похідної **4.14**.

Основний висновок, який вдалося зробити за даними скринінгу, що сполуки з ендациклічною карбонільною групою у положенні 2 виявляють ліпші протисудомні властивості, ніж їх структурні аналоги з 2-тіоксогрупою. Тож можемо стверджувати, що наявність тіоксо-групи є небажаною в структурі антиконвульсантів та призводить до втрати активності.

За результатами скринінгу було обрано чотири «сполуки-хіти», які виявили найліпші показники захисту від PTZ-індукованих судом, які перейшли на наступний етап досліджень:

- 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-пропілацетамід (**4.8**);

- 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**);
- 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-N-(2-фенілпропіл)ацетамід (**4.18**);
- 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-N-фенілацетамід (**4.19**);

Одержані результати підтверджують дані молекулярного докінгу про можливі ГАМКпозитивні властивості сполук оскільки судомна дія PTZ зумовлена пригніченням ГАМКергічних гальмівних процесів.

#### 4.4 Обговорення результатів нейротоксичності N-заміщених 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)ацетамідів

Класичним методом визначення нейротоксичної дії речовин є тест стрижня, що обертається, або «ротарод-тест», який дозволяє оцінити негативний вплив на рухову функцію піддослідних тварин. Найпоширенішим побічним ефектом ПСЗ є вплив на координацію рухів та розслаблення скелетних м'язів, що негативно впливає на життя хворих, тому доцільність оцінки нових кандидатів у ПСЗ на ці показники є очевидною та вкрай необхідною.

Скринінгу у тесті стрижня, що обертається, було піддано чотири похідні 2,4-діоксокіназолінів, які виявили найліпші показники активності на PTZ-модулі судом. Як видно з діаграми (рис. 4.8) серед похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміду **4.8**, **4.15**, **4.18**, **4.19** не виявлено речовин, які б порушували координацію рухів мишей, через те що відсутні статистично достовірні відмінності з групою контролю. Натомість натрій вальпроат виявляв легкі рухові порушення, значно збільшуючи кількість мишей, які падали зі стрижня до 3 і 5 хв.

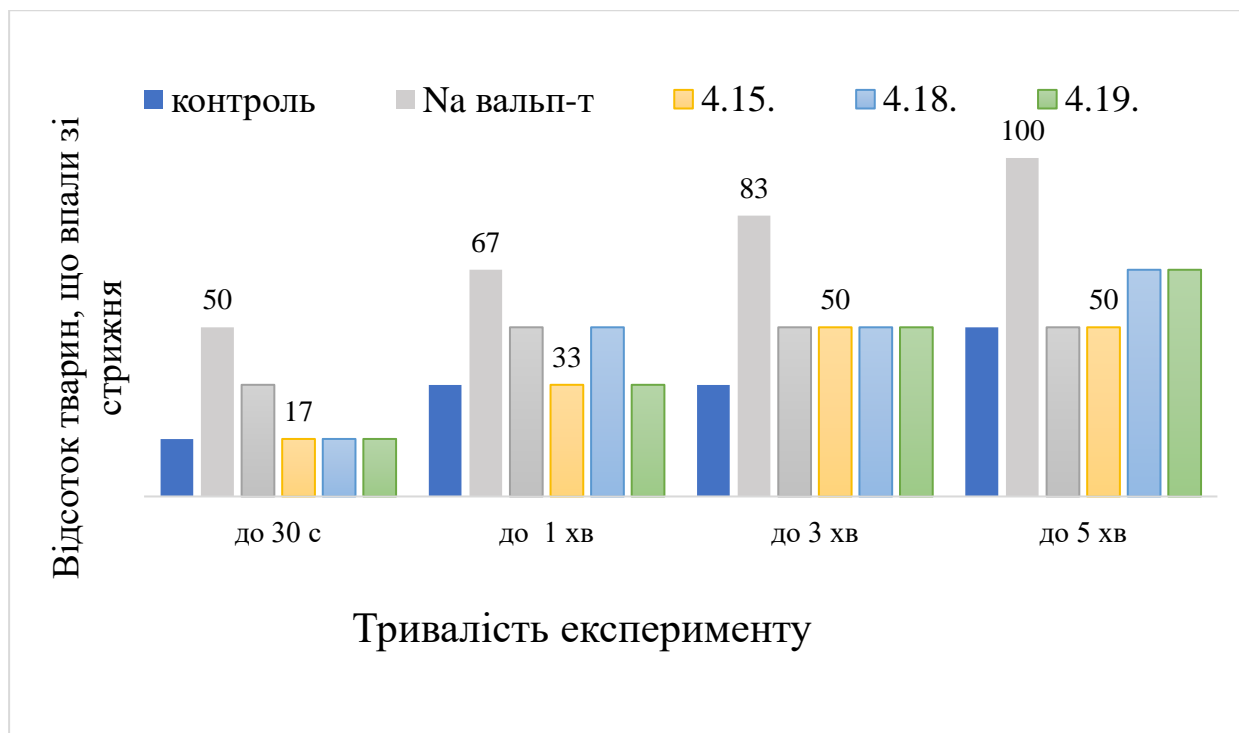


Рис. 4.8 Результати впливу похідних **4.8**, **4.15**, **4.18**, **4.19** на тонус м'язів та координацію рухів

За найкращими показниками захисту від судом на PTZ-моделі судом та за найменшим впливом на координацію руху та тонус м'язів у піддослідних тварин для подальших досліджень обрано похідну 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**).

#### 4.5 Обговорення результатів вивчення гострої токсичності «сполуки-хіта»

У дослідженні гострої токсичності не вдалося встановити середню летальну дозу (LD50) «сполуки-хіта» **4.15**, оскільки введення будь-якої досліджуваної дози, зокрема максимальної дози 5000 мг/кг, не супроводжувалося загибеллю тварин впродовж 14 днів. Оцінка загального стану тварин не виявила жодних проявів інтоксикації та нейротоксичного впливу на піддослідних тварин.

Введення похідної **4.15** в дозах 3000 та 5000 мг/кг через 30 хв та 1 год зумовило тимчасове зниження рухової активності мишей, через перевантаження об'ємом введеного розчину сполуки **4.15** [130]. Отже, сполуку **4.15** віднесено до



V класу токсичності за Hodge та Sterner [131] як практично нетоксичну речовину ( $LD_{50} > 5000$  мг/кг).

#### 4.6 Прогнозування активності «сполуки-хіта» на моделі MES-індукованих судом

Міжнародні стандарти щодо створення нових ПСЗ – ADD [69] та ETSP [68] – регламентують обов'язкове вивчення нових похідних на моделі судом, індукованих електричним струмом (MES) [132]. MES розглядається як характеристична модель генералізованих тонічно-клонічних нападів людини [133]. Оптимізувати скринінговий пошук покликані інструменти *in silico* методів, які дозволять зберегти тварин, скоротити час та витрати на дослідження. Раніше на основі масштабних експериментальних досліджень похідних піримідин-4(2)-ону(тіону) науковцями НФаУ сформовано універсальний алгоритм пошуку ПСЗ, який складається з поетапного застосування *in silico* та *in vivo* моделей. В алгоритмі означено співмірність даних молекулярного докінгу в активні сайти інгібіторів метаботропних глутаматних рецепторів 5 підтипу (mGlu5), іонотропних AMPA-рецепторів глутамату з даними активності на моделі MES-індукованих судом *in vivo*. Саме ці активні сайти інгібіторів були використані нами для прогнозування активності похідної **4.15** на моделі MES-індукованих судом. Параметри докінгу використані відповідно до описаних в уніфікованому алгоритмі [71].

Афінитет до mGlu рецепторів I групи оцінювали докінгом в активний сайт mGlu5 – PDB ID 6FFI. Референс-ліганди – МРЕР – високоселективний негативний алостеричний модулятор з виразними протисудомними властивостями [134] та топірамаат – ПСЗ одним із векторів дії якого є селективний антагонізм до mGluR5. Їх скорингові функції склали -10,3 та -8,8 ккал/моль, відповідно, а значення для хіназолінової похідної **4.15** – -6,8 ккал/моль. Візуалізація сумісної конформації двох лігандів демонструє неспроможність похідної **4.15** зануритися у досить глибоко розміщений та

вузький активний сайт (рис. 4.9). Конформаційна фіксація молекули відбувається лише на вході за участю пептидних залишків, які не є рентгеноструктурно визначеними елементами гідрофобної кишені (табл. 4.3).

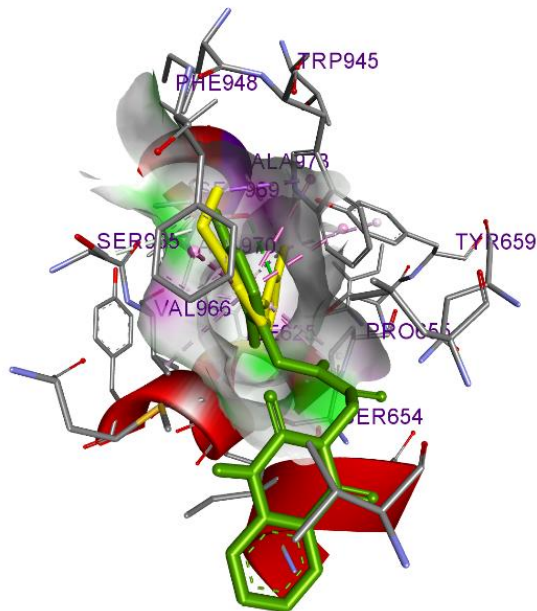


Рис. 4.9 3D конформація похідної **4.15** (зелена) та антагоніста МРЕР (жовта) в активному сайті mGluR5-рецептора

Таблиця. 4.3

**Дані молекулярного докінгу похідної 4.15 в активні сайти інгібіторів mGluR5 та АМРА-рецептори глутамату**

Мішень	Скоринг ва функція ккал/моль	Гідрофобна взаємодія	Водневі зв'язки	Референс ліганд, ккал/моль
Метаботропні рецептори глутамату				
mGlu5	-6,8	A:Phe651(2)*, Val900(2)*, Trp945(5), Phe948, Ile944*, Pro655, Val966(2), Arg648*, Met962*	Asn907, Phe651, Gly652, Val900*	-10,3 МРЕР -8,8 топірамат
Іонотропні рецептори глутамату				
AMPA	-10,1	Phe517(2), Phe623(4), Asn791, Val792*, Pro520, Leu620	Ser615, Asn791, Tyr616,	-10,6 (перампанель)

Визначення афінності до сайту інгібітора АМРА-рецепторів – PDB ID 5L1F – проводили у порівнянні з нативним лігандом перампанелем [98].

Розраховане низьке значення скорингової функції досліджуваної похідної **4.15** легко пояснюється після аналізу конформації щодо перампанелю: подібність просторового розміщення зі стабілізацією розгалуженою сіткою гідрофобних взаємодій з бідентантною фіксацією хіназолінового цикла та тетраєдрично – дихлорбензильного фрагментів залишками фенілаланіну (Phe517, 623) (рис. 4.10). Акцентним все ж має бути положення хіназолінового циклу на місці фіксації ціанофенільного фрагмента перампанелю, який, за літературними даними, виконує роль «клинки» в трансмембранному домені, фіксуючи закриту форму йонного каналу. Однак, як видно з рис. 4.10 фіксація хіназолінового циклу відбувається під іншим кутом, що ставить під сумнів можливість реалізації інгібувальної дії на АМРА-рецептори.

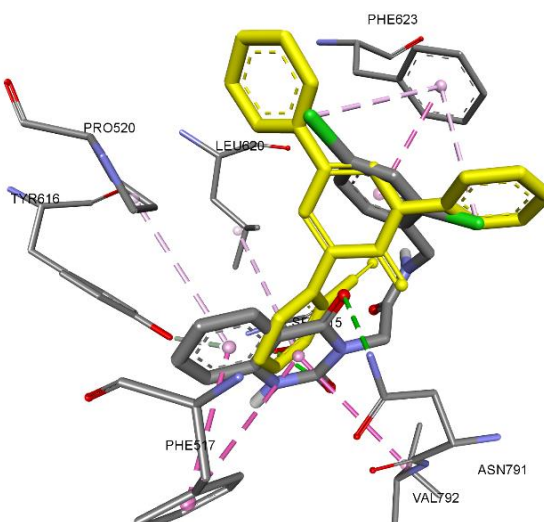


Рис. 4.10 3D візуалізація сумісної конформації похідної **4.15** (сіра молекула) з перампанелем (жовта молекула) в активному сайті АМРА-рецептора

Отже, за результатами докінгу для похідної **4.15** у сайти інгібіторів метаботропних глутаматних рецепторів 5 підтипу (mGlu5) та іонотропних АМРА-рецепторів глутамату можна передбачити низьку ймовірність активності на моделі судом індукованих MES [130].

4.7 Обговорення даних протисудомної активності сполуки-хіта на MES-моделі судом

На моделі електроіндукованих судом похідна **4.15** не чинила виразної активності (рис. 4.11). На тлі її введення достовірно зменшувалася лише тривалість судомного періоду і мала тенденцію до зменшення летальності до 33% щодо 50% у контрольній групі, поступаючись референс-препарату натрій вальпроату, який забезпечив 100% захист від летальності (рис. 4.11) [130].

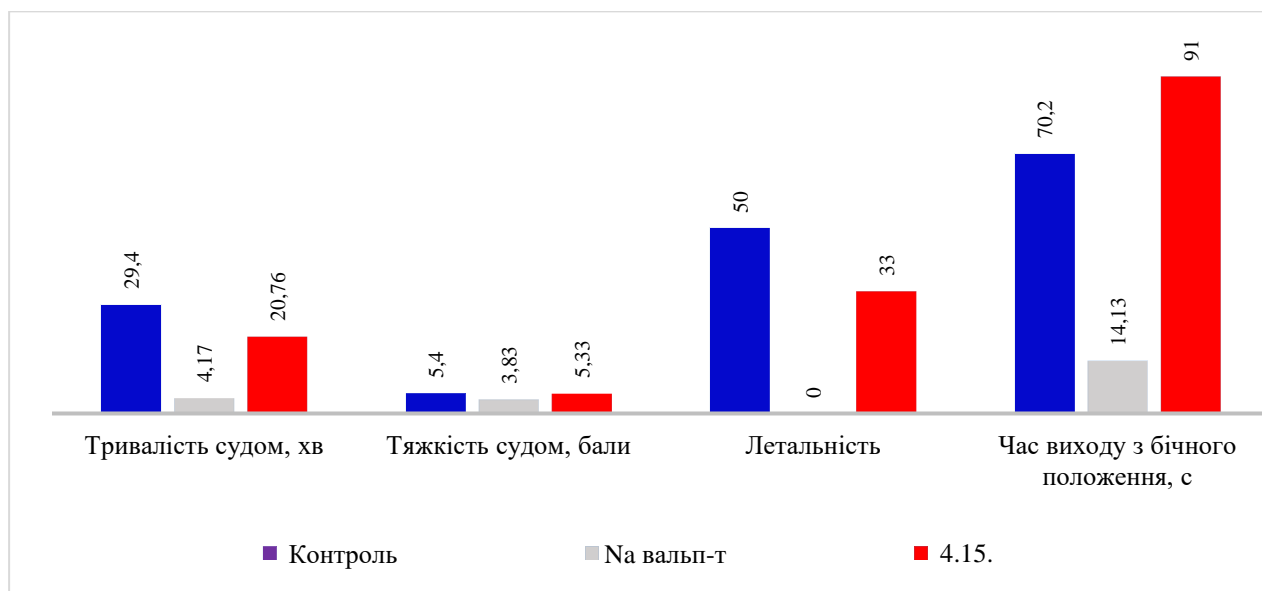


Рис. 4.11 Результати активності похідної **4.15** на моделі MES-судом

Одержані результати *in vivo* корелюють з *in silico* даними, а помірною ефективністю на моделі MES-індукованих судом вказує на малоїмовірну участь mGlu5 та AMPA-рецепторів глутамату, однак не виключає гальмівного впливу на натрієві канали як ланки механізму протисудомної дії.

#### *Експериментальна частина*

У роботі використовували реактиви виробництва Sigma-Aldrich, США. Необхідні реагенти очищали за стандартними методиками. Контроль реакцій здійснювали за допомогою ТШХ, елюент – етилацетат – гексан 1:2, на пластинках "Sorbfil UV-254". Проявлення хроматограм проводили в ультрафіолетовому світлі "Chromatographic UVF 254/365 Illuminator" (режим 254 нм). Температури плавлення визначали за допомогою приладу Kofler. Елементний аналіз проводили за методом Дюма (мікроаналізатор Euro Vector EA-3000, Eurovector SPA, Redavalle, Італія).  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектри записували

на спектрометрах Varian Gemini 400 МГц та 100 МГц. Розчинник використовували диметилсульфоксид (DMSO-d6). LC/MS спектри записували на рідинному хроматографі PE SCIEX API 150EX, оснащеному УФ-детектором ( $\lambda_{\max}$  215 і 254 нм) і з використанням колонки LunaC18, Phenomenex (100×4 мм). Елюювання починали з води й закінчували ацетонітрилом/водою (95:5, об/об), використовуючи лінійний градієнт зі швидкістю потоку 0,15 мл/хв і тривалістю циклу аналізу 25 хв.

*Метод А.* Методика синтезу (2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)оцтової кислоти (**4.3**)

Спосіб А [122]

До розчину 2-(бензилоксикарбоніламіно)бензойної кислоти (**4.1**) (0,200 г, 0,737 ммоль), N,N-диізопропілетиламіну (0,26 мл, 1,474 ммоль), 2-(бензотріазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламініум тетрафлуороборату (0,236 г, 0,737 ммоль), 1-гідрокси-1H-бензотріазолу (0,100 г, 0,737 ммоль) в 8 мл ацетонітрилу додавали гідрохлорид метилгліцинату (0,110 г, 0,737 ммоль). Суміш перемішували за кімнатної температури впродовж 4 годин. Потім розчин концентрували у вакуумі та очищали за допомогою колонкової хроматографії (SiO<sub>2</sub>, дихлорметан/метанол, 60:1). Вихід метил 2-[[2-(бензилоксикарбоніламіно)бензоїл]аміно]ацетату (**4.2**) склав 0,14 г (58%). Тпл.  $89,0 \pm 90,0$  °C.

Далі до розчину метилового ефіру **4.2** (0,115 г, 0,336 ммоль) в 4 мл метанолу додавали 9 мл 1 М розчину натрій гідроксиду, суміш перемішували впродовж 70 годин, додавали 1М розчин кислоти хлористоводневої до рН 2 - 3. Розчинник випарювали, додавали суміш дихлорметан/метанол (30 : 1) і шари розділяли. Водний шар промивали діетиловим етером, органічний шар об'єднували та висушували (MgSO<sub>4</sub>) і концентрували у вакуумі. Вихід цільової кислоти **4.3** 0,07 г (95%).

*Метод Б* [124].

0,178 г (1 ммоль) Метил 2-ізоціанатбензоату (**4.4**) додавали до розчину 0,11 г (1,5 ммоль) гліцину (**3.2**) у суміші води/діоксану (20 мл, 1:1) та натрій

гідроксиду (1 М, 10 мл). Суміш перемішували при 50°C протягом 4 годин. Компоненти випарювали у вакуумі, до твердого залишку додавали воду і підкислювали хлористоводневою кислотою до рН 3. Осад, що виділився, відфільтрували та сушили. Кристалізували з метанолу. Вихід 0,12 г (58%). Т пл. 299-301°C.

Т пл. 298-301°C . <sup>1</sup>H ЯМР (DMSO): 13,22 (уш. с, COOH); 11,56 (с, NH); 7,94 (дд, 1H, *J* = 8,3, 1,4, Ar-H); 7,70 (т, 1H, *J*=7,4, 1,5, Ar-H); 7,27 -7,21 (м, 2H, Ar-H), 4,56 (с, CH<sub>2</sub>) [122].

#### *Спосіб В.*

До розчину 11,99 г (0,3 моль) натрій гідроксиду в 400 мл води за температури 50 °С і перемішуванні додають 23,62 г (0,1 моль) 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**) до розчинення субстанції. Далі за інтенсивного перемішування та температури 5 °С обережно краплями або невеликими порціями по 5 мл додають 35 мл 50% гідрогену пероксиду (1 моль розведеного водою 1:1), слідкуючи, щоб температура реакційної суміші не перевищувала 70 °С. Перемішують протягом 30 хв. Після охолодження до кімнатної температури додають 9 мл оцтової кислоти. Осад, що утворився, відфільтровують, промивають 100 мл води. Перекристалізують із суміші 50 мл ДМФА та 200 мл етанолу. Вихід 19,8 г (90%). Т пл. 299-301°C.

#### *Загальна методика синтезу 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-ацетамідів*

До суспензії 22,0 г (0,1 моль) (2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти в 200 мл безводного діоксану додають 19,45 г (0,12 моль) *N,N'*-карбонілдіімідазолу. Суміш кип'ятять протягом 2-4 годин, контролюючи реакцію за допомогою тонкошарової хроматографії, елюент – етилацетат – гексан 1:2. Після завершення реакції додають (0,12 моль) відповідного аміну і кип'ятять ще 2 години, контролюючи проходження ТШХ, елюент - етилацетат-гексан 1 : 2. Після охолодження додають 500 мл води. Осад, що утворився, відфільтровують, промивають 50 мл 2-пропанолу і перекристалізують із суміші 50 мл ДМФ і 200 мл 2-пропанолу.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-метилацетамід (4.6)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 2,6 (д, 3H,  $J = 6,4$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ), 5,0 (с, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 7,32 (т, 1H,  $J = 6$  Ar-H), 7,4 (д, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,73 (т, 1H,  $J = 6,1$ , Ar-H), 7,92 (д, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 7,96 (т, 1H,  $J = 4,2$ ,  $-\text{CONH}$ ), 12,95 (с, 1H, NH хіназ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 167,09, 161,89, 150,12, 139,56, 135,08, 127,40, 122,55, 115,19, 113,86, 42,64, 25,53.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-етилацетамід (4.7)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 1,00 (т, 3H,  $J = 8,2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,05 (квін, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,45 (с, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 7,19 (т, 2H,  $J = 9,3$ , Ar-H), 7,65 (т, 1H,  $J = 8,2$  Ar-H), 7,9 (д, 1H,  $J = 9,3$ , Ar-H), 8,03 (т, 1H,  $J = 6,4$ ,  $-\text{CONH}$ ), 11,5 (с, 1H, NH хіназ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,29, 161,89, 150,11, 139,53, 135,06, 127,40, 122,53, 115,19, 113,83, 42,58, 33,35, 14,71.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-пропілацетамід (4.8)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 0,8 (т, 3H,  $J = 9,3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,35 (кв, 2H,  $J = 6,4$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,0 (кв, 2H,  $J = 2,6$ ,  $-\text{NHCH}_2$ ), 4,45 (с, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7,18 (т, 2H,  $J = 7,2$ , Ar-H), 7,63 (т, 1H,  $J = 7,2$ , Ar-H), 7,9 (д, 1H,  $J = 7$ , Ar-H), 8,05 (т, 1H,  $J = 4,2$ ,  $-\text{CONH}$ ), 11,4 (с, 1H, NH хіназ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,48, 161,87, 150,15, 138,54, 135,07, 127,42, 122,53, 115,18, 111,83, 42,58, 38,75, 22,36, 11,37.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-бутилацетамід (4.9)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 0,8 (т, 3H,  $J = 8,0$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,15-1,4 (м, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,0 (кв, 2H,  $J = 6,4$ ,  $-\text{NHCH}_2$ ), 4,41 (с, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7,18 (т, 2H,  $J = 8,0$  Ar-H), 7,65 (т, 1H,  $J = 7,6$ , Ar-H), 7,89 (д, 1H,  $J = 7,6$ , Ar-H), 8,0 (т, 1H,  $J = 5,0$ ,  $-\text{CONH}$ ), 11,4 (с, 1H, NH хіназ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,41, 161,87, 150,11, 139,54, 135,08, 127,42, 122,54, 115,20, 113,84, 42,52, 38,33, 31,24, 19,51, 13,69.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-ізобутилацетамід (4.10)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 0,8 (д, 6H,  $J = 6,4$ ,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 1,6-1,7 (м, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2,85 (т, 2H,  $J = 6,4$ ,  $-\text{NHCH}_2$ ), 4,45 (с, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7,19-7,22 (м, 2H, Ar-H), 7,63 (т, 1H,  $J = 6,2$ , Ar-H), 7,88 (д, 1H,  $J = 6,2$ , Ar-H), 8,05 (т, 1H,  $J = 4$

CONH), 11,4 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,55, 161,87, 150,12, 139,55, 135,07, 127,42, 122,55, 115,19, 113,85, 46,16, 42,58, 28,13, 20,10.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-(проп-2-ен-1-іл)ацетамід (4.11)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 3,65 (т, 2H,  $J = 5,0$ , -NHCH $_2$ ), 4,48 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 5,05 та 5,13 (дд, 2H,  $J = 12,1$  та  $J = 16,1$  -CH=CH $_2$ -), 5,68-5,82 (м, 1H, -CH=CH $_2$ -), 7,18 (т, 2H,  $J = 10,2$  Ar-H), 7,65 (т, 1H,  $J = 10,1$  Ar-H), 7,9 (д, 1H,  $J = 10,2$  Ar-H), 8,25 (т, 1H,  $J = 4,2$  CONH), 11,4 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,54, 161,92, 150,12, 139,55, 135,09, 127,42, 122,55, 115,20, 115,12, 113,87, 42,63, 40,92.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-циклогексилацетамід (4.12)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 1,0-1,25 (м, 5H, циклогекс.), 1,52 (д, 1H,  $J = 13,3$ , циклогекс.), 1,69-1,82 (м, 4H, циклогекс.), 3,4-3,55 (м, 1H, -CH- циклогекс.), 4,45 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,19 (т, 2H,  $J = 8,0$  Ar-H), 7,64 (т, 1H,  $J = 8,0$ , CONH), 7,91 (т, 2H,  $J = 10,0$  Ar-H), 11,4 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 165,48, 161,83, 150,10, 139,50, 135,09, 127,42, 122,56, 115,19, 113,77, 47,80, 42,48, 32,47, 25,25, 24,57.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-бензилацетамід (4.13)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 4,25 (д, 2H,  $J = 5,7$ , -NHCH $_2$ ), 4,5 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,15-7,32 (м, 7H, Ar-H), 7,64 (т, 1H,  $J = 10,2$  Ar-H), 7,9 (д, 1H,  $J = 10,2$  Ar-H), 8,59 (т, 1H,  $J = 8,0$  -CONH), 11,5 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,85, 161,95, 150,15, 139,57, 139,28, 135,11, 128,27, 127,44, 127,11, 126,77, 122,56, 115,21, 113,89, 42,74, 42,12.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(4-хлорофеніл)метил]-ацетамід (4.14)*

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 4,3 (д, 2H,  $J = 5,1$ , -NHCH $_2$ ), 5,05 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,26 (д, 2H,  $J = 8,9$ , Ar-H), 7,34 (д, 3H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,4 (д, 1H,  $J = 8,9$ , Ar-H), 7,73 (т, 1H,  $J = 8,0$  Ar-H), 7,94 (д, 1H,  $J = 8,0$  Ar-H), 8,6 (т, 1H,  $J = 5$ , -CONH), 12,95 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 167,03, 161,95, 150,15, 139,56, 138,38, 135,09, 131,37, 128,96, 128,19, 127,43, 122,56, 115,22, 113,87, 42,78, 41,49.



2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (4.15).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 4,3 (д, 2H,  $J = 6,4$ , -NH-CH $_2$ ), 5,2 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,19 (т, 2H,  $J = 8,2$  Ar-H), 7,40-7,35 (м, 2H, Ar-H), 7,58 (с, 1H, Ar-H), 7,75 (т, 1H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,95 (д, 1H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 8,65 (т, 1H,  $J = 4,8$ , -CONH), 12,95 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 167,27, 161,96, 150,15, 139,55, 135,44, 135,17, 132,86, 132,26, 130,05, 128,56, 127,45, 127,28, 122,61, 115,24, 113,84, 42,75, 41,93.

2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2-метокифеніл)метил]-ацетамід (4.16).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 3,7 (с, 3H, -OCH $_3$ ), 4,2 (д, 2H,  $J = 6,4$ , -NHCH $_2$ ), 5,05 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,17 (д, 2H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,34 (т, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,4 (д, 1H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,74 (т, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,95 (д, 1H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 8,5 (т, 1H,  $J = 6,0$ , -CONH-), 12,95 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,91, 161,95, 156,60, 150,17, 139,56, 135,09, 128,03, 127,62, 127,43, 126,61, 122,55, 120,13, 115,20, 113,87, 110,43, 55,34, 42,72, 37,24.

2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-фенілетилацетамід (4.17).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 2,7 (т, 2H,  $J = 8$ , -CH $_2$ C $_6$ H $_5$ ), 3,25 (с, 2H, -NHCH $_2$ ), 4,45 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,15-7,32 (м, 7H, Ar-H), 7,65 (т, 1H,  $J = 8$ , Ar-H), 7,92 (д, 1H,  $J = 8$ , Ar-H), 8,19 (т, 1H,  $J = 5,3$ , -CONH), 11,5 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,69, 161,88, 150,12, 139,55, 139,44, 135,24, 128,68, 128,34, 127,42, 126,10, 122,70, 122,53, 115,29, 113,83, 42,63, 41,73, 35,16.

2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-фенілпропілацетамід (4.18).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 1,7 (квін, 2H, -CH $_2$ C $_6$ H $_5$ ), 2,45-2,6 (м, 2H, -CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ ), 3,04 (кв, 2H,  $J = 5,3$ , -NHCH $_2$ ), 5,0 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,1-7,2 (м, 3H, Ar-H), 7,25 (т, 2H,  $J = 9,3$  Ar-H), 7,33 (т, 1H,  $J = 9,3$  Ar-H), 7,39 (д, 1H,  $J = 10,6$ , Ar-H), 7,73 (т, 1H,  $J = 10,6$ , Ar-H), 7,94 (д, 1H,  $J = 10,6$ , Ar-H), 8,08 (т, 1H,  $J = 6,4$ , -CONH), 12,95 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 166,61, 161,90, 150,13, 141,77, 139,55, 135,06, 128,32, 128,27, 127,41, 125,72, 122,62, 122,53, 115,20, 113,85, 42,67, 38,28, 32,45, 30,96.

2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-фенілацетамід (4.19).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 5,27 (с, 2H, -CH $_2$ CO), 7,02 (т, 1H,  $J = 8$ , Ar-H), 7,29 (т, 2H,  $J =$

8,2, Ar-H), 7,35 (т, 1H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,43 (д, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,53 (д, 2H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,78 (т, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,96 (д, 1H,  $J = 8,0$  Ar-H), 8,45 (т, 1H,  $J = 6$ , -CONH), 11,55 (с, 1H, NH хіназ.).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 165,45, 161,90, 150,13, 139,52, 138,82, 135,29, 128,72, 127,71, 127,48, 126,23, 122,74, 115,31, 113,69, 43,12.

*2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-(4-метоксифеніл)ацетамід (4.20).*  
 $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 3,75 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,75 (с, 2H, -CH<sub>2</sub>CO), 6,43 (д, 2H,  $J = 8$  Ar-H), 6,66 (д, 2H,  $J = 8$ , Ar-H), 7,28 (т, 2H,  $J = 8$ , Ar-H), 7,75 (т, 1H,  $J = 6$ , -CONH), 7,96 (д, 1H,  $J = 8$  Ar-H), 11,55 (с, 1H, NH хіназ.).

#### *Докінгові дослідження*

Комп'ютерні програми, які використані для молекулярного докінгу "сполуки-лідера" в метаботропні та іонотропні рецептори глутамату описані в експериментальній частині 2 розділу. Валідацію використаної методології докінгу виконували редокінгом нативного ліганду та зіставлення його конформаційного розміщення з експериментально визначеним, розраховуючи значення середньоквадратичного відхилення (RMSD), яке було  $< 2 \text{ \AA}$ . Обчислення RMSD проведено з використанням онлайн ресурсу ProFit Results. Координати грід-боксу: mGluR5 (PDB ID 6FFI):  $x = -24,14$ ,  $y = -5,28$ ,  $z = 42,63$ , розмір  $x = 20$ ,  $y = 24$ ,  $z = 22$ ; AMPAR (PDB ID 5L1F):  $x = -34,85$ ,  $y = -6,07$ ,  $z = -39,15$ , розмір  $x = 32$ ,  $y = 30$ ,  $z = 26$ .

#### *Фармакологічні дослідження*

Дослідження проводили на кафедрі фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету за консультативної підтримки д.м.н., проф. С. Ю. Штриголя.

#### *Протисудомна активність на PTZ-моделі судом*

Скринінг десяти сполук на протисудомну активність проводили на базовій моделі PTZ-індукованих судом у мишей згідно з міжнародними рекомендаціями [121]. Експерименти з тваринами проводили згідно з міжнародними правилами – Директивою 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради Європейського Союзу від 22 вересня 2010 року щодо охорони тварин, які використовуються в

наукових цілях. Детальна методика визначення, кількість груп та тварин у групі, характеристика показників для оцінки захисного протисудомного потенціалу сполук описана в статті [125]. Як конвульсант використано – PTZ ("Sigma", США) у дозі 90 мг/кг підшкірно у вигляді водного розчину, як референс-препарат – натрій вальпроат ("Депакін", Sanofi-Aventis, Франція) у дозі 300 мг/кг через зонд у шлунок за 30 хв до введення PTZ; досліджувані сполуки **3.7-3.24** в дозі 100 мг/кг через зонд інтрагастрально у вигляді суспензії в твіні-80 за 30 хв перед ін'єкцією PTZ. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми "STATISTICA 8.0" Windows.

#### *Тест стрижню, який обертається*

У тесті стрижня, що обертається, проводили оцінку здатності позначатися на м'язовому тонусі та координацію рухів піддослідних тварин на тлі введення експериментальних речовин **4.8, 4.15, 4.18, 4.19**. Протягом 5 хв реєстрували кількість мишей, які через певні інтервали часу впали зі стрижня, який обертається зі швидкістю 10 обертів/хв [121, 135]. Як контроль використані інтактні миші, як референс препарат – натрій вальпроату (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція) у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково за 30 хв до тесту, досліджувані сполуки вводили в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково у вигляді суспензії на твіні-80 за 30 хв до початку тесту. Визначали кількість мишей, які впали з обертового стрижня за проміжок часу.

#### *Гостра токсичність «сполуки-лідера» 4.15.*

Для визначення гострої токсичності за експрес-методом Т. Пастушенко [136] сполуку-лідера у вигляді суспензії на твіні-80 вводили мишам у шлунок 3 тваринам одноразово в широкому діапазоні доз (1000, 3000, 5000 мг/кг, що відповідно в 10, 30 та 50 разів перевищують ЕД<sub>50</sub>). Об'єм суспензії становив 40 мл/кг, що відповідає 0,8 мл на одну мишу вагою 20 г. За тваринами спостерігали протягом 14 днів, оцінюючи їхню поведінку.

#### *Модель судом, індукованих максимальним електрошоком*

Електричні напади судом індукували за допомогою приладу Ugo-Basile EST Unit 57800 (Італія). Піддослідних мишей піддавали впливу струму силою 50 мА та частотою 50 Гц протягом 0,2 с за допомоги корнеальних електродів [137]. Дозу у 100 мг/кг досліджуваної похідної **4.15** вводили внутрішньошлунково за 30 хв до моделювання MES. Препарат порівняння – натрій вальпроат (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція) у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково. Натрій вальпроат та субстанцію **4.15** вводили в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла [130].

#### Висновки до розділу 4

1. Апробовано різні підходи та розроблено новий препаративний підхід до синтезу білдинг-блоку дослідження – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**4.3**), який одержано окисненням гідрогену пероксидом при 70 °С раніше синтезованої 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти (**3.3**).
2. Синтезовано нові неописані похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміди (**4.6-4.20**) шляхом амідування 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти відповідними алкіл-, аліл- та ариламинами в безводному діоксані в присутності *N,N'*-карбонілдіімідазолу.
3. Будова та чистота синтезованих речовин підтверджена елементним аналізом, <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопією, LC/MS аналізом.
4. Здійснено фармакологічний скринінг десяти похідних на моделі PTZ-індукованих судом у мишей. Визначено чотири похідні з потужним протисудомним потенціалом, одна похідна **4.15** перевищувала за усіма показниками референс-препарат натрій вальпроат. Сформульовано деякі закономірності залежності структура-протисудомна активність, загалом похідні хіназолін-2,4-діону продемонстрували ліпші показники захисту від судом щодо їхніх 2-тіоксо-4-оксоаналогів.
5. Визначено 4 «сполуки-хіти» для яких означено відсутність міорелаксатної дії та негативного впливу на координацію рухів у тесті стрижня, що

обертається. За показниками фармакологічного профілю для подальших досліджень обрано 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідроквіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**).

6. Для «сполуки-лідера» **4.15** визначено показник гострої токсичності: LD50 склала >5000мг/кг і відповідно V клас токсичності за класифікацією Hodge і Sterner.
7. Молекулярним докінгом для «сполуки-лідера» **4.15** передбачено помірну афінність та незадовільне конформаційне розміщення в сайтах інгібіторів іонотропних AMPA- та метаботропних mGlu5 рецепторів глутамату, що корелює з результатами *in vivo* експерименту: визначено лише помірну активність похідної **4.15** щодо захисту від судом індукованих MES.

*Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:*

1. El Kayal W. M., Shtrygol S. Y., Zalevskyi S. V., Shark A. A., Tsyvunin V. V., Kovalenko S. M., Bunyatyan N. D., Perekhoda L. O., Severina H. I., Georgiyants V. A. Synthesis, *in vivo* and *in silico* anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2*H*)-yl)acetamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134-142. (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, експериментальних синтетичних досліджень, докінгових досліджень, аналіз результатів спектральних даних) (Q1, Web of Science, Scopus).
2. Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. Promising anticonvulsant *N*-[(2,4-dichlorophenyl) methyl]-2-(2,4-dioxo-1*H*-quinazolin-3-yl) acetamide: dose-dependent study and evaluation of anticonvulsant action spectrum *in vivo* and *in silico*. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2022. Vol. 71. P. 224–233. (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, проведення докінгових досліджень, підготовка статті до друку) (Q3, Scopus)
3. Ель Кайал В., Залевський С. В., Абу Шарк А. І., Штриголь С. Ю., Бур'ян Г. О., Цивунін В. В., Георгіянц В. А., Коваленко, С. М. Похідні 2-(2,4-Діоксо-

- 1,4-дигідро-2*H*-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію: пат. 137806 на корисну модель, №U 2019 03594 ; заявл. 08.04.2019 ; опубл. 11.11.19, Бюл. № 21. (Особистий внесок – брав участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту)
4. El Kayal W.Abu Sharkh A. I., Burian G. O. Perspectives of biologically active compounds creation in the range of (2,4-dioxo-(2-thio-4-oxo) -quinazolin-3-yl) acetic acid derivatives. *9th international conference of pharmacy science and practice 2018 : the book of abstracts of 50th Conference, Kaunas, Lithuania, November 9th, 2018. Kaunas, 2018. P. 52.*
  5. El Kayal W. M., Severina H. I. Synthesis of acetamide derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline as perspective anticonvulsants. *Science and modern pharmaceutical manufacturing : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, November 21, 2019, «Farmak» JSC, Ukraine; Укр. Мед. Часопис, 6 (134), Т. 2 – XI/XII 2019 с. 17–18.*
  6. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати : від дизайну молекули до клінічного застосування : мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7–10.*

## РОЗДІЛ 5

### МОДИФІКАЦІЯ СТРУКТУРИ 2-(2,4-ДІОКСО-1,4-ДИГІДРОХІАЗОЛІН-3(2*H*)-ІЛ)-N-[(2,4-ДИХЛОРОФЕНІЛ)МЕТИЛ]-АЦЕТАМІДУ, ПРОГНОЗУВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРА ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ

Синтезований 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**) має потужний протисудомний потенціал на моделі PTZ-судом у мишей, повністю захищаючи їх від судом та летальності, перевищуючи за усіма показниками референс-препарат натрій вальпроат. Похідна хіназоліну **4.15** має низьку токсичність та не виявляє міорелаксатної дії на піддослідних тварин у ротарод-тесті, однак виявила лише помірну активність на моделі судом, спричинених максимальним електрошоком. Опираючись на принципи фармакофорної моделі створення ПСЗ [138] було продовжено дослідження щодо модифікації структури сполуки-хіта для можливого покращення фармакологічного профілю.

#### 5.1 Модифікація структури 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду шляхом алкілування

Фармакофорність циклічної  $\text{NHC=O}$  групи як домену водневих зв'язків для можливої стабілізації конформації ліганду в активному сайті рецептора обговорювали неодноразово [139, 140]. З іншого боку, введення дистально розміщених гідрофобних доменів збільшує ліпофільність, силу та тривалість дії. У сучасних ПСЗ лакосаміді, ретигабіні й руфінаміді роль гідрофобного домена виконує бензильний замісник [138]. За літературними даними в структурі похідних хіназолінонів бензильний радикал також підвищував рівень протисудомної активності [59, 70]. І вже в представленому дослідженні у попередніх розділах роль бензильного радикала для поліпшення протисудомної активності стала очевидною. Тому для можливого покращення параметрів активності сполуки-лідера **4.15**, а також визначення ролі ендоциклічного

амідного фрагмента похідної **4.15** на прояв протисудомної дії сконструйовано його N-бензилзаміщені похідні (рис. 5.1).

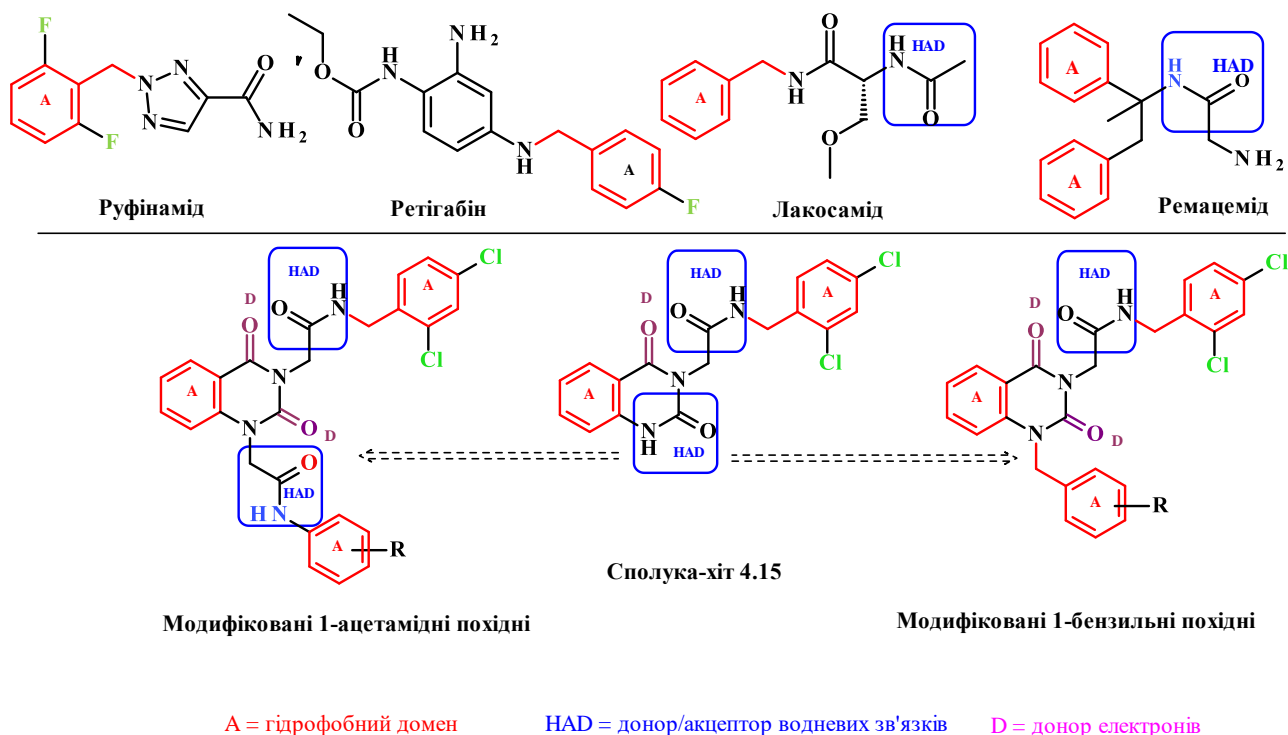


Рис. 5.1 Напрямок модифікації сполуки-хіта **4.15**

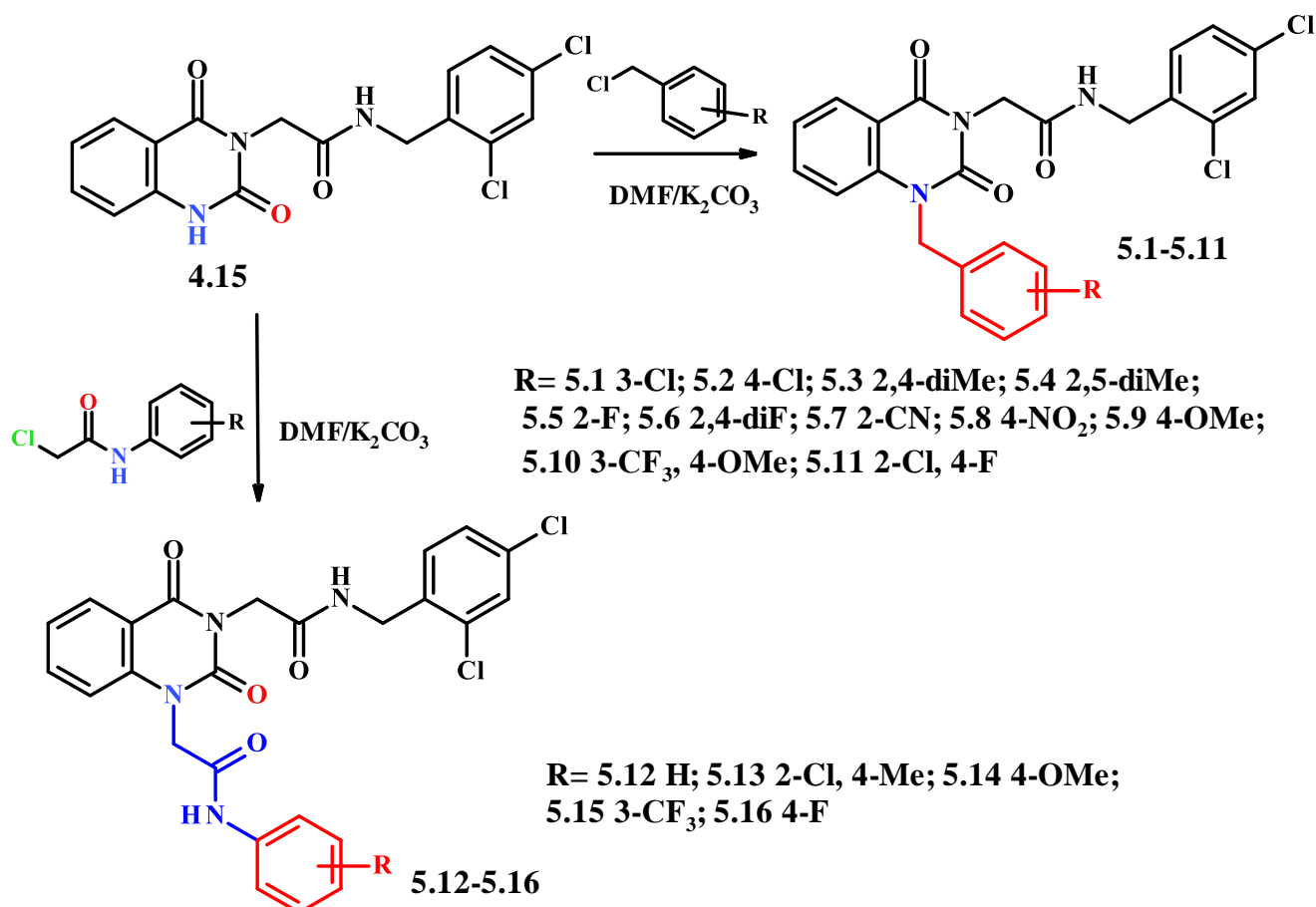
Також, було прийнято рішення ввести ще один арилацетамідний залишок у перше положення, який є конститутивним для створення дистальної зони для формування водневих зв'язків при фіксації у активному сайті рецептора. Ацетамідний залишок є складовою ремацеміду та лакосаміду – інноваційних ПЕП III покоління (рис. 5.1). Багаторазово обґрунтовувалася роль ацетамідного залишку у поліпшенні протисудомних властивостей нітрогеновмісних гетероциклічних похідних [141-143].

Вибір радикалів в арильному фрагменті базувався на літературних даних та власних результатах досліджень щодо впливу замісників на протисудомну активність [82, 120]. Введення атомів флуору в арильні фрагменти обумовлено наявністю їх у структурі сучасних антиконвульсантів – ретігабіну, руфінаміду, прогабіду та визначеною їх фармакофорністю.



Алкілювання N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)ацетаміду (**4.15**) проводили взаємодії з відповідним бензилхлоридом або 2-хлорацетанілідом у середовищі диметилформаміду в присутності надлишку калій карбонату при температурі 70-80 °С, тобто в традиційних умовах алкілювання [140, 144-146] (схема 5.1).

Схема 5.1



Синтезовані речовини **5.1-5.16** являють собою білі або світло-жовті кристалічні речовини з чіткими температурами плавлення (табл. 5.1), легко розчиняються в діоксані, диметилформаміді, диметилсульфоксиді, не розчиняються у воді.

Структура синтезованих сполук **5.1-5.16** та їх індивідуальність доведена методами ТШХ, LC/MS, <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії, елементним аналізом. Для сполук **5.1**, **5.7**, **5.10**, **5.15** структура додатково доводилася даними <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопії.

**Фізико-хімічні характеристики N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(1-заміщених-2,4-діоксохіназолін-3-іл)ацетаміду (5.1-5.16)**

№ п/п	Вихід %	Тпл. °С	Брутто-формула Мм	Виразувано, %			LC/MS m/z, [M+H]
				Знайдено, %	С	Н	
5.1	90	233-5	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 502,7	57,32	3,61	8,37	504,0
				57,30	3,59	8,38	
5.2	95	235-7	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 502,7	57,33	3,61	8,36	–
				57,29	3,59	8,39	
5.3	83	228-30	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 496,3	62,92	4,68	8,48	497,4
				62,85	4,65	8,51	
5.4	80	222-6	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 496,3	62,92	4,67	8,47	496,9
				62,86	4,65	8,49	
5.5	86	210-2	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 486,3	59,28	3,74	8,65	487,1
				59,23	3,71	8,67	
5.6	82	165-7	C <sub>24</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 504,3	57,17	3,40	8,34	505,1
				57,12	3,38	8,36	
5.7	88	230-2	C <sub>25</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> 493,3	60,88	3,69	11,37	493,3
				60,84	3,66	11,39	
5.8	80	288-90	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 513,3	56,16	3,54	10,92	513,0
				56,11	3,51	10,97	
5.9	93	226-8	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 498,3	60,26	4,25	8,43	498,5
				60,22	4,22	8,47	
5.10	88	217-9	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 516,3	58,15	3,90	8,15	516,2
				58,12	3,87	8,19	
5.11	82	232-4	C <sub>24</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>3</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 520,7	55,34	3,29	8,08	–
				55,30	3,26	8,10	
5.12	80	245-8	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 511,36	58,71	3,91	11,00	–
				58,49	3,88	11,02	
5.13	78	278-80	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 552,82	55,82	3,81	10,01	–
				55,62	3,79	10,05	
5.14	81	294-8	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 541,38	57,72	4,12	10,31	–
				57,68	4,09	10,37	
5.15	75	267-9	C <sub>26</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 579,35	53,91	3,32	9,71	580,1
				53,87	3,30	9,75	
5.16	77	271-3	C <sub>26</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 529,34	56,73	3,65	10,06	–
				56,69	3,63	10,09	

Хромато-мас-спектри на прикладі сполук **5.1, 5.3-5.10, 5.15** (табл. 5.1) демонструють, що в результаті реакції утворюються індивідуальні речовини, а маса квазімолярного іону відповідає зазначеній структурі (рис. 5.2).

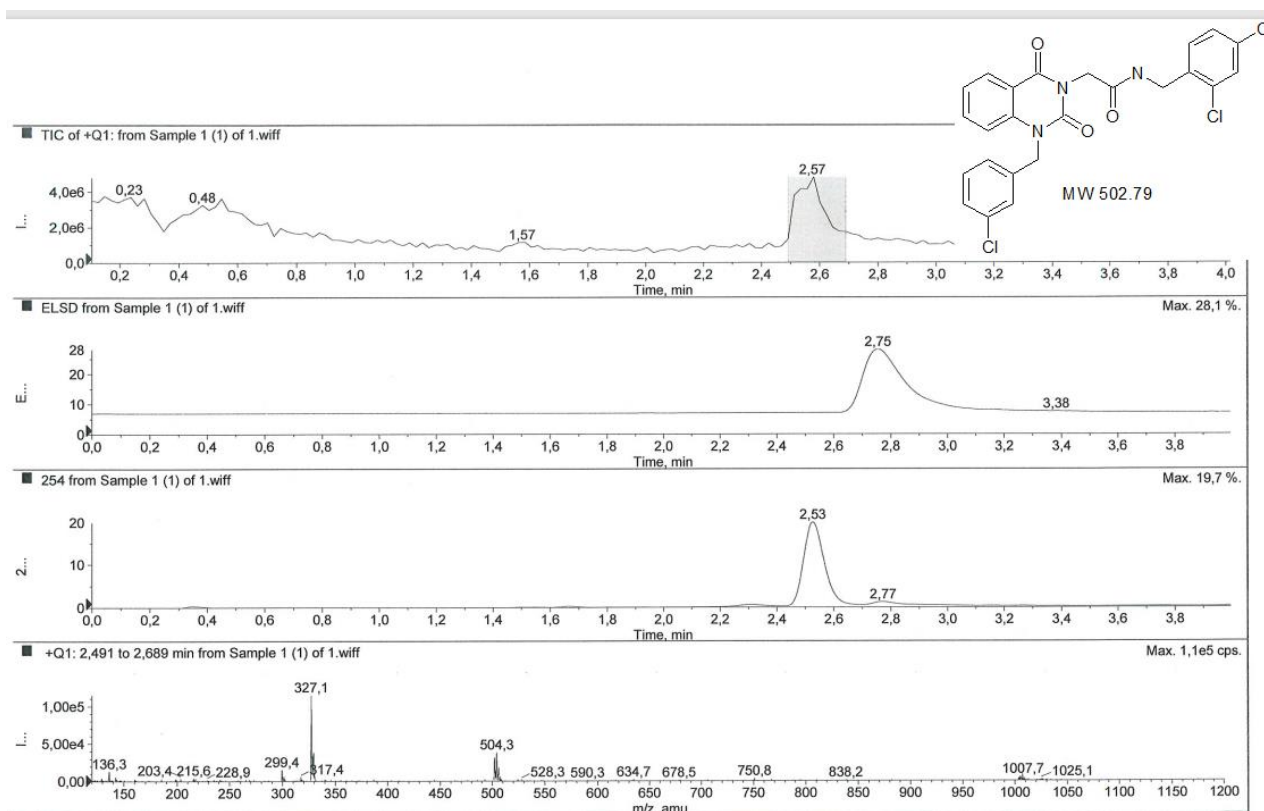


Рис. 5.2 LC/MS спектр 2-[1-[(3-хлорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетаміду (**5.1**)

На  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах присутні усі відповідні сигнали протонів (рис. 5.3). У порівнянні зі спектром вихідного ацетаміду **4.15** на спектрах усіх синтезованих сполук **5.1-5.11** характерним є поява протонів бензильного радикала – сигнал метиленової групи у вигляді синглету при 5,55-5,25 м.ч. та поява додаткових ароматичних протонів, а також відсутній сигнал NHCO групи хіназолінового циклу при 11,5 м.ч. Велика кількість ароматичних протонів у структурі сполук **5.1-5.11** приводить до накладання їх сигналів, що дещо ускладнює їх інтерпретацію з віднесенням до положення в циклі, однак їх кількість повністю відповідає структурі сполук. Сигнал протону групи NHCO бензіламідного залишку резонує у вигляді триплету на ділянці  $\delta$  8,82-9,72 м.ч., а метиленової групи – у вигляді дублета при 4,35-4,33 м.ч. Протони метиленової  $\text{CH}_2\text{CO}$ -групи сполук **5.1-5.11** виявляються синглетом на ділянці 4,71-4,68 м.ч. Фіксуються також сигнали метокси- та метильних груп у сполук **5.3**, **5.4** та **5.9**, **5.10**, відповідно.

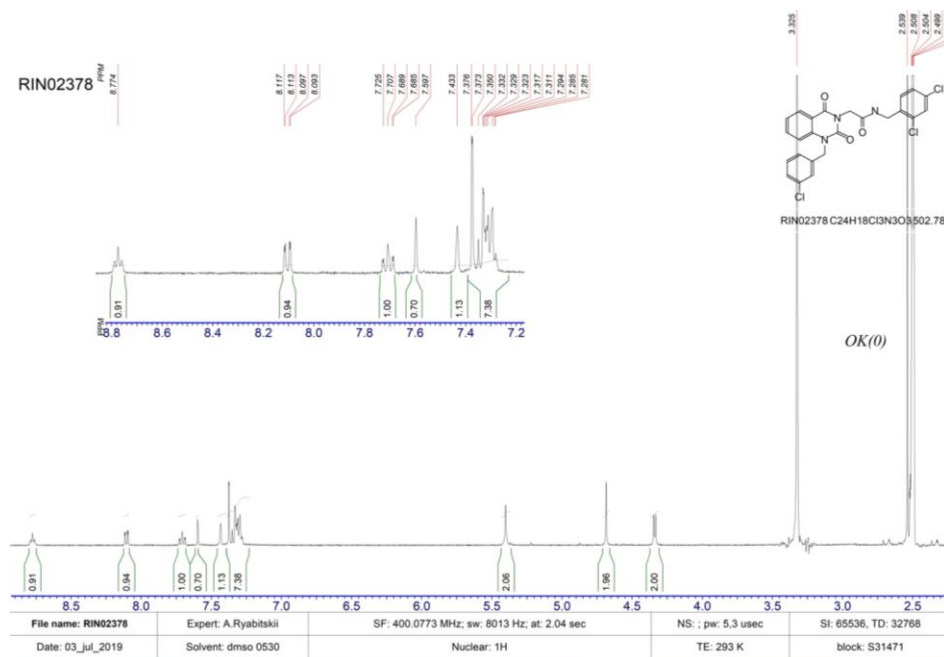


Рис. 5.3 <sup>1</sup>H ЯМР спектр 2-[1-[(3-хлорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетаміду (**5.1**)

Для похідних 1-ацетамідних похідних **5.12-5.16** характерним є поява додаткового сигналу протона групи NHCO, який резонує в області слабого поля 10,00-10,75. При цьому для флуорозаміщених в арильному кільці похідних (**5.15, 5.16**) спостерігається більш суттєве зміщення в область слабого поля. Фіксується поява додаткових двох протонних синглетних сигналів метиленової групи в 1 положенні хіназолінового циклу (CH<sub>2</sub>CO) при 5,01 м.ч. Сигнали ароматичних протонів як і у випадку 1-бензилзаміщених похідних **5.1-5.11** накладаються на залишок метиларильного радикалу, проте їх кількість повністю відповідає структурі сполук, що доводить успішність перебігу реакції алкілювання.

У спектрах <sup>13</sup>C ЯМР сполук **5.1, 5.7, 510** характерними можна вважати сигнали атомів карбону гетероциклічних (другий та четвертий атом хіназолінового циклу) та амідної карбонільної (C=O) груп – три чіткі сигнали на ділянці 167,17-150,88 м.ч. (рис. 5.4).

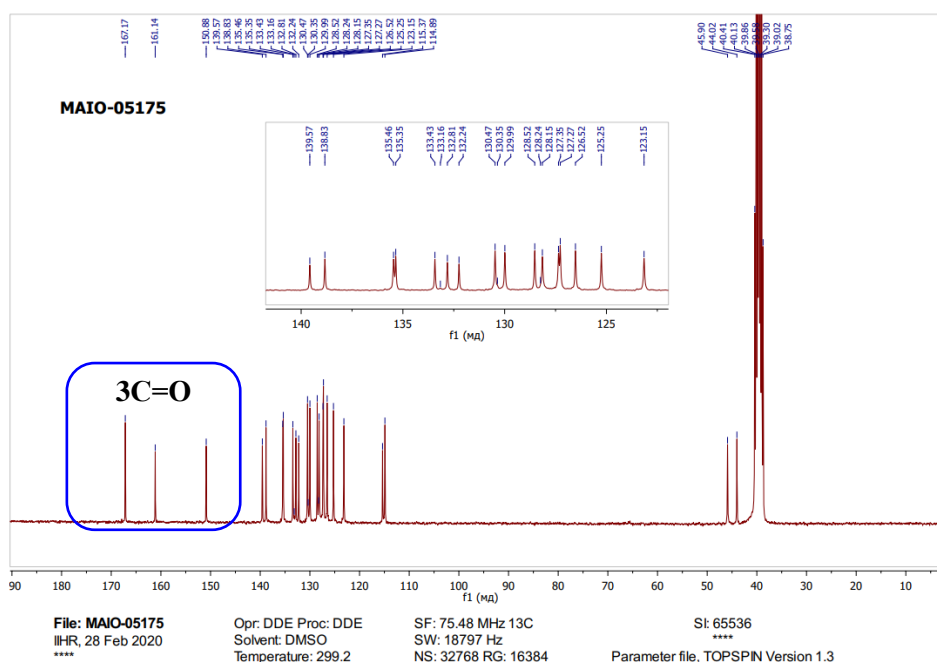


Рис. 5.4  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр 2-[1-[(3-хлорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетаміду (**5.1**)

Для 1-ацетамідного похідного **5.15** характерна поява ще одного сигналу карбону NHCO-групи при 166,91 м.ч. (рис. 5.5).

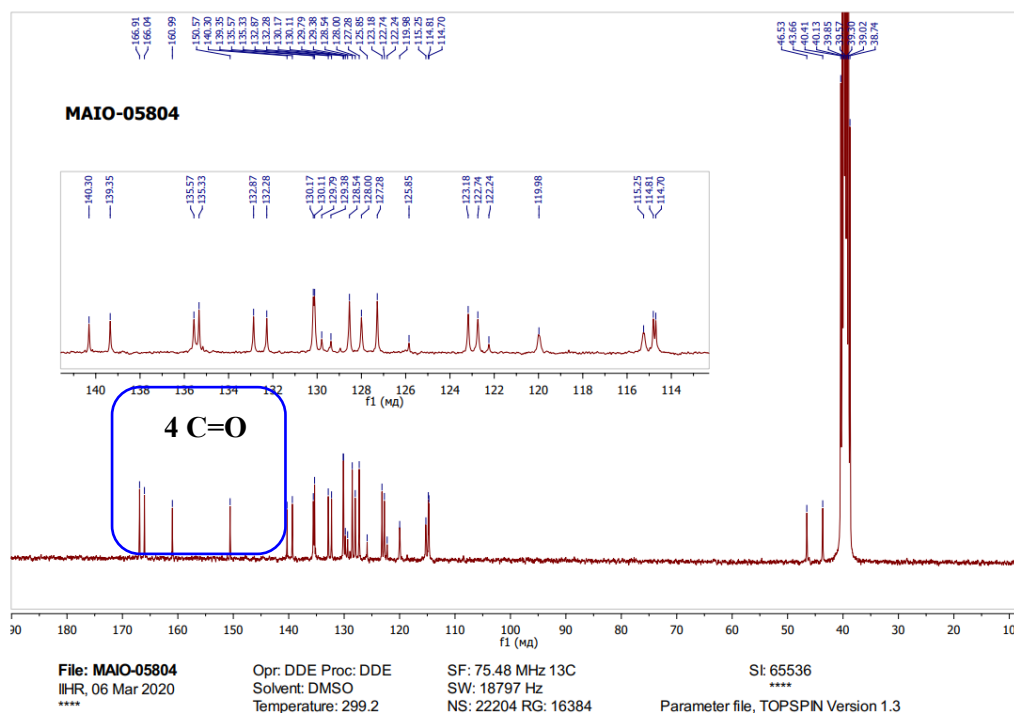


Рис. 5.5  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр N-((3-флуорометил)феніл)-2-(3-(2-((2,4-дихлорофеніл)метиламіно)-2-оксоетил)-2,4-діоксо-3,4-дигідрохіназолін-1(2H)-іл)ацетаміду (**5.15**)

Атоми карбону ароматичних фрагментів резонують у характерній області – 153,09-114,0 м.ч. та за кількістю відповідають структурі сполук. Чітко ідентифікуються атоми карбону аліфатичних метиленових груп:  $\text{CH}_2\text{CO}$  – 45,90-45,37 м.ч.,  $\text{CH}_2\text{Vn}$  – 44,02-43,94 м.ч.,  $\text{CH}_2\text{NH}$  – 39,86-39,80 м.ч. Карбон нітрильної групи сполуки **3.7** фіксується при 110,03 м.ч., а метоксигрупи сполуки **3.10** – 56,02 м.ч.

5.2 Молекулярний докінг 1-алкілованих похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду

Синтезовані **5.1-5.16** є аналогами сполуки **4.15**, яка виявила потужну активність на PTZ моделі судом, що свідчить про ГАМКергічний механізм протисудомної дії [97]. Тому відбір сполук-кандидатів для *in vivo* експерименту здійснювали за результатами докінгу в активний сайт позитивного алостеричного модулятора рецептора ГАМК<sub>A</sub> (PDB ID 4COF) [Miller], BDZ-сайт ГАМК<sub>A</sub> рецептора (PDB ID 6HUP) [90] та сайт інгібітора ензиму ГАМК<sub>AT</sub> (PDB ID 1OHW) [91]. Саме ці мішені наведені в уніфікованому алгоритмі пошуку нових ПСЗ з метою прогнозування їх активності на PTZ-моделі судом [71].

Здатність використаного алгоритму докінгу відтворювати експериментальні дані підтверджено оцінкою конформації та взаємодій з амінокислотними залишками нативних референс лігандів: бензамідину та діазепаму – агоністи ГАМК<sub>A</sub> та вігабатрину – інгібітора ГАМК<sub>AT</sub>. Кількісною характеристикою афінності стала енергія зв'язування (табл. 5.2). 3D візуалізація конформації референс- та досліджуваних лігандів на прикладі 4-метоксибензильної похідної **5.9** представлена на рис. 5.6-5.8. Енергії зв'язування усіх синтезованих лігандів **5.1-5.16** є значно вищими, ніж енергії зв'язування препаратів порівняння, що свідчить про помірну або низьку афінність до досліджуваних біомішеней. Найкращі скорингові функції до усіх біомішеней розраховано для 4-метоксибензильної похідної **5.9**: -7,5 проти -8,4 ккал/моль у бензамідину, -9,5 проти -9,9 ккал/моль у діазепаму при докінгу у ГАМК<sub>A</sub>, -6,9 проти -8,4 ккал/моль у вігабатрину при докінгу в ензим ГАМК<sub>AT</sub>.

Таблиця 5.2

Енергії зв'язування похідних 5.1-5.16 в активні сайти ГАМК<sub>A</sub> та ГАМК<sub>AT</sub>

Ліганд	Біомішень		
	ГАМК <sub>A</sub> сайт ПАМ	ГАМК <sub>A</sub> сайт ПАМ	ГАМК <sub>AT</sub> сайт інгібітора
Бензамідин	-8.4	–	–
Діазепам	–	-9.9	–
Вігабатрин	–	–	-8.5
5.1	-7.1	-8.5	-6.4
5.2	-6.9	-8.4	-6.5
5.3	-7.0	-8.0	-7.2
5.4	-6.9	-8.1	-7.4
5.5	-7.0	-8.2	-7.6
5.6	-7.1	-8.2	-7.4
5.7	-6.7	-7.8	-6.4
5.8	-6.8	-7.9	-6.6
<b>5.9</b>	<b>-7.5</b>	<b>-9.5</b>	<b>-6.9</b>
5.10	-7.3	-9.1	-7.4
5.11	-7.0	-9.0	-7.3
5.12	-6.9	-7.5	-6.5
5.13	-6.8	-7.6	-6.3
5.14	-6.9	-7.7	-6.3
5.15	-6.8	-7.5	-6.4
5.16	-6.7	-7.5	-6.5

Найгірші показники енергії зв'язування спрогнозовано для 4-нітро-(**5.8**) та 2-ціанобензилзаміщених (**5.7**) похідних, а також для усіх 1-арилацетамідних похідних **5.12-5.16**, що може бути пов'язане з занадто великим розміром молекул-лігандів та не спроможністю повністю зануритися в активні сайти.

Аналіз конформаційного розміщення лігандів **5.1-5.16** у активному сайті ГАМК<sub>A</sub> рецептора показав, що в усіх похідних занурення в кишеню відбувається 2,4-дихлоробензилацетамідним фрагментом (на прикладі ліганду **3.9** рис. 5.6а). Останній вступає у гідрофобну взаємодію із залишками тирозину (TYR62, 205) та фенілаланіну (Phe200), які в експерименті є магістральними для фіксації нативного бензамідину (рис. 5.6б) [89]. Піримідиновий фрагмент хіназоліну також взаємодіє з амінокислотами активного сайту, а от 1-бензильний та 1-арилацетамідний фрагменти фіксуються поза межами кишені, як і ароматичне

кільце хіназоліну. За результатами віртуального прогнозу стабільне існування таких конформацій та, відповідно, можливість позитивної алостеричної модуляції ГАМК<sub>A</sub> рецептора лігандами **5.1-5.16** є мало ймовірним [144].

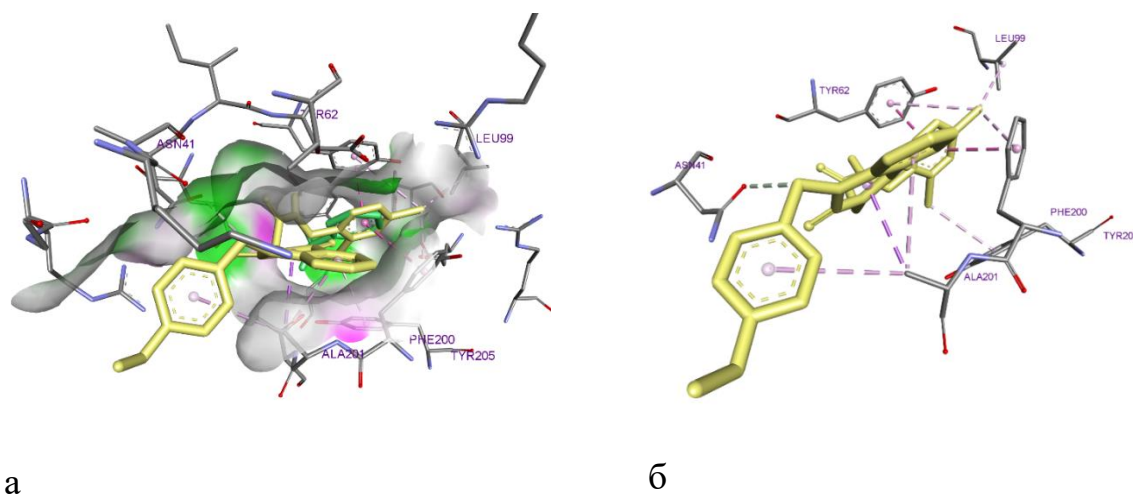


Рис. 5.6 3D візуалізація ліганду **5.9** (жовта молекула): а) з бензамідом (зелена молекула); б – при взаємодії з амінокислотами активного сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора

Очікувано найвищий рівень афінитету лігандів **5.1-5.16** розраховано до бенздіазепінового активного сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора, а саме -7,8 до -9,2 ккал/моль [90], хоча і поступався афінитету нативного діазепаму (-9,9 ккал/моль). Конформаційне розміщення в гідрофобній кишені активного сайту візуалізовано на рис. 5.7 а, б на прикладі похідної **5.9**. Фіксація в активному сайті відбувається внаслідок гідрофобних зв'язків з магістральними амінокислотними залишками, які в експерименті взаємодіють з діазепамом: хіназоліновий цикл фіксується гідрофобною взаємодією з тирозином Tyr210 (стекінг-взаємодія), Tyr160 та фенілаланіном Phe77; 2,4-дихлоробензилацетамідний фрагмент – проліном та гістидином (Pro140, His120). Щодо водневих зв'язків, то конформація стабілізується взаємодією ацетамідного та гетероциклічного карбонілу з імідазольною NH-групою гістидину (His102). Розміщення ж ключового фрагмента модифікації – 1-бензильного радикала – досить сумнівне, адже взаємодія відбувається з амінокислотами, які не формують активний сайт в експерименті – тирозином та серином (Tyr68, Ser205).



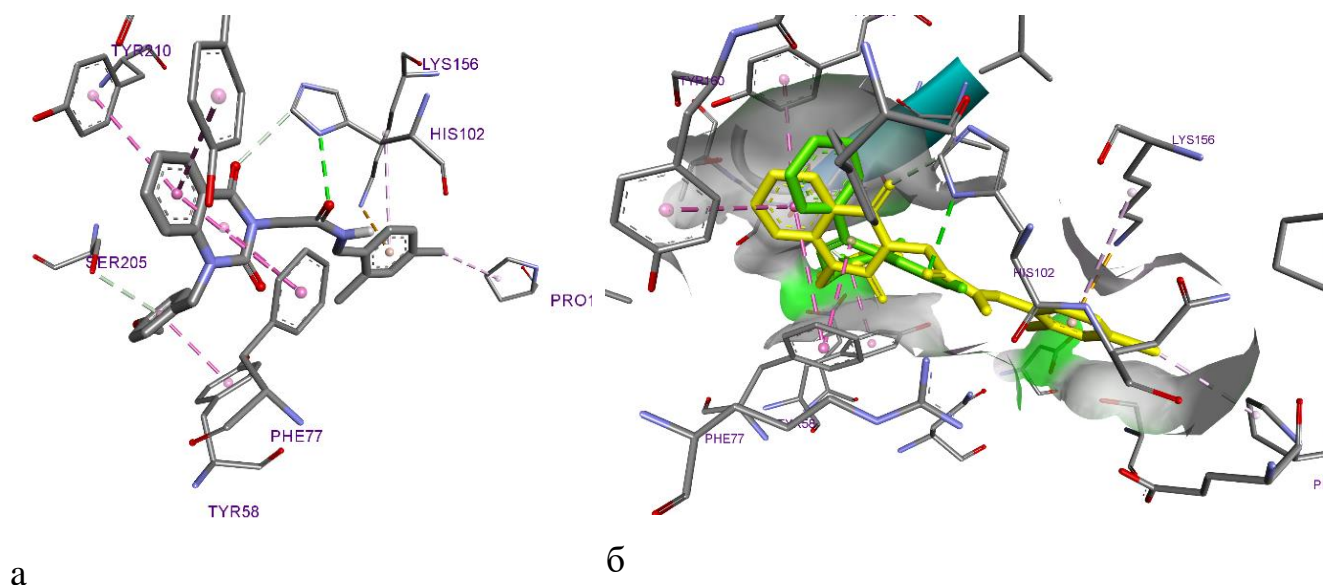


Рис. 5.7. а – взаємодія ліганду **5.9** з амінокислотами в BDZ-сайті ГАМК<sub>A</sub> рецептора; б – сумісна конформація діазепаму (зелений) та ліганду **5.9** (жовтий)

Аналогічна ситуація відмічається і для сполуки **5.12-5.16**: вихід з гідрофобної кишені арилацетамідного радикалу та взаємодія з тирозином та серином (Tyr68, Ser205).

При детальному аналізі положення лігандів **5.1-5.16** у активному сайті ГАМК<sub>AT</sub> слід відзначити, що у гідрофобну взаємодію з амінокислотами активного сайту – валіном (Val300), фенілаланіном (Phe189), аргініном (Arg192) вступає лише хіназоліновий фрагмент молекули лігандів (рис. 5.8 а, б). При одночасному розміщенні в активному сайті вігабатрину, піридоксаль-5-фосфату (PLP) – кофактор ГАМК<sub>AT</sub> та ліганду **5.9** (рис.5.8 б) очевидно, що молекула ліганду є завелика, а 2,4-дихлоробензиламідний фрагмент не спроможний зануритися у гідрофобну кишеню та фіксується поза її межами. До того ж розміщення 4-метоксибензильного радикалу відбувається на місці фіксації кофактора та перекривається з піримідиновим циклом PLP. Тому вплив на ГАМКергічні процеси лігандів **5.1-5.16** через інгібування ГАМК<sub>AT</sub> за результатами молекулярного докінгу можна вважати неможливим.

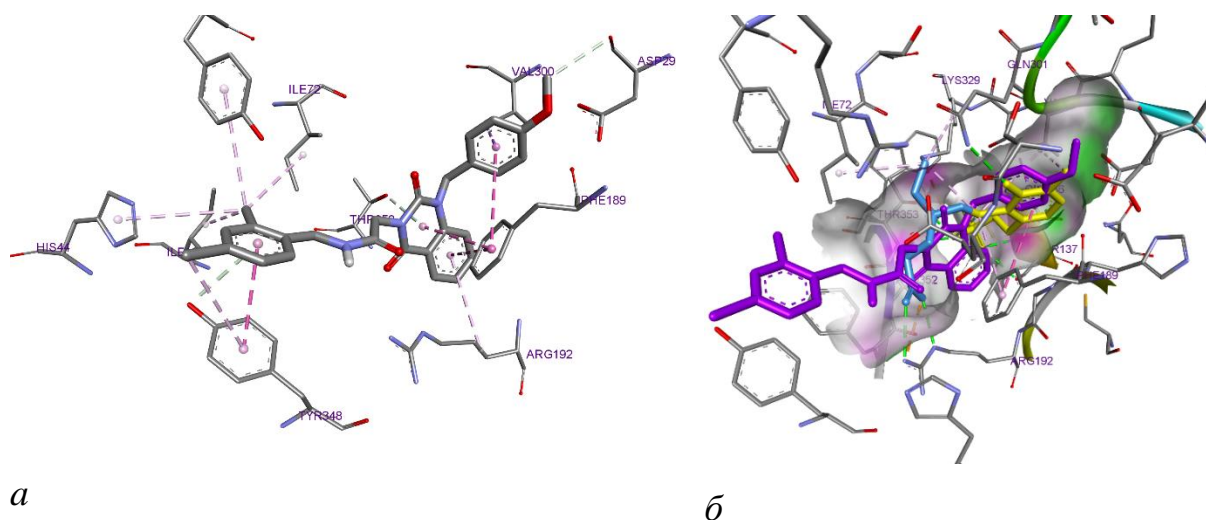


Рис. 5.8 3D конформація в активному сайті ГАМК<sub>АТ</sub>: *a* – ліганд **5.9** з амінокислотами; *б* – вігабатрин (блакитний), ліганд **5.9** (фіолетовий) and PLP (жовтий)

Зважаючи на неоднозначні показники молекулярного докінгу та збережену ймовірність впливу лише на BZD-сайт ГАМК<sub>А</sub> рецептору для тестового скринінгу на антиконвульсантну активність на PTZ-моделі обрано лише 7 сполук з 16 синтезованих, що продемонстрували відносно кращі результати докінгу: 5 речовин з 1-бензилзаміщених **5.1-5.11** та 2 – з 1-арилацетамідних похідних **5.12-5.16**.

### 5.3 Обговорення результатів скринінгу на PTZ-моделі судом 1-алкілованих похідних CC(=O)Nc1ccc(Cl)c(Cl)c1-N-[(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду

Аналіз результатів скринінгу на PTZ-моделі судом свідчить, що натрій вальпроат виявив типову антиконвульсантну дію, достовірно зменшуючи летальність до 50,0 %, частку тварин із клонічними та тонічними судомами – до 83 та 67 %, тяжкість нападів – у 1,43 раза і збільшуючи латентний період судом у більш як 6 разів (рис. 5.9) [144].

Жодна з досліджуваних сполук не чинила статистично значущу протисудомну дію за критерієм інтегрального захисного ефекту – зменшенням летальності щодо контролю (рис. 5.9). Три сполуки (**3.2**, **3.9**, **3.11**) виявили

тенденцію до зменшення летальності до 83 % проти 100 % у контролі, вони статистично значуще покращували по 1 показнику – час життя тварин до загибелі. На жаль усі синтезовані сполуки виявились індиферентними щодо PTZ судом та достовірно поступалися натрій вальпроату.

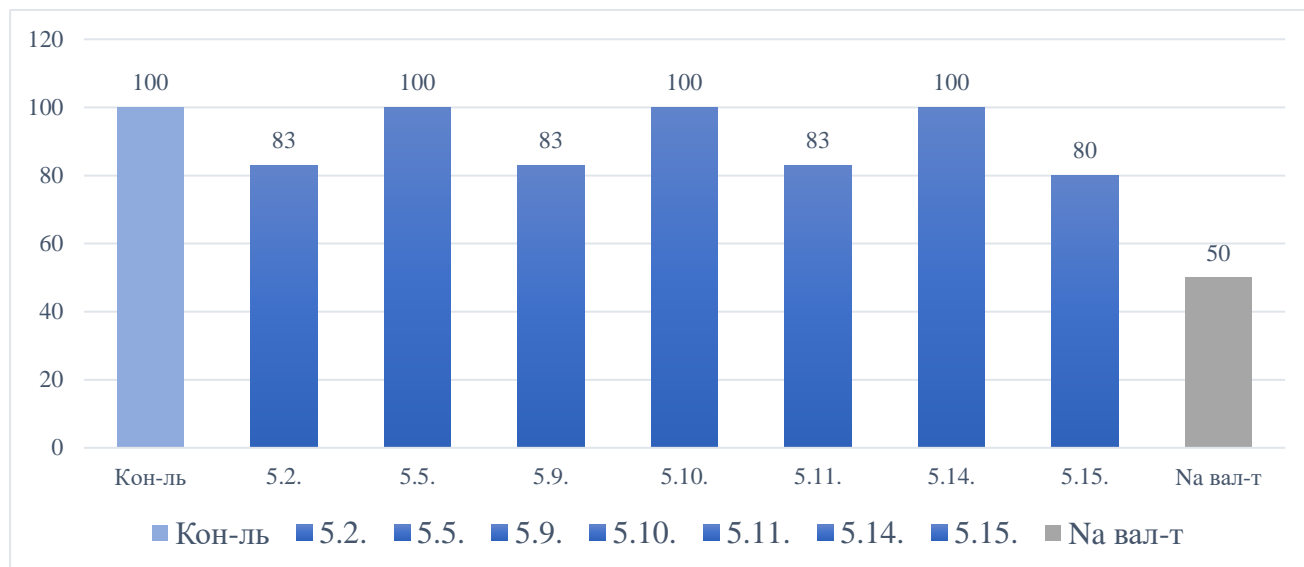


Рис. 5.9 Показники летальності на тлі введення 1-алкілованих похідних 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду (5.1-5.16)

Відтворення умов попереднього фармакологічного експерименту з вихідним 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамідом (4.15) дозволяє порівняти результати та обговорити закономірності впливу фрагментів молекули на протисудомну активність. Очевидною є повна втрата протисудомної активності 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамідом (4.15) при заміщенні 1 положення хіназолінового циклу бензильним та арилацетамідним радикалами за усіма показниками захисту від судом на PTZ моделі. Результати експериментів свідчать про недоцільність такої модифікації та ключову фармакофорну роль ендоециклічного амідного фрагменту у прояві активності сполуки 4.15, який виконує роль домену водневих зв'язків та, вірогідно, стабілізує конформацію ліганду в активному сайті ГАМКергічних

біомішеней додатковими водневими зв'язками. Окрім того, втрата активності може бути пов'язана і зі збільшенням молекулярної маси сполуки, що відповідно до правила Ліпінського має бути  $< 500$  [147].

Можна говорити про позитивну кореляцію між результатами *in vivo* досліджень на PTZ моделі судом та *in silico* дослідженнями, а саме значеннями енергії зв'язування і конформаційним розміщенням лігандів в активних сайтах ПАМ бензамідину та діазепаму у ГАМК<sub>A</sub> рецепторі та ензиму ГАМК<sub>AT</sub>. Одержані результати обґрунтовують доцільність таргет-орієнтованого віртуального скринінгу для раціоналізації фармакологічного скринінгу з метою збереження тварин.

Отже, за результатами комплексного дослідження фармакологічного профілю сполукою-лідером обрано 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**), оскільки подальше варіювання його структури не поліпшило показників активності.

#### 5.4 Прогнозування механізму та обговорення результатів активності «сполуки-лідера» на моделях хемоіндукованих судом

Для передбачення можливого механізму фармакологічної дії «сполуки-лідера» та прогнозування перспективності *in vivo* експерименту на моделях хемоіндукованих судом здійснено молекулярний докінг N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)ацетаміду (**4.15**) у активні сайти біомішеней окреслених в уніфікованому алгоритмі пошуку ПСЗ [71]. Молекулярний докінг проводили з використанням програмного пакету AutoDock Vina [103]. Валідацію використаних методологій докінгу для кожної макромолекули білку виконували процедурою редокінгу нативного референс-ліганда з наступним співставленням його конформаційного розміщення з експериментально визначеним та описаним в літературі положенням [104]. Значення середньоквадратичного відхилення (RMSD) між двома конформаціями не перевищували  $< 2 \text{ \AA}$ , що підтверджує відтворюваність експериментальних

даних та влідність методологій [94]. Кількісною оцінкою афінності до активного сайту рецептора або фермента стала енергія зв'язування (ккал/моль).

#### 5.4.1 Прогнозування ГАМКергічного механізму протисудомної дії «сполуки-лідера»

Раніше визначена ефективність N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)ацетаміду (**4.15**) на PTZ-моделі судом свідчить про можливу реалізацію протисудомної активності через ГАМКергічні механізми. Це пояснюється тим, що провідними напрямками проконвульсивної дії PTZ є зв'язування з двома активними сайтами ГАМК<sub>A</sub> рецепторного комплексу [147] – через пікротоксиновий сайт, що пригнічує роботу ГАМК<sub>A</sub> рецепторів шляхом закриття хлоридного каналу та зниження гіперполяризації коркових нейронів та через конкурентне зв'язування з бенздіазепіновим сайтом ГАМК<sub>A</sub> рецептора [95].

Для деталізації рецепторного впливу похідної хіназоліну **4.15** здійснено докінг в активні сайти ГАМКергічних біомішеней: сайти діазепаму [90] та бензамідину [89] – ПАМ ГАМК<sub>A</sub> рецептора; сайт вігабатрину – незворотного інгібітора ГАМК-амінотрансферази [91].

Сполука-лідер **4.15** продемонструвала рівень афінності до сайту ПАМ ГАМК<sub>A</sub> рецептора (4COF) на рівні препарату порівняння: -8,7 проти -8,5 ккал/моль у безамідину. Однак, візуалізація сумісної конформації двох лігандів (рис. 5.10 а) демонструє фіксацію ліганду лише на вході у гідрофобну кишеню за участю амінокислотних залишків, що не є експериментально визначеними (Ala201(2), Lys173\*, Asn41\*) як активний сайт. Афінність до BZD сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора (6HUP) було визначено ще на етапі віртуального скринінгу згенерованих структур: для хіназолін-2,4-діону **4.15** окреслено ліпшу афінність, ніж у препарату порівняння -10,6 проти -9,9 ккал/моль у діазепаму (табл. 5.3). Зафіксовано утворення зв'язків виключно з експериментально означеними пептидними залишками активного сайту та за участі магістральної для фіксації усіх клінічно значущий бенздіазепінів амінокислоти гістидину (His102).

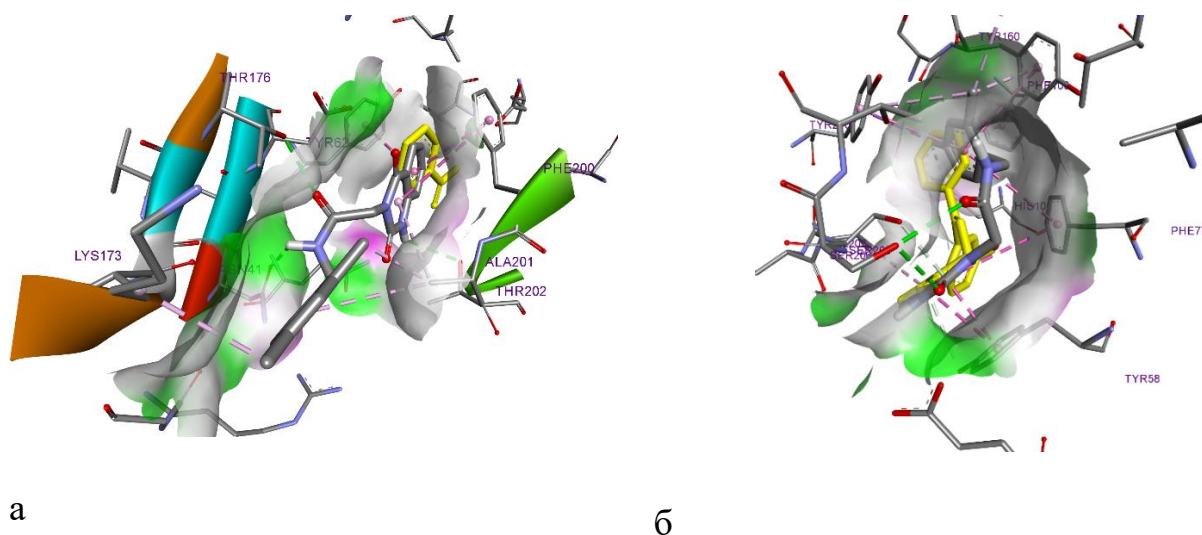


Рис. 5.10 Сумісна 3D конформація сполуки **4.15** (сіра молекула) в активному сайті ГАМК<sub>A</sub> рецептора з а) бензамідом та б) діазепамом (жовта молекули).

Стабілізація усіх фрагментів молекули (рис. 5.10 б), внаслідок гідрофобних зв'язків, зокрема стекінг-взаємодія хіназолінового циклу з гідроксифенільним фрагментом тирозину (Тур58) та тетраедрична сітка зв'язків дихлоробензильного фрагменту з тирозином (Тур210), свідчить про можливість утворення стійкої конформації та, відповідно, високу ймовірність алостеричної модуляції ГАМК<sub>A</sub> рецептору.

Таблиця. 5.3

### Результати докінгу сполуки-лідера **4.15** в активні сайти ГАМКергічних біомішеней

Мішень	Скоринго ва функція ккал/моль	Гідрофобна взаємодія	Водневі зв'язки	Інші	Референс ліганд, ккал/моль
ГАМК <sub>A</sub> сайт ПАМ	-8,7	Tyr62, Phe200(2), Ala201(2)*, Lys173*	Thr176, Thr202, Asn41*	—	-8,5 бензамідин
ГАМК <sub>A</sub> сайт БЗД	-10,6	Phe77 (3), Phe100, His102	Tyr58, His102 (2), Arg60, Ser205	—	-9,9 діазепам
ГАМК <sub>AT</sub>	-10,1	Val300, Tyr348(2)*, Phe189(2), Phe351(2)	Arg192, Thr353, Asn352	Lys329, Glu270	-8,4 вігабатрин

Результатом докінгу ліганду **4.15** в активний сайт селективного інгібітора ензиму ГАМК<sub>АТ</sub> (1ОНW) [91] став високий рівень афінитету: енергія зв'язування склала -10,1 щодо -8,4 ккал /моль у референс-вігабатрину. Однак, глибоке повздовжнє розміщення у гідрофобній кишені унеможлиблюється, оскільки досягає місця фіксації кофактора ферменту – піридоксаль-5-фосфатом (PLP) та перекривається з ним (рис. 5.11). Тому, реалізація протисудомного ефекту через інгібування ГАМК<sub>АТ</sub> є малоімовірним.

Отже, результати конформаційного аналізу розміщення похідної хіназоліну **4.15** в ГАМКергічних біомішенях та фармакологічного скринінгу на RTZ-моделі дозволяють схарактеризувати найімовірніший механізм реалізації протисудомного ефекту через позитивну алостеричну модуляцію BZD сайту ГАМК<sub>А</sub> рецептора [95, 130].

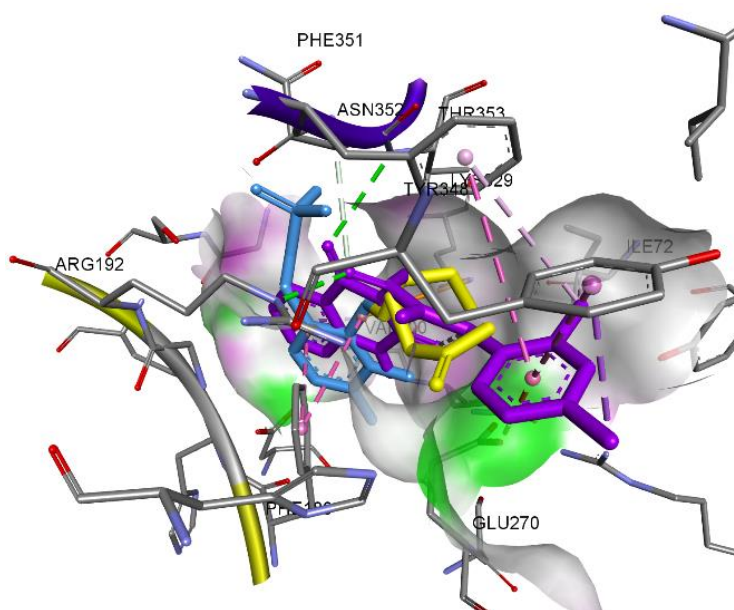


Рис. 5.11. Сумісна конформація вігабатрину (жовта молекула), похідної **4.15** (фіолетова молекула) та PLP (блакитна молекула) в активному сайті ензиму ГАМК<sub>АТ</sub>

5.4.2 Обговорення результатів активності сполуки-лідера на моделі судом, індукованих пікротоксином

Відомо, що позитивна алостерична модуляція класичними бездіазепінами приводить до конформаційних змін структури ГАМК<sub>A</sub> рецептора та унеможливує фіксацію у ньому не лише PTZ, а і пікротоксину [90]. Тому, одержані результати *in silico* досліджень дозволяють не лише підтвердити ГАМКергічні ланку в реалізації активності сполуки-лідера **4.15** на PTZ-моделі, а й передбачити активність на пікротоксиновій моделі судом. Тому *in vivo* дослідження на пікротоксиновій моделі судом були обґрунтованими та доцільними.

На моделі пікротоксин-індукованих судом досліджувана похідна **4.15** виявила потужні антиконвульсантні властивості, майже не поступаючись натрій вальпроату (рис. 5.12), у тому числі за інтегральним показником летальності, яка склала лише 17% щодо контрольної групи.

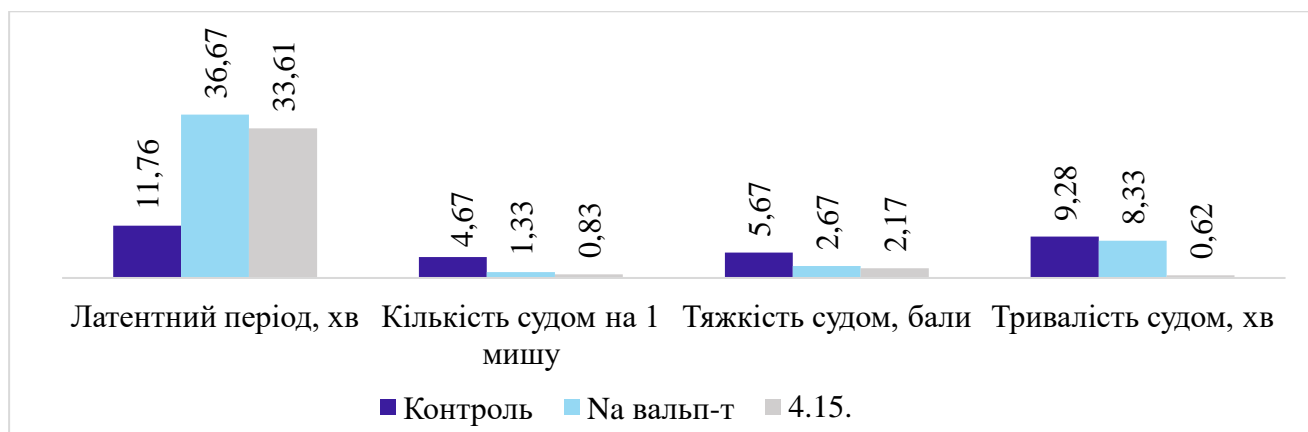


Рис. 5.12 Вплив похідної **4.15** на судомі, індуковані пікротоксином

Таким чином, отримані результати додатково підтверджують ГАМКергічний механізм реалізації протисудомної дії похідної 2,4-діоксохіназоліну **4.15** [130].

#### 5.4.3 Прогнозування гліцинергічного механізму та результати активності сполуки-лідера на моделі стрихнін-індукованих судом

Для визначення гліцинергічної ланки в реалізації протисудомної дії субстанції **4.15** проведено молекулярний докінг в активний сайт гліцинового рецептора (GlyR), макромолекулу якого кристалізовано з агоністом гліцином та АМ-3607 – нового позитивного алостеричного модулятора GlyR (5TIN) [148].



Значення скорингової функції похідної **4.15** було дуже низьким, однак все ж поступалося значенню нативного ліганду АМ-3607: -10,8 проти -11,4 ккал/моль, відповідно (табл. 5.4). Прогнозовано можливість утворення 10 гідрофобних зв'язків, в тому числі між ароматичними радикалами з утворенням нековалентних Pi-Pi стекинг- та T-подібних зв'язків з гідроксифенілом тирозину (Tyr161) та фенільним радикалом фенілаланіну (Phe32) (рис. 5.13 а). Зафіксоване утворення зв'язку з карбонілом аргініну (Arg27) та додаткова фіксація дистальної зони ліганду **4.15** внаслідок водневого зв'язку між амідною та карбоксильною групою аспарагінової кислоти (Asp165).

Таблиця. 5.4

**Результати докінгу похідної 4.15 в активні сайти гліцинового та аденозинового рецепторів**

Мішень	Скорингова функція ккал/моль	Гідрофобна взаємодія	Водневі зв'язки	Інші	Референс ліганд, ккал/моль
Гліцинергічна ланка					
GlyR	-10,8	Tyr161(3), Phe32, Pro87, Tyr161, Pro10(2), Leu14, Leu83(2)	Asp165*	Arg27 Halogen	-11,4 АМ-3607
Аденозинергічна ланка					
A <sub>2</sub> A	-9,2	Leu249, Phe168 (2), Tyr271, Leu267*, Met270, Leu167, Ile274	Tyr271	–	-8,5 ZM241385
Антиглутаматний механізм					
hVCATc	-7,4	Val175, Tyr90, Phe95, Tyr227	Arg119, Tyr193, Ala334, Thr333, Thr260, Ser331	Lys 222 (Pi-Cation)	-7,6 габапентин

Повне занурення похідної **4.15** до алостеричного сайту зв'язування з повздожньою щодо референс-ліганда фіксацією в просторі (рис. 5.13), свідчить про високу ймовірність позитивної алостеричної модуляції гліцинового рецептора.

Отже, за результатами молекулярного докінгу можливо передбачити активність сполуки-лідера **4.15** на моделі судом, індукованих стрихніном, оскільки він є потужним селективним антагоністом постсинаптичних рецепторів гліцину [87, 130].

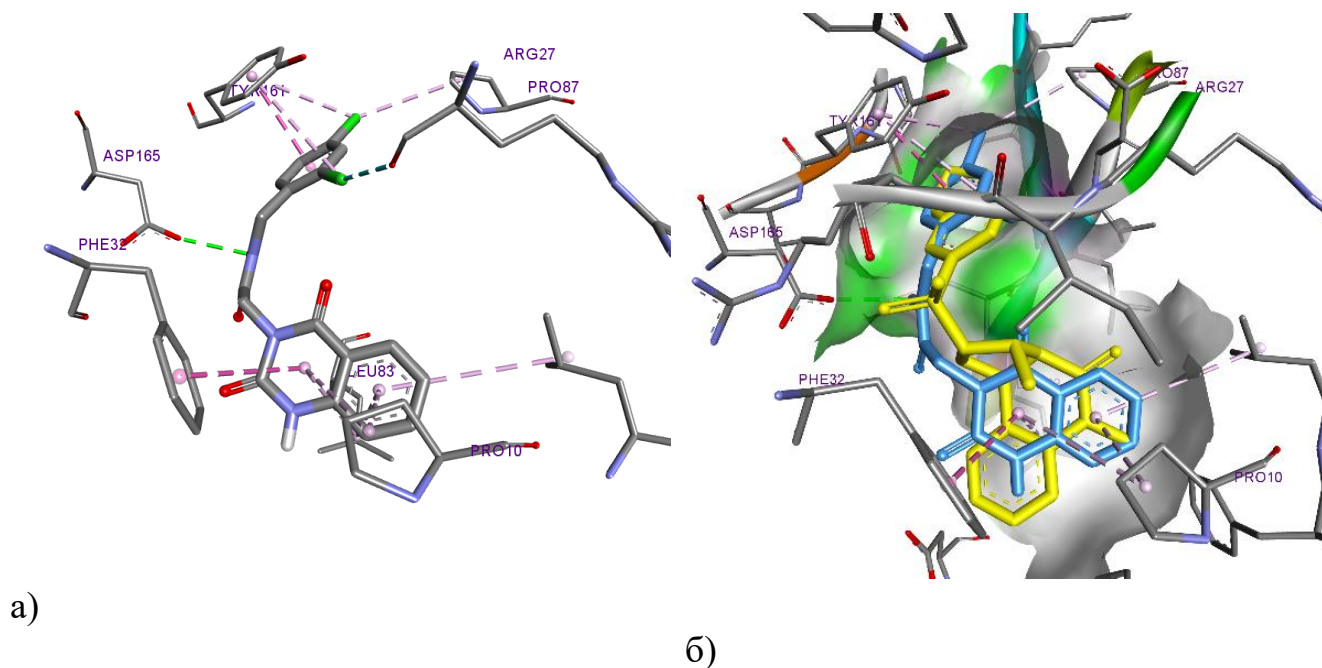


Рис. 5.13 3D візуалізація взаємодії похідної **4.15** а) з амінокислотами активного сайту та б) сумісна конформація **4.15** (блакитна молекула) та ПАМ АМ-3607 (жовта молекула) у сайті GlyR

Для підтвердження попереднього висновку про можливу гліцинергічну ланку протисудомної дії здійснено *in vivo* експеримент з використанням стрихніну як хемотоксину з конвульсивною активністю. Найважливішим індикатором наявності активності на стрихніновій моделі є інгібування тонічної фази судом у піддослідних тварин. Досліджувана похідна **4.15** виявила досить потужний захисний ефект не лише за цим показником, редукуючи клонічні та тонічні напади, а й за латентним періодом, подовжуючи його у чотири рази, а також достовірно скорочуючи летальність до 67 % щодо контрольної групи. Гліцин на цій моделі лише тенденційно поліпшував показники перебігу судом (рис. 5.14).

Зіставивши результати афінності до сайту гліцинового рецептора та *in vivo* експерименту, можемо говорити про достовірний вплив похідної **4.15** на гліцинергічну систему та її роль в реалізації протисудомної активності [130].



Рис. 5.14 Результати активності похідної 4.15 на моделі стрихнін-індукованих судом у мишей

#### 5.4.4 Прогнозування афінності до аденозинових рецепторів та результати активності сполуки-лідера на моделі кофеїн-індукованих судом

Для визначення можливого антагонізму хіназоліну **4.15** до кофеїну провели докінг у сайт високоселективного інгібітора аденозинових рецепторів людини типу  $A_2A$  – ZM241385 (ZEML) [149]. Саме сайт зв'язування ZM241385 є конститутивним для прогнозування афінності експериментальних речовин до  $A_2A$  типу аденозинових рецепторів [150]. Афінітет досліджуваного ліганда **4.15** значно перевищував референс-ліганд:  $-9,2$  ккал/моль щодо  $-8,5$  ккал/моль, відповідно (табл. 5.4). Деталізація амінокислотної взаємодії демонструє дев'ять гідрофобних зв'язків серед яких три міцні Pi-Pi стекінг-взаємодії з фенільним

радикалом фенілаланіну (Phe168) та 4-гідроксифенілом тирозину (Tyr271). Сумісна конформація лігандів демонструє ідентичність просторового розміщення та накладання структурних фрагментів (рис. 5.15). Отже, для хіназолінової похідної **4.15** прогнозуємо високий ступінь афінності до аденозинових рецепторів з можливим антагонізмом до кофеїну і, відповідно, активністю на моделі кофеїнових судом.

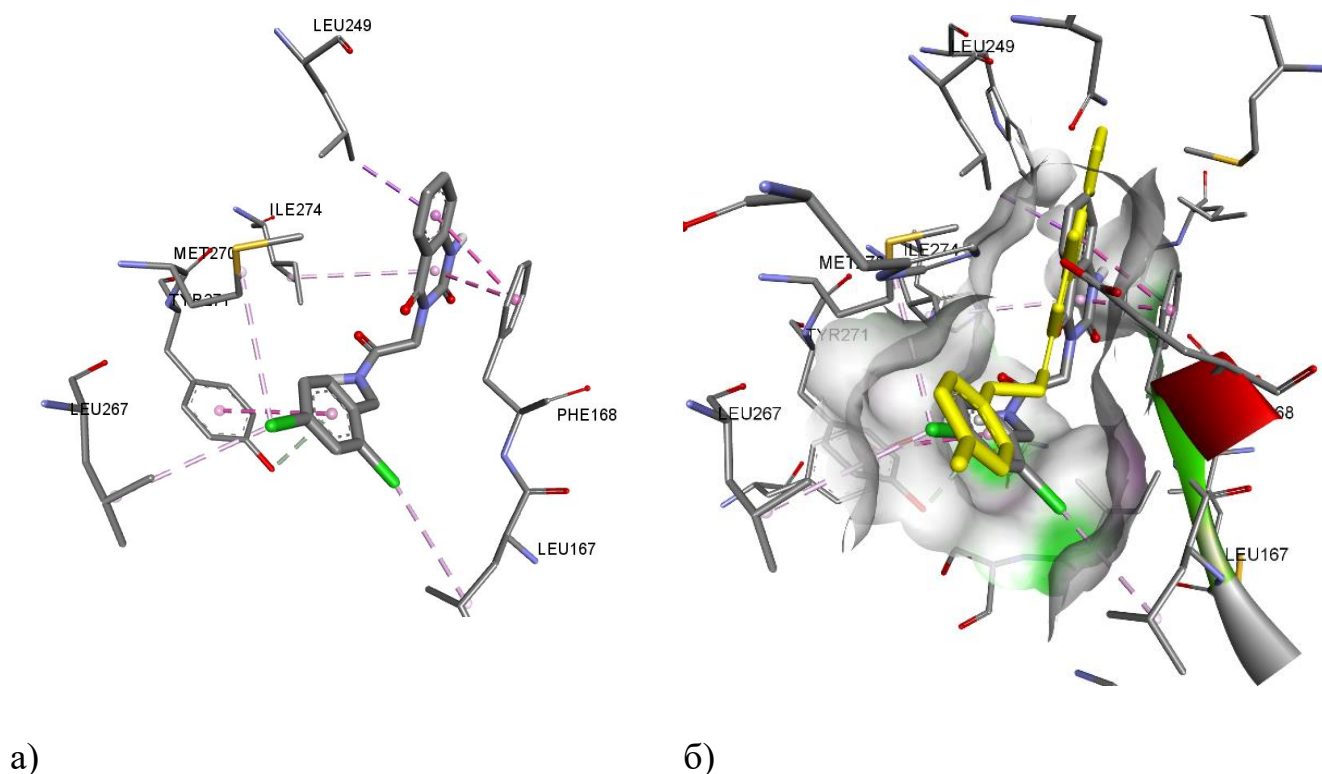


Рис. 5.15 3D візуалізація похідної **4.15** (сіра молекула) при взаємодії з амінокислотними залишками (а) та сумісна конформація з ZM241385 (жовта молекула) у сайті A<sub>2</sub>A рецептора

Для підтвердження попереднього висновку про можливість аденозинергічного механізму в реалізації протисудомної дії здійснено *in vivo* експеримент з використанням алкалоїду кофеїну як конвульсанта та інгібітора аденозинергічного гальмівного процесу [151] (рис. 5.16). Похідна **4.15** виявила виразний захисний ефект від судом достовірно подовжуючи латентний період судом у 4,5 раза, зменшуючи кількість судом майже в 3 рази, що привело до зниження летальності на 67%. Референс-препарат інозин зменшував летальність

на 50 % без значущих відмінностей показників перебігу судом під впливом досліджуваної похідної **4.15**.

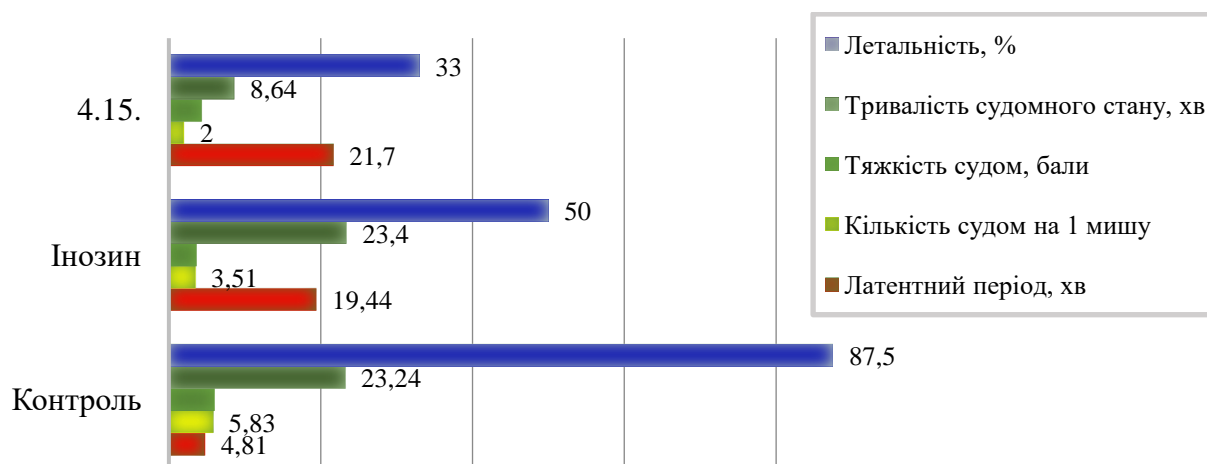


Рис. 5.16 Вплив похідної **4.15** на перебіг судом, індукованих кофеїном

Зіставивши результати афінності до сайту високоселективного інгібітора  $A_2A$  рецептора та *in vivo* експерименту, можемо говорити про достовірний вплив похідної **4.15** на аденозинергічну систему та її роль в реалізації протисудомної активності через конкурентний антагонізм до кофеїну [130].

#### 5.4.5 Прогнозування та результати активності сполуки-лідера на моделі судом, індукованих тіосемікарбазидом

Наявність у субстанцій антиглутаматергічних ефектів дозволяє схарактеризувати модель тіосемікарбазид-індукованих нападів [152], оскільки конвульсивна дія хемотоксину зумовлена інгібуванням глутаматдекарбоксилази. Для оцінки здатності речовин запобігати такому виду судом доцільним було б визначати агонізм до цього ензиму, однак наразі, на жаль, не виділено кристалічну молекулу ензиму з агоністом в активному сайті. Тож для прогнозування активності на тіосемікарбазид-індукованих судах проведено докінг в сайт інгібітора амінотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом (BCAT) – PDB ID 2COI [153]. Референс-ліганд – габапентин, який

інгібує BCAT та впливає на транспорт лейцину й підвищує активність глутаматдекарбоксилази, яку й інгібує тіосемікарбазид. Скорингова функція похідної **4.15** виявилася на рівні препарату порівняння (табл. 5.4). Однак, занурення у невелику гідрофобну кишеню неможливе, оскільки ліганд досягає місця фіксації кофактора PLP та накладається на нього (рис. 5.17). Очевидно, що реалізація протисудомного ефекту через інгібування BCAT є малоімовірною, як і активність на моделі судом індукованих тіосемікарбазидом

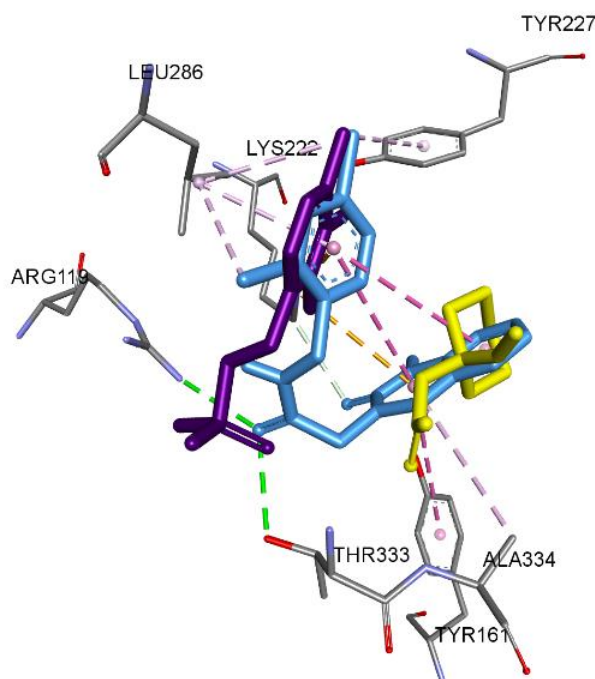


Рис. 5.17 Сумісна конформація габапентину (жовта молекула), похідного хіназоліну **4.15** (блакитна молекула) та PLP (фіолетова молекула) в активному сайті BCAT

Для підтвердження попереднього висновку про відсутність антиглутаматергічного механізму в реалізації протисудомної дії здійснено *in vivo* експеримент з використанням тіосемікарбазиду як конвульсанта (рис. 5.18) [130]. Маркерним показником активності на вказаній моделі є латентний період початку перших судом [135]. Сполука-лідер **4.15** не виявила захисного ефекту, не запобігала нападам та летальності, тоді як натрій вальпроат майже вдвічі збільшував латентний період судом і зменшував летальність на 33 %.

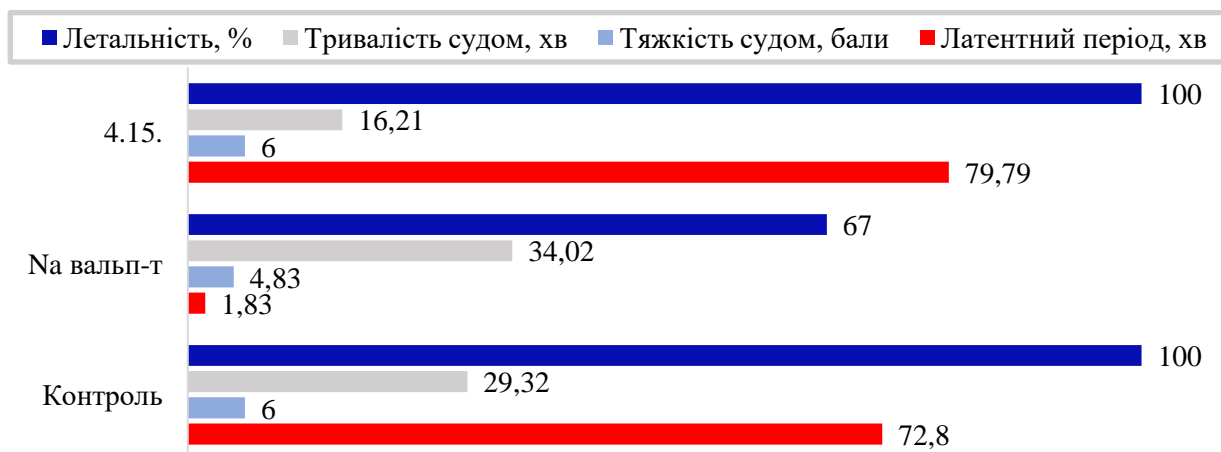


Рис. 5.18 Результати активності похідної **4.15** на тіосемікарбазид-індукованих судамах

Отже, за результатами комплексу *in silico* та *in vivo* досліджень сполуки-лідера N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)ацетаміду (**4.15**) з'ясовано, що реалізація його протисудомної дії є мультитаргетною з залученням різних механізмів:

- ГАМКергічні – ефективність на моделях PTZ- і пікротоксин-індукованих судом;
- гліцинергічні – ефективність на стрихніновій моделі;
- аденозинергічні – ефективність на моделі кофеїн-індукованих нападів.

Відсутність захисного ефекту на моделі тіосемікарбазид-індукованих судом свідчить про відсутність виразних антиглутаматергічних властивостей.

Отже, за результатами комплексного дослідження сполука-лідер **4.15** N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)ацетамід – є однозначно перспективною для подальших досліджень, зокрема нейрохімічного механізму та супутніх видів фармакологічної активності [87, 130].

## 5.5 Прогнозування інших можливих механізмів реалізації протисудомної активності сполуки-лідера

За останні десятиріччя кількість публікацій та доказової бази щодо участі тих чи інших таргетів у реалізації протисудомної активності невпинно зростає.

Відкриваються нові механізми дії, участь ферментів, визначається молекулярна будова біомішеней з деталізацією активних сайтів та молекулярними механізмами реалізації ефектів, що розширює можливості для передбачення фармакологічних властивостей сполук.

### 5.5.1 Прогнозування афінності сполуки-лідера до глутаматних рецепторів

У розділі 4 було спрогнозовано низький рівень афінності похідної **4.15** до двох типів глутаматних рецепторів – метаботропних 5 підтипу (mGlu5) та іонотропних AMPA-рецепторів. Для комплексного аналізу можливих напрямків механізму дії та планування майбутніх *in vivo* експериментів доцільно було визначити афінність шляхом *in silico* дослідження похідної **4.15** до інших підтипів метаботропних (mGlu) та іонотропних (iGlu) рецепторів глутамату, модуляція яких також може приводити до протисудомної дії.

Афінитет похідної **4.15** до III групи mGlu рецепторів 8 підтипу оцінювали докінгом в активний сайт ортостеричного агоніста з протисудомними властивостями DCPG – 3,4-дикарбоксифенілгліцину (ID 6E5V) [154]. Ступінь афінності виявилися значно ліпшою, ніж у нативного ліганду (табл. 5.5): -8,7 щодо -7.6 ккал/моль, відповідно. Аналіз спільного розміщення двох лігандів в активному сайті наведено на рис. 5.19.

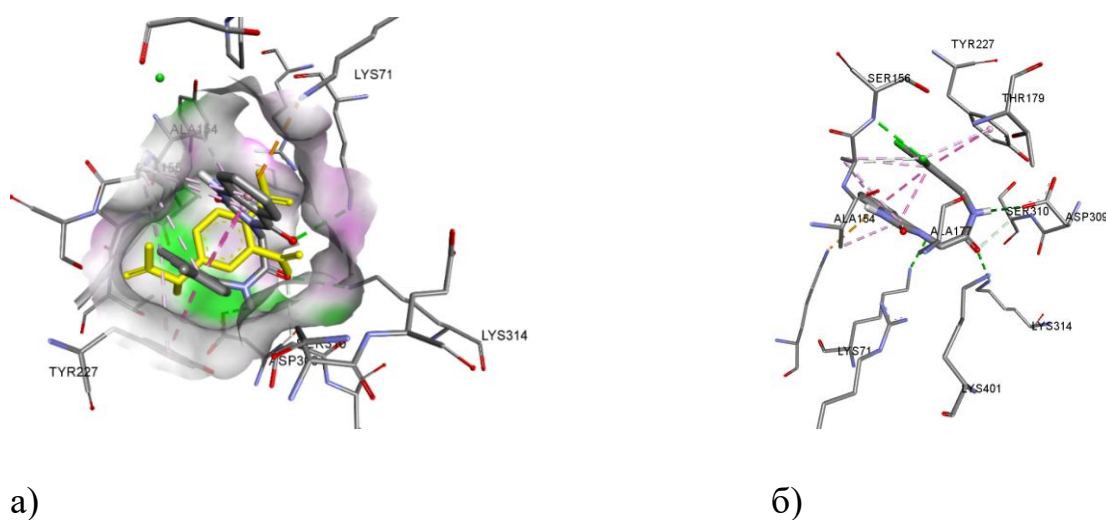


Рис. 5.19 3D конформація а) хіназоліну **4.15** (сіра молекула) в сайті mGlu8



щодо ліганду DCPG (жовта молекула б) взаємодія з амінокислотами сайту

Очевидно, що похідна **4.15** зайняла усю порожнину активного сайту, стабілізувавши конформацію сіткою з десяти гідروفобних зв'язків серед яких три Рі-Рі-стекинг взаємодії з тирозином (Tyr227) та тетраедричною фіксацією хіназолінового циклу шляхом утворення Рі-Alkyl зв'язків з залишками аланіну (Ala154, 177). Тож вірогідність прояву протисудомної активності через агоністичний вплив на пресинаптичні mGlu8 рецептори є досить високою.

Таблиця. 5.5

**Дані молекулярного докінгу похідної 5.5 в активні сайти метаботропних та іонотропних рецепторів глутамату**

Мішень	Скоринг ова функція ккал/мо ль	Гідروفобна взаємодія	Водневі зв'язки	Інші	Референс ліганд, ккал/моль
Глутаматергічні біомішені					
Метаботропні рецептори глутамату					
mGlu8	-8,7	Tyr227(2), Ala155(4), Ala154	Lys71, Lys314, Asp309, Ser310	Lys68	-7,6 DCPG
Іонотропні рецептори глутамату					
NMDAR	-10,2	Tyr184(3), Phe92, Trp223, Leu146, Val181, Phe185, Phe246, Val181 (2), Leu146	Thr126(2) Arg131(2), Ser180(2)	–	-7,8 ТК-40- антагоніст -7,0 фелбамат
Інші механізми					
KCNQ2	-7,3	Trp236, Phe305*, Met208*, Trp236, Tyr237*, Phe240, Phe100(2)*, Pro308*, Leu299	Trp236	–	-7,8 ретигабіну
CAII	-8,0	Leu198, His94, Phe131, Val143, Leu198(2), Val121, His94, His119, Trp209(2), Ile91, Val121	Asn62(2), Asn67, Gln92, Thr200, His94	–	-5,8 лакосамід

З метою визначення антагонізму до сайту гліцину – селективного ендogenous агоніста NMDA-рецептора було проведено докінг похідної

хіназоліну **4.15** (GluN1 субодиниця білка). Референс-лігандом слугував нативний антагоніст гліцину з вираженими протисудомними властивостями ТК-40 – PDB ID 4KFQ [96] та фелбамат, протисудомна активність якого реалізується через антагонізм до гліцинового сайту NMDA-рецептора [97]. Низьке значення енергії зв'язування похідної **4.15** демонструє високий ступінь афінності до рецептора, значно перевищуючи обидва референс-ліганди (табл. 5.5). Гідрофобна фіксація усіх фрагментів молекули внаслідок 12 зв'язків, в тому числі Pi-Pi T-подібна взаємодія з фенілаланіном Phe92, яка є магістральним залишком для фіксації нативного ліганду ТК-40. Ця взаємодія свідчить, що, не зважаючи на значно більший розмір відносно ТК-40, молекула хіназоліну **4.15** здатна глибоко проникнути у гідрофобну кишеню, що добре візуалізується при їх сумісній конформації (рис. 5.20). Також очевидно є повздожня фіксація відносно фелбамату та накладання 2,4-дихлорбензильного та фенільних радикалів.

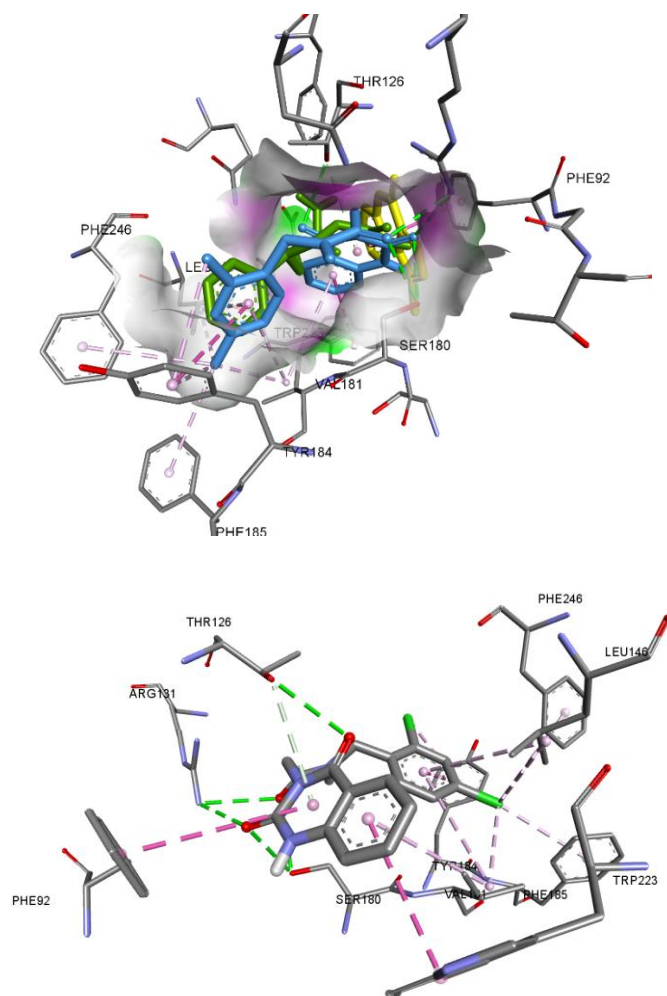


Рис. 5.20 3D візуалізація а) сумісної конформації похідної **4.15** (блакитна молекула), антагоніста ТК-40 (жовта молекула) і фелбамату (зелена молекула) в активному сайті NMDA-рецептора;

б) взаємодія похідної **4.15** з амінокислотними залишками активного сайту NMDA-рецептора

За результатами докінгу для похідної хіназоліну **4.15** у рецептори глутамату спрогнозовано модуляцію пресинаптичних глутаматних рецепторів mGlu8 III групи, які зменшують вивільнення глутамату, а також антагонізм до іонотропних NMDA-рецепторів глутамату, розташованих на постсинаптичній мембрані. Така комбінація модуляцій є однією із найперспективніших для потенційного ПСЗ та обґрунтовує доцільність проведення *in vivo* дослідження на моделях кіндлінгу [155].

### 5.5.2 Прогнозування афінності сполуки-лідера до вольтаж-залежних калієвих каналів

Одними із перспективних протисудомних таргетів є вольтаж-залежні калієві канали, які лише два роки тому було кристалізовано у конформації з інноваційним ПЕП агоністом – ретігабіном [156]. Оцінювання афінітету сполуки-лідера **4.15** до вольтаж-залежних калієвих каналів здійснювали докінгом у кристалічну структуру білка KCNQ2 (ID 7CR2). Референс-ліганд – модулятор ретігабін, який стабілізує відкриту форму калієвого каналу. Для сполуки-лідера розраховано значення скорингової функції на рівні препарату порівняння: -7,3 ккал/мол щодо -7,8 ккал/моль у ретігабіну (табл. 5.5).

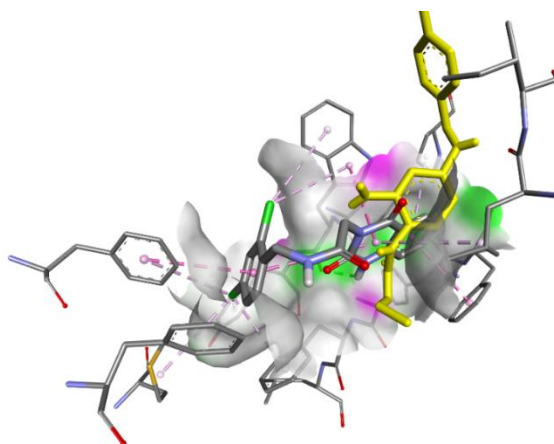


Рис. 5.21 Сумісна конформація ретігабіну (жовта молекула) та похідної **4.15** (сіра молекула) в активному сайті вольтаж-залежних калієвих каналів

Деталізація амінокислотних взаємодій демонструє участь амінокислот, які не формують експериментально визначений активний сайт, хоча візуалізується

зв'язок з магістральний для фіксації ретигабіну триптофаном (Trp236). Очевидну неспроможність зануритися в активний сайт калієвих каналів продемонстровано при сумісній конформації референс та досліджуваного ліганду (рис. 5.21): сполука **4.15** фіксується лише хіназоліновим циклом тоді як бензилацетамідний фрагмент лишається назовні. Підсумовуючи, можемо припустити неспроможність похідної хіназоліну **4.15** алостерично модулювати функцію калієвих каналів.

### 5.5.3 Прогнозування афінності до карбонової ангідрази II типу

На етапі планування експериментальних синтетичних досліджень було здійснено ранжування згенерованих структур за показником афінності до сайту карбонової ангідрази II типу як однієї із найперспективніших протисудомних біомішеней. Розрахована скорингова функція для 2,4-діоксохіназолінової похідної **4.15** склала  $-8,0$  ккал/моль, що значно перевищувало значення референс-нативного ліганду лакосаміду ( $-5,8$  ккал/моль). На цьому етапі досліджень було деталізовано конформаційне розміщення похідної **4.15** в кумариновому сайті зв'язування САII та визначено можливість утворення розгалуженої сітки гідрофобних взаємодій (рис. 5.21).

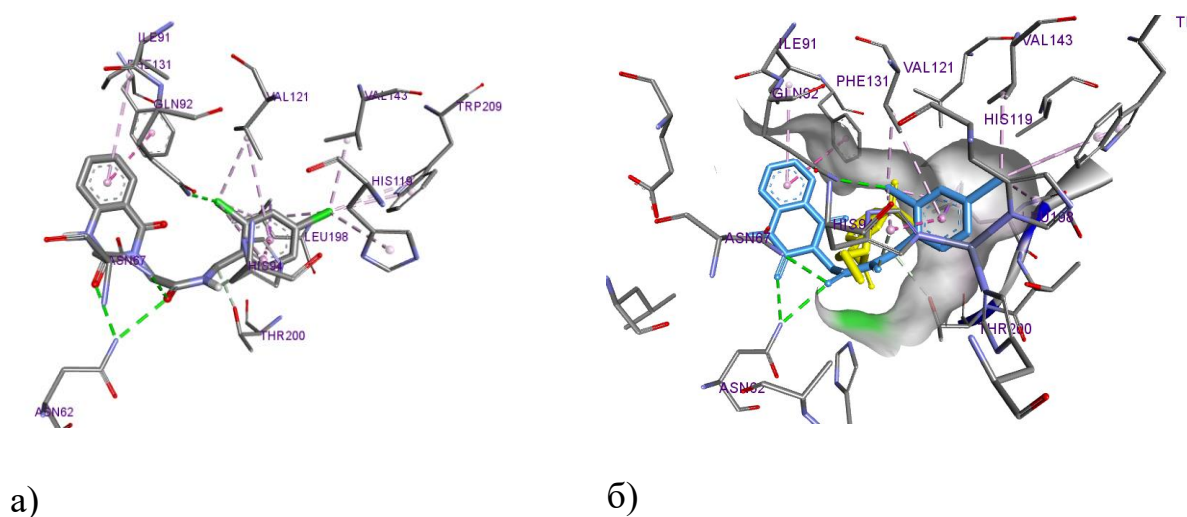


Рис. 5.22 3D візуалізація а) взаємодії сполуки-лідера 4.15 з пептидними залишками активного сайту СА II; б) сумісна конформація з лакосамідом в СА II

Серед них дві Pi-Pi T-shaped взаємодії між хіназоліновим циклом **4.15** і фенільним радикалом фенілалініну (Phe131) та бензильним фрагментом **4.15** та імідазольним циклом гістидину (His119).

Отже, за результатами докінгу в активний сайт СА II прогнозується висока ймовірність інгібувальної здатності похідної **4.15** до цього ензиму, а отже і вірогідність активності на моделі електроіндукованих судом (психомоторні 6Hz судоми), яка характеризує резистентні форми епілептичних нападів [156].

Результати *in silico* дослідження щодо можливого глутаматергічного механізму протисудомної дії шляхом модуляції метаботропних та іонотропних рецепторів глутамату характеризують перспективність дослідження на кіндлінгових моделях судом, а також вплив на потенціал-залежні калієві йонні канали та карбонову ангідразу II типу для прогнозування активності на психомоторних 6Hz судамах.

#### *Експериментальна частина*

Використовували розчинники та реагенти виробництва фірми Sigma-Aldrich, USA. Контроль за реакціями проводили за допомогою методу ТШХ на пластинках "SorbfilUV-254". Елюент для хроматографії – система «етилацетат – метанол» (9:1), проявник – пари йоду. Температури плавлення (°C) визначали в капілярі на електротермічному цифровому приладі IA9100X1 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Uk). Елементний аналіз проводили на мікроаналізаторі Euro Vector EA-3000 (Eurovector SPA, Redavalle, Італія). Результати елементного аналізу перебували в межах  $\pm 0,4\%$  від теоретичних значень. Спектри  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  синтезованих речовин знято на приладі Bruker Varian Mercury (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), частота 400 МГц і 100 МГц відповідно, розчинник – ДМСО- $d_6$ , внутрішній стандарт – ТМС. Хімічні зсуви наведено в шкалі  $\delta$  (м.ч.). Спектри LC/MS реєстрували за допомогою рідинного хроматографа AP ESCIEXAPI 150E X.

*Загальна методика синтезу N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(1-заміщених-2,4-діоксохіназолін-3-іл)ацетамідів 5.1-5.16*

Суміш N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1H-хіназолін-3-іл)ацетаміду (**4.15**) (0,2 г, 0,53 ммоль) та сухого калій карбонату (0,22 г, 1,59 ммоль) розчиняють у 2 мл сухому ДМФА і перемішують 15 хвилин за кімнатної температури. Потім до реакційної суміші додають алкілатор – відповідний заміщений бензилхлорид або 2-хлорацетамід (0,58 ммоль) і перемішують за 80 °С протягом 8-10 годин, проходження реакції контролюють за допомогою ТШХ. Після проходження реакції розчин розбавляють водою (25-50 мл). Осад, що виділився, фільтрують та промивають водою (20 мл). Кристалізують з метанолу. Вихід 80–95%.

2-[1-[(3-хлорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (**5.1**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,77 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,10 (дд, 1H,  $J= 1,6$ , та  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,70 (т, 1H,  $J= 8,0$ , Ar-H), 7,59 (с, 1H, Ar-H), 7,43, (с, 1H, Ar-H), 7,37-7,28 (м, 7H, Ar-H), 5,41 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,69 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,35 (д, 2H,  $J = 6,2$ , NHCH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) : 167,17, 161,14, 150,88, 139,57, 138,83, 135,46, 133,43, 132,81, 132,24, 130,43, 129,99, 128,52, 128,24, 128,15, 127,35, 127,27, 126,52, 125,25, 123,14, 115,37, 114,89, 45,90, 44,02, 39,86.

2-[1-[(4-хлорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (**5.2**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,75 (т, 1H  $J= 4,8$ , NHCO), 8,09 (дд, 1H,  $J= 1,6$  та  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,69 (т, 1H,  $J= 8,2$ , Ar-H), 7,59 (с, 1H, Ar-H), 7,37-7,22 (м, 7H, Ar-H), 5,38 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,69 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,34 (д, 2H,  $J = 6$ , NHCH<sub>2</sub>).

2-[1-[(2,4-диметилфеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (**5.3**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,75 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,10 (дд, 1H,  $J= 1,6$  та  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,71 (т, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H) 7,60 (д, 1H,  $J= 2,4$ , Ar-H), 7,36-7,22 (м, 3H, Ar-H), 7,10-7,06 (м, 2H, Ar-H), 6,95 (д, 1H, Ar-H), 6,64 (с, 1H, Ar-H), 5,25 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,70 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,34 (д, 2H,  $J = 6$ , NHCH<sub>2</sub>), 2,33 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,09 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

2-[1-[(2,5-диметилфеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (**5.4**).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,75 (т, 1H

$J= 5$ , NHCO), 8,11 (дд, 1H,  $J= 1,6$  та  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,70 (т, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H) 7,59 (д, 1H,  $J= 2,4$ , Ar-H), 7,36-7,22 (м, 3H, Ar-H), 7,10 (д, 1H,  $J= 8,2$ , Ar-H), 7,06 (д, 1H,  $J= 8,4$ , Ar-H), 6,95 (с, 1H,  $J= 8$ , Ar-H), 6,64 (с, 1H,  $J= 8,0$ , Ar-H), 5,25 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,70 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,34 (д, 2H,  $J = 4$ , NHCH<sub>2</sub>), 2,33 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,09 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

*2-[1-[(2-флуорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.5)*. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 8,78 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,11 (дд, 1H,  $J= 1,2$  та  $J= 1,2$ , Ar-H), 7,72 (т, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H), 7,60 (с, 1H, Ar-H), 7,37 (с, 1H, Ar-H), 7,34-7,25 (м, 5H, Ar-H), 7,12-7,07 (м, 2H, Ar-H), 5,41 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,68 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 6$ , NHCH<sub>2</sub>).

*2-[1-[(2,4-дифлуорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.6)*. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 8,76 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,11 (д, 1H,  $J= 1,2$  та  $J= 1,2$ , Ar-H), 7,72 (т, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H), 7,60 (с, 1H, Ar-H), 7,36-7,27 (м, 5H, Ar-H), 7,22-7,11 (м, 1H, Ar-H), 7,07-6,96 (т, 1H,  $J= 1,2$ , Ar-H), 5,37 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,61 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>).

*2-[1-[(2-цианофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.7)*. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 8,82 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,15 (д, 1H,  $J= 8,4$ , Ar-H), 7,92 (д, 1H,  $J= 8,4$ , Ar-H) 7,79 (т, 1H,  $J= 8,2$ , Ar-H), 7,59 (м, 2H,  $J = 8,0$ , Ar-H), 7,48 (т, 1H,  $J = 8,2$ , Ar-H), 7,35 (т, 3H,  $J= 8$ , Ar-H), 7,29 (д, 1H,  $J= 10,1$ , Ar-H), 7,20 (д, 1H,  $J= 10,1$ , Ar-H), 5,55 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,66 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 167,03, 161,10, 157,81, 150,69, 139,67, 139,62, 135,70, 135,32, 133,63, 133,44, 132,82, 132,24, 129,99, 129,94, 128,53, 128,30, 128,17, 127,26, 126,29, 123,39, 117,09, 115,29, 114,65, 110,03, 45,37, 43,94, 39,8.

*2-[1-[(4-нітрофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.8)*. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 8,79 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,17 (д, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H), 8,10 (д, 1H,  $J= 8,8$ , Ar-H) 7,70 (т, 1H,  $J= 8$ , Ar-H), 7,59 (д, 3H,  $J = 9,2$ , Ar-H), 7,35 (с, 1H, Ar-H), 7,32-7,21 (м, 4H, Ar-H), 5,54 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,68 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>).

*2-[1-[(4-метоксифеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.9)*.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,80 (т, 1H  $J=5$ , NHCO), 8,08 (дд, 1H,  $J=1,2$  та  $J=1,2$ , Ar-H), 7,69 (т, 1H,  $J=8,0$ , Ar-H) 7,61 (дд, 1H,  $J=1,6$ , Ar-H), 7,40-7,25 (м, 6H, Ar-H), 6,86 (д, 2H,  $J=8,4$ , Ar-H), 5,32 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,69 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J=5,6$ , NHCH<sub>2</sub>), 3,70 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

*2-[1-[(3-флуоро-4-метоксифеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.10)*.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,79 (т, 1H  $J=5$ , NHCO), 8,08 (дд, 1H,  $J=1,6$  та  $J=1,6$ , Ar-H), 7,70(т, 1H,  $J=8,8$ , Ar-H) 7,60 (с, 1H, Ar-H), 7,36 (с, 2H, Ar-H), 7,35-7,29 (м, 2H, Ar-H), 7,20 (д, 1H,  $J=8,4$ , Ar-H), 7,12-7,01 (м, 2H, Ar-H), 5,32 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,69 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J=5,6$ , NHCH<sub>2</sub>), 3,79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 167,15, 161,12, 157,92, 153,09, 150,09, 146,38, 139,56, 135,37, 132,83, 132,24, 130,00, 129,04, 128,96, 128,43, 127,26, 123,06, 122,98, 115,32, 114,99, 114,67, 114,00, 56,02, 45,45, 43,97, 39,86.

*2-[1-[(2-хлоро-4-флуорофеніл)метил]-2,4-діоксохіназолін-3-іл]-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]ацетамід (5.11)*.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 8,72 (т, 1H  $J=5$ , NHCO), 8,13 (д, 1H,  $J=7,6$ , Ar-H), 7,72 (т, 1H,  $J=8,0$ , Ar-H) 7,58-7,50 (м, 2H, Ar-H), 7,35-7,30 (т, 3H, Ar-H), 7,35-7,29 (м, 2H, Ar-H), 7,20 (д, 1H,  $J=8,4$ , Ar-H), 7,12-7,01 (м, 2H,  $J=6,8$ , Ar-H), 7,13-7,07 (м, 3H, Ar-H), 5,36 (с, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,68 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J=5,6$ , NHCH<sub>2</sub>).

*N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1-(2-оксо-2-(феніламіно)етил)-1,4-дигідрохіназолін-3(2H)-іл)ацетамід (5.12)*.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 10,38 (с, 1H, NHCO), 8,75 (т, 1H  $J=5$ , NHCO), 8,09 (дд, 1H,  $J=1,6$  та  $J=1,6$ , Ar-H), 7,78 (т, 1H,  $J=8,0$ , Ar-H) 7,60-7,56 (м, 3H, Ar-H), 7,44-7,29 (м, 6H, Ar-H), 7,07 (т, 1H,  $J=8,0$ , Ar-H), 5,01 (с, 2H, 1-CH<sub>2</sub>CO), 4,66 (с, 2H, 3-CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J=5,6$ , NHCH<sub>2</sub>).

*N-(2-хлоро-4-метилфеніл)-2-(3-(2-((2,4-дихлорофеніл)метиламіно)-2-оксоетил)-2,4-діоксо-3,4-дигідрохіназолін-1(2H)-іл)ацетамід (5.13)*.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ): 10,00 (с, 1H, NHCO), 8,75 (т, 1H  $J=5$ , NHCO), 8,09 (дд, 1H,  $J=1,6$  та  $J=1,6$ , Ar-H), 7,80 (т, 1H,  $J=8,2$ , Ar-H), 7,60 (д, 1H,  $J=1,6$ , Ar-H), 7,51 (д, 1H,



$J=8,4$ , Ar-H), 7,41-7,32 (м, 5H, Ar-H), 7,10 (д, 1H,  $J=9$ , Ar-H), 5,06 (с, 2H, 1-CH<sub>2</sub>CO), 4,66 (с, 2H, 3-CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>), 2,27 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

*N*-(4-метоксифеніл)-2-(3-(2-((2,4-дихлорофеніл)метиламіно)-2-оксоетил)-2,4-діоксо-3,4-дигідрохіназолін-1(2H)-іл)ацетамід (**5.14**). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 10,23 (с, 1H, NHCO), 8,76 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,09 (дд, 1H,  $J= 1,6$  та  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,78 (т, 1H,  $J=8,2$ , Ar-H), 7,60 (д, 1H,  $J=2,0$  Ar-H), 7,47 (д, 1H,  $J=9,2$ , Ar-H), 7,43-7,33 (м, 4H, Ar-H), 4,97 (с, 2H, 1-CH<sub>2</sub>CO), 4,66 (с, 2H, 3-CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>), 3,71(с, 3H, OCH<sub>3</sub>).

*N*-((3-флуорометил)феніл)-2-(3-(2-((2,4-дихлорофеніл)метиламіно)-2-оксоетил)-2,4-діоксо-3,4-дигідрохіназолін-1(2H)-іл)ацетамід (**5.15**). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 10,55 (с, 1H, NHCO), 8,76 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,10 (т, 2H,  $J= 1,6$ , Ar-H), 7,79-7,69 (кв, 1H,  $J=1,2$ , Ar-H), 7,59 (т, 2H,  $J=2,0$ , Ar-H), 7,48-7,34 (м, 5H, Ar-H), 5,04 (с, 2H, 1-CH<sub>2</sub>CO), 4,66 (с, 2H, 3-CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 166,91, 166,04, 160,99, 150,57, 140,30, 139,35, 135,57, 135,33, 132,87, 132,28, 130,17, 130,11, 129,79, 129,38, 128,54, 128,00, 127,28, 125,85, 123,18, 122,74, 122,24, 119,98, 115,25, 114,81, 114,70, 46,53, 43,66.

*N*-(4-флуорофеніл)-2-(3-(2-((2,4-дихлорофеніл)метиламіно)-2-оксоетил)-2,4-діоксо-3,4-дигідрохіназолін-1(2H)-іл)ацетамід (**5.16**). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): 10,62 (с, 1H, NHCO), 8,76 (т, 1H  $J= 5$ , NHCO), 8,24-8,21 (м, 2H, Ar-H), 8,20-8,09 (м, 1H, Ar-H), 7,74-7,69 (м, 1H, Ar-H), 7,59 (д, 1H,  $J=1,6$ , Ar-H), 7,48-7,31 (м, 7H, Ar-H) 5,08 (с, 2H, 1-CH<sub>2</sub>CO), 4,70 (с, 2H, 3-CH<sub>2</sub>CO), 4,33 (д, 2H,  $J = 5,6$ , NHCH<sub>2</sub>).

#### Молекулярний докінг

Молекулярний докінг здійснювали за допомогою програм AutoDock Vina та AutoDockTools 1.5.6 [157]. Як таргети застосовано кристалізовані білки з Protein Data Bank [104]. Підготовка білків і лігандів здійснено аналогічно як описано в розділах 2,3 (експер. частина).

Координати Grid box та його центр було визначено за нативним лігандом.

ГАМК<sub>A</sub> (ID 4COF):  $x = -3,45$ ,  $y = -31,27$ ,  $z = 118$ ; size  $x = 30$ ,  $y = 32$ ,  $z = 84$ ;

ГАМК<sub>A</sub> (ID 6HUP):  $x = 117,4$ ,  $y = 157,4$ ,  $z = 110,4$ ; size  $x = 26$ ,  $y = 28$ ,  $z = 20$ ;

ГAMK<sub>AT</sub> (ID 10HW):  $x = 9.75, y = -0.87, z = 20.85$ ; size  $x = 28, y = 24, z = 28$ ;  
 Gly (ID 5VDH):  $x = 480, y = 87.4, z = 446.16$ ; розмір  $x = 28, y = 24, z = 28$ ;  
 A<sub>2</sub>A (ID 3EML):  $x = -9.06, y = -7.14, z = 55.86$ ; розмір  $x = 12, y = 10, z = 16$ ;  
 hVCATc (ID 2COI):  $x = -23.53, y = 4.14, z = -12.64$ ; розмір  $x = 32, y = 26, z = 24$ ;  
 mGluR8 (ID 6BT5):  $x = 6.66, y = -36.61, z = -12.06$ ; розмір  $x = 22, y = 22, z = 22$ ;  
 NMDA (ID 4KFQ):  $x = 26.91, y = 34.35, z = 46.85$ ; розмір  $x = 22, y = 24, z = 20$ ;  
 hCA II (ID 3IEO):  $x = -5.48, y = -8.01, z = 10.94$ ; розмір  $x = 22, y = 18, z = 24$ ;  
 KCNQ2 (ID 7CR2):  $x = 118.52, y = 135.5, z = 102.93$ ; розмір  $x = 22, y = 18, z = 16$ ;

#### *Фармакологічні дослідження*

Методологія, умови, дозування речовин при проведенні скринігу на моделі PTZ-індукованих судом у мишей ідентичні, описаним у розділах 2 та 3 [130, 144].

#### Моделі хемотоксичних судом:

- пікротоксин-індуковані судоми – водний розчин пікротоксину (Sigma, США) в дозі 3 мг/кг підшкірно, препарат-порівняння – натрій вальпроат (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція), доза 300 мг/кг внутрішньошлунково;
- стрихнін-індуковані судоми – стрихнін (Sigma, США) в дозі 1,2 мг/кг підшкірно, препарат-порівняння – специфічний агоніст – водний розчин гліцину (Sigma, США) 50 мг/кг в/о;
- кофеїн-індуковані судоми – кофеїн-бензоат натрію (Дарниця, Україна) в дозі 650 мг/кг внутрішньочеревно, препарат-порівняння – агоніст аденозинових рецепторів інозин (Рибоксин, Артеріум, Україна) 1000 мг/кг внутрішньочеревно;
- тіосемікарбазид-індуковані судоми – тіосемікарбазид у дозі 25 мг/кг внутрішньочеревно, препарат-порівняння – натрій вальпроат (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція), доза 300 мг/кг внутрішньошлунково.

2-(2,4-диоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)-метил]-ацетамід (**4.15**) вводили у мінімальній дозі, яка чинила найвиразніший протисудомний ефект на PTZ-індукованих судамах – 100 мг/кг внутрішньошлунково за 30 хв до введення конвульсанта [158].

Усі зазначені референс-препарати та субстанції вводили в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла.

### Висновки до розділу 5

1. Проведено модифікацію структури 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**) введенням бензильних та арилацетамідних замісників у перше положення хіназолінового циклу шляхом алкілування у середовищі диметилформаїду в присутності надлишку калій карбонату за температури 70-80 °С.
2. Доведено структуру та чистоту синтезованих сполук **5.1-5.16** методами ТШХ, LC/MS, <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопії, елементним аналізом.
3. З'ясована повна втрата активності модифікованих похідних на PTZ моделі судом та визначено позитивну кореляцію між результатами *in vivo* та *in silico* досліджень, а саме значеннями енергії зв'язування і конформаційним розміщенням лігандів в активних сайтах ПАМ бензамідину та діазепаму у ГАМК<sub>A</sub> рецепторі та ензиму ГАМК<sub>AT</sub>.
4. 2-(2,4-Діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (доза 100 мг/кг) виявляє широкий спектр протисудомної активності, значно зменшуючи тяжкість нападів і летальність на моделях судом, викликаних хемотоксинами – пікротоксином, стрихніном, кофеїном, та не впливає на судоми, що їх спричинено тіосемікарбазидом.
5. Інструментами молекулярного докінгу визначено афінність сполуки **4.15** до протисудомних біомішеней, передбачено механізм реалізації активності та визначено кореляцію *in vivo* та *in silico* результатів: антагонізм до PTZ та пікротоксину – стимулювання ГАМКергічних механізмів внаслідок позитивної алостеричної модуляції бенздіазепінового сайту ГАМК<sub>A</sub> рецептора; антагонізм з кофеїном – модуляція аденозинергічної ланки через конкурентне інгібування A<sub>2A</sub>

рецепторів; активність на стрихнін-індукованих судомах – гліцинергічний механізм через інгібування Gly-рецепторів.

6. Прогнозовано механізм реалізації протисудомного ефекту «сполуки-лідера» **4.15** через модуляцію метаболічних mGlu8 (сайт селективного агоніста) та іонотропних NMDA-рецепторів глутамату (сайт антагоністів), а також інгібування карбонової ангідрази II, що передбачає активність на моделі PTZ-кіндлінгу та електроіндукованих судом, відповідно.
7. За показниками фармакологічного профілю розкрито перспективність подальшого поглибленого дослідження «сполуки-лідера» 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідроквіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду (**4.15**) з визначенням нейрхімічних механізмів, параметрів токсичності та супутніх видів фармакологічної активності, а також розробку параметрів якості.

*Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:*

1. El Kayal, W., Severina, H., Tsyvunin, V., Zalevskyi, S., Shtrygol', S., Vlasov, S., Golovchenko, O., Kovalenko, S., Georgiyants, V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. 1(35). P. 58–69. (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, синтетичні дослідження та інтерпретація спектральних даних, проведення докінгових досліджень, підготовка статті до друку) (Q3, Scopus)
2. Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. 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*. 2022. Vol. 71. P. 224–233. (Особистий внесок –

проведення літературного пошуку, проведення проведення та інтерпретація даних, підготовка статті до друку) (Q3, Scopus)

3. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пиримидин- и хиनाзолин-4(3H)-онон. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матер. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
4. Severina H. I., El Kayal W. M., Georgiyants V. A. The algorithm of virtual screening and prediction of the promising anticonvulsants' mechanism of action. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. II наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 41–42.
5. Wassim Mokhammad El Kayal, Severina H. I., Georgiyants V. A. Molecular docking studies of the N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide of the active site of GABAA and GABAAT. *Science and practice 2019* : the 10th International pharmaceutical conference, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 109.
6. El Kayal W. M., Severina H. I. Synthesis of acetamide derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline as perspective anticonvulsants. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, November 21, 2019, «Farmak» JSC, Ukraine; Укр. Мед. Часопис, 6 (134), Т. 2 – XI/XII 2019 с. 17-18.
7. Ель Кайал В. М., Северина А. И., Георгиянц В. А. Синтез 1-бензилзамещенных производных N-[(2,4-дихлорофенил)метил]-2-(2,4-диоксо-1H-хиназолин-3-ил)ацетамида как возможных противосудорожных агентов. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* :

- сб. материалов IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 138–141.
8. Severina H. I., El Kayal W. M., abu Shark A., Georgiyants V. A. Synthesis of 1-acetamide derivatives of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide as new anticonvulsant agents. *100 years of success and quality* : materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy. Kharkiv. October 18th, 2021, Kharkiv: НФаУ, 2021. P. 42.
  9. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3H)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати : від дизайну молекули до клінічного застосування*: мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7-10.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено практичне вирішення наукової задачі спрямованого пошуку потенційних протисудомних засобів в ряду похідних хіназолін-4(3*H*)-ону. За результатами експериментальних досліджень обґрунтована модифікація структури хіназолін-4(3*H*)-ону, здійснено спрямований синтез його алкіл/арилацетамідних похідних, визначено їх фізико-хімічні властивості, *in silico* прогноз та *in vivo* дослідження фармакологічних властивостей та обрано потенційний інноваційний АФІ – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-*N*-[(2,4-дихлорофеніл)-метил]-ацетамід.

1. Сформовано дизайн мішень-орієнтованого дослідження щодо пошуку протисудомних засобів серед похідних хіназолін-4(3*H*)-ону, проаналізовано сучасні підходи до конструювання хіназолінового циклу, визначено головний скафолд та дотримуючись постулатів фармакофорної моделі пошуку ПСЗ згенерована віртуальна база похідних хіназолін-4(3*H*)-ону як протисудомних агентів.
2. Молекулярним докінгом структур-лігандів до сайту бенздіазепінів ГАМК<sub>A</sub> рецептора, сайтів інгібіторів NMDA та АМРА – рецепторів глутамату, сайту інгібітора карбонової ангідрази II виконано ранжування структур-лігандів за показником афінності – для синтезу обрано 32 сполуки.
3. Здійснено синтез головного білдинг-блоку дослідження (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти реакцію циклізації метилового естеру 2-ізотіоціанобензойної кислоти з гліцином у присутності триетиламіну при кип'ятінні в середовищі пропанолу-2.
4. Синтезовано нові не описані в літературі 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміди "one-pot" методом взаємодією (4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти з *N,N'*-карбонілдімідазолом з відповідними алкіл-, циклоалкіл- та ариламинами при кип'ятіння у діоксані. Для 10 синтезованих похідних виконано фармакологічний скринінг на PTZ моделі судом та визначено низькі показники протисудомної активності.

5. Розроблено новий препаративний підхід до синтезу білдінг-блоку дослідження – 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти шляхом окисненням гідрогену пероксидом при 70 °С 2-(4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)оцтової кислоти. Шляхом амінування відповідними алкіл-, аліл- та ариламинами в безводному діоксані в присутності N,N'-карбонілдіімідазолу синтезовано нові похідні 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)ацетаміди.
6. За результатами фармакологічного скринінгу на моделі PTZ-індукованих судом у мишей визначено, що похідні хіназолін-2,4-діону у порівнянні з їх 2-тіоксоаналогами демонструють ліпші показники захисту від судом. Для чотирьох сполук означено відсутність впливу на координацію рухів у тесті стрижня, що обертається.
7. За показниками фармакологічного профілю для подальших досліджень обрано 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетамід (**4.15**), для якого визначено LD<sub>50</sub> > 5000мг/кг і, відповідно, V клас токсичності за класифікацією Hodge і Sterner.
8. Визначено співставність даних конформаційного розміщення до активних сайтів інгібіторів іонотропних АМРА- та метаботропних mGlu5 рецепторів глутамату та *in vivo* експериментальних даних у тесті MES-індукованих судом: похідна **4.15** виявляє лише помірну активність щодо захисту від судом.
9. Проведено модифікацію структури 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрохіназолін-3(2*H*)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду, введенням бензильних та арилацетамідних замісників у перше положення хіназолінового циклу та доведена повна втрата активності у модифікованих похідних на PTZ моделі судом та визначено співставність між результатами *in vivo* та значеннями енергії зв'язування і конформаційним розміщенням лігандів в активних сайтах ПАМ бензамідину та діазепаму у ГАМК<sub>A</sub> рецепторі та ензиму ГАМК<sub>AT</sub>.



10. Доведено широкий спектр протисудомної дії «сполуки-лідера» на моделях хемотоксичних судом та визначено його механізм: антагонізм до PTZ та пікротоксину – стимулювання ГАМКергічних механізмів за рахунок позитивної алостеричної модуляції бенздіазепінового сайту ГАМКА рецептора; антагонізм з кофеїном – модуляція аденозинергічної ланки через конкурентне інгібування  $A_2A$  рецепторів; активність на стрихнін-індукованих судамах – гліцинергічний механізм через інгібування Gly-рецепторів.
11. Прогнозовано додаткові напрямки реалізації протисудомного ефекту «сполуки-лідера» через модуляцію метаботропних mGlu8 (сайт селективного агоніста) та іонотропних NMDA-рецепторів глутамату (сайт антагоністів), а також інгібування карбонової ангідрази II, що передбачає активність на моделі PTZ-кіндлінгу та психомоторних 6Hz судамах, відповідно.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Faisal M., Saeed A. Chemical insights into the synthetic chemistry of quinazolines: recent advances. *Frontiers in Chemistry*. 2021. Vol. 8. 1204.
2. Quinazolinone: An Overview / A. Rashmi, K. Ashish, N.S. Gill, A.C. Rana. *International. Research Journal of Pharmacy*. 2011. Vol. 2. P. 22–28.
3. Griess P. Ueber die einwirkung von cyan auf amidobenzoesaure und anthranilsaure in wasseriger losung. *Berichte*. 1878. Vol. 11. P. 1985–1988.
4. Gabriel S., Colman J. Zurkenntniss des pyrimidins und methylierter pyrimidine, *Chemische Berichte*. 1903. Vol. 36. P.3379–3385.
5. Джилкрист Т. Химия гетероциклических соединений: пер. с англ. М.: Мир, 1996. 464 с.
6. Ugale V. G., Bari S. B. Structural exploration of quinazolin-4(3H)-ones as anticonvulsants: rational design, synthesis, pharmacological evaluation, and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. Vol. 46. P. 3–26.
7. 2-Pyridinyl-4(3H)-Quinazolinone: A Scaffold for Anti-influenza A Virus Compounds / S. Liu et. al. *Chemical Biology & Drug Design*. 2015. Vol. 86. P. 1221–1225.
8. Molecular docking and anticonvulsant activity of newly synthesized quinazoline derivatives / H. Abuelizz et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22(7). P. 1094-1107.
9. Synthesis of a new tetracyclic ring system: pyrrolotriazepinoquinazolinone derivatives / T. Foldesi et al. *Tetrahedron*. 2015. Vol. 71. P. 6759–6763.
10. The cascade synthesis of quinazolinones and quinazolines using an  $\alpha$ -MnO<sub>2</sub> catalyst and tert-butyl hydroperoxide (TBHP) as an oxidant / Z. Zhang et al. *Chemical Communications*. 2015. Vol. 51. P. 9205–9207.
11. Cleavage of the C–C triple bond of ketoalkynes: synthesis of 4(3H)-quinazolinones / X. Yang et al. *Organic Chemistry Frontiers*. 2015. Vol. 2. P. 366–368.
12. Revathy K., Lalitha A., p-TSA-catalyzed synthesis of spiroquinazolinones. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2015. Vol.12. P. 2045–2049.

13. Shaterian H. R., Rigi F. An efficient synthesis of quinazoline and xanthene derivatives using starch sulfate as a biodegradable solid acid catalyst. *Research on Chemical Intermediates*. 2015. Vol. 41. P. 721–738.
14. Maleki A., Rabbani M., Shahrokh S. Preparation and characterization of a silica-based magnetic nanocomposite and its application as a recoverable catalyst for the one-pot multicomponent synthesis of quinazolinone derivatives. *Applied Organometallic Chemistry*. 2015. Vol. 29. P. 809–814.
15. Synthesis, in vivo and in silico evaluation of novel 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives as potential anticonvulsant agents / H. Kothayer et al. *Drug Development Research*. 2019. Vol. 80. P. 343–352.
16. Novel 1,2,3,4-tetrahydroquinazolinones via reaction of 2-amino-N-substituted benzamides and dimethyl acetylenedicarboxylate / S. Nahavandian et al. *Helvetica Chimica Acta*. 2015. Vol. 98. Vol. 1028–1033.
17. Domino oxidative cyclization of 2-aminoacetophenones for the one-pot synthesis of tryptanthrin derivatives / B. V. S. Reddy et al. *European Journal of Organic Chemistry*. 2015. P. 8018–8022.
18. Novel one-pot three component reaction for the synthesis of functionalized spiroquinazolinones / S. Tajbakhsh et al. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2015. Vol. 52. P. 1559–1564.
19. Natte K., Neumann H., Wu X.-F. Pd/C as an efficient heterogeneous catalyst for carbonylative four-component synthesis of 4(3H)-quinazolinones. *Catalysis Science & Technology*. 2015. Vol. 5. P. 4474–4480.
20. Yuan D., Kong H.-H., Ding M.-W. New efficient synthesis of 1H-pyrimido[2,1-b]quinazoline-2,6-diones via a tandem aza-Wittig/nucleophilic addition/intramolecular cyclization/isomerization reaction starting from the Baylis-Hillman adducts. *Tetrahedron*. 2015. Vol. 71(3). P.419–423.
21. Synthesis of tricyclic quinazolinones via intramolecular cyclization of 3-(2-aminoalkyl)-2-(phenylamino)quinazolin-4(3H)-ones / X. Yang et al. *Molecular Diversity*. 2016. Vol. 20. P. 551–556.

22. Polshettiwar V., Varma R. S. Greener and sustainable approaches to the synthesis of pharmaceutically active Heterocycles. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007. Vol. 10. P. 723–737.
23. Gatadi S., Lakshmi T. V., Nanduri S. 4(3H)-Quinazolinone derivatives: Promising antibacterial drug leads. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 170. P. 157–172.
24. Synthesis and anticancer activity of N-substituted 2-arylquinazolinones bearing trans-stilbene scaffold / M. Mahdavi et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 95. P. 492–499.
25. Raltitrexed-based chemotherapy for advanced colorectal cancer / Y. Liu et al. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2014. Vol. 38(2). P. 219–25.
26. Synthesis, Anticonvulsant Activity, and SAR Study of Novel 4-Quinazolinone Derivatives / N. A. Noureldin et al. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2017. Vol. 350. P. 1600332.
27. Birhan Y. S., Bekhit A. A., Hymete A. In vivo antimalarial evaluation of some 2,3- disubstituted-4(3H)-quinazolinone derivatives. *BMC Research Notes*. 2015. Vol. 8. P. 589–594.
28. 3-(3-Ethylphenyl)-2-substituted hydrazino-3H-quinazolin-4-one derivatives: new class of analgesic and anti-Inflammatory agents. V. Alagarsamy et al. *Chemical Biology & Drug Design*. 2009. Vol. 73. P. 471-479.
29. 2,3-Dihydroquinazolin-4(1H)-ones: misible light mediated synthesis, solvatochromism and biological activity. K. Hemalatha et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2015. Vol. 143. P. 139–147.
30. Design, synthesis and in vivo screening of some novel quinazoline analogues as anti-hyperlipidemic and hypoglycemic agents. S.N. Mokale et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016. Vol. 26. P. 272–276.
31. Synthesis and evaluation of quinazoline amino acid derivatives as monoamine oxidase (MAO) inhibitors. S.N. Khattab et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015. Vol. 23. P. 3574–3585

32. Kshirsagar U. A. Recent developments in the chemistry of quinazolinone alkaloids. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015. Vol. 13. P. 9336–9352
33. Synthesis, structural investigation, antiphospholipases, antiproteases and antimicrobial activities of 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-6-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalen-1-one and 4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-8-methoxy-3,4,5,6-tetrahydro-1H-benzo / J. El-Sayed et al. *The Chemical Society of Pakistan*. 2019. Vol. 41. P. 1074–1089.
34. Gobinath M., Subramanian N., Alagarsamy V. Design, synthesis and H1-antihistaminic activity of novel 1-substituted-4-(3-chlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinazolin-5(4H)-ones. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015. Vol. 19. P. 282–286.
35. Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification. I. Khan et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 24. P. 2361–2381.
36. Tseng M. C., Yang H. Y., Chu Y. H. Total synthesis of asperlicin C, circumdatin F, demethylbenzomalvin A, demethoxycircumdatin H, sclerotigenin, and other fused quinazolinones. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2010. Vol. 8(2). P. 419–27.
37. Synthesis and antitumor activity of some 2,3-disubstituted quinazolin-4(3H)-ones and 4,6-disubstituted-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-2H-ones / N.M. Abdel Gawadet al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 45. P. 6058e6067.
38. Pyrimidines and their benzo derivatives. *Comprehensive heterocyclic chemistry IV* / T. Cao et al. 2022. Vol. 8. P. 86–228.
39. Wattanapiromsakul C., Forster P. I., Waterman P. G. Alkaloids and limonoids from *Bouchardatia neurococca*: systematic significance. *Phytochemistry*. 2003. Vol. 64, 609–615.

40. Chapter 3 - Febrifugine and Its Analogs: Studies for Their Antimalarial and Other Therapeutic Properties / S. S. Ningthoujam et al. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2015. Vol. 44, P. 93–112.
41. Chamariya R, Suvarna V. Role of KSP Inhibitors as anti-cancer therapeutics: an update. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2022. Vol. 22(14). P. 2517-2538.
42. Fruman D. A., & Cantley L. C. Idelalisib--a PI3K $\delta$  inhibitor for B-cell cancers. *The New England journal of medicine*. 2014. Vol. 370(11). P. 1061–1062.
43. Lewis J. H., Stine J. G. Chapter 22 - Nonsteroidal antiinflammatory drugs and leukotriene receptor antagonists. *Drug-Induced Liver Disease (Third Edition)*. 2013. P. 369–401
44. An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments / V. Alagarsamy et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 151. P. 628–685.
45. Jain N., Jaiswal J., Pathak A. Synthesis, molecular docking and evaluation of 3-{4-[2-amino-4-(substitutedphenyl)-2H-[1,3]oxazin/thiazin6-yl]}2-phenyl-3H-quinazolin-4-one derivatives for their anticonvulsant activity. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 18. P. 63–73.
46. Auti P. S., George G., Paul A. T. Recent advances in the pharmacological diversification of quinazoline/quinazolinone hybrids. *RSC Advances*. 2020. Vol. 10. P. 41353–41392
47. Balaglitazone reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via upregulation of PTEN in a PPAR $\gamma$ -dependent manner in leukemia cells / B. Yousefi et al. *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39(10). P. 1010428317716501.
48. Ghosh S., Lobera M., Sundrud M.S. Chapter 10 - Targeting Th17 and Treg Signaling Pathways in Autoimmunity. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2011. Vol. 46, P. 155–170
49. Ishikawa T, Kamide R, Niimura M. Photoleukomelanodermitis (Kobori) induced by afloqualone. *The Journal of Dermatology*. 1994. Vol. 21 (6). P. 430–3.

50. Quinazoline: An update on current status against convulsions / R. S. Cheke et al. *Journal of Molecular Structure*. 2022. Vol. 1248. P. 131384.
51. Recent advances in selective  $\alpha$ 1-adrenoreceptor antagonists as antihypertensive agents / K. S. Jain et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008. Vol. 16. P. 4759–4800.
52. Atropisomeric quinazolin-4-one derivatives are potent noncompetitive alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor antagonists / W. M. Welch et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001. Vol. 11. P. 177–181.
53. 1-aryl-6,7-methylenedioxy-3H-quinazolin-4-ones as anticonvulsant agents / M. Zappalà et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003. Vol. 13(24). P. 4427-30.
54. CP465,022, a selective noncompetitive AMPA receptor antagonist, blocks AMPA receptors but is not neuroprotective in vivo / F. S. Menniti et al. *Stroke*. 2003. Vol. 34. P. 171-176.
55. Characterization of the binding site for a novel class of noncompetitive alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor antagonists / F. S. Menniti. *Molecular Pharmacology*. 2000. Vol. 58. P. 1310-1317.
56. Design, graph theoretical analysis, density functionality theories, Insilico modeling, synthesis, characterization and biological activities of novel thiazole fused quinazolinone derivatives / G. Saravanan et al. *Drug development research*. 2018. Vol. 79. P. 260–274.
57. Exploring quinazolinones as anticonvulsants by molecular fragmentation approach: structural optimization, synthesis and pharmacological evaluation studies / V.G. Ugale et al. *ChemistrySelect*. 2020. Vol. 5. P. 2902–2912.
58. 58.. Quan, synthesis and anticonvulsant activity evaluation of 4-phenyl-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinazolin-5(4H)-one and its derivatives / H.-J. Zhang et al. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2015. Vol. 348. P. 564–574.
59. Synthesis, anticonvulsant activity and molecular modeling study of some new hydrazinecarbothioamide, benzenesulfonylhydrazide, and phenacylaceto-hydrazide

- analogues of 4(3H)-quinazolinone / H. S. A. Al-Salem et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015. Vol. 25. P. 1490–1499.
60. Molecular docking, synthesis and biological evaluation of some novel 2-substituted-3-allyl-4(3H)-quinazolinone derivatives as anticonvulsant agents / H. Abulkhair et al.. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 6(9). P. 593-603.
61. Synthesis and evaluation of quinazoline amino acid derivatives as monoamine oxidase (MAO) inhibitors / S. N. Khattab et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 23. P. 3574–3585
62. CNS depressant and anti-convulsant activity of some novel 3-[5-substituted-1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styrylquinazolinone-4(3H)-ones / V. Jatav et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008. Vol. 43. P.1945–1954.
63. Synthesis and pharmacological activities of new isatin hydrazones / M. Sarangapani et al. *Indian Drugs*.1998. Vol. 35. P. 336–343.
64. Nicotinyl incorporated quinazolinonyl thiadiazoles as possible NSAIDs / G. V. S. R. Sarma et al. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1999. Vol. 9. P. 151–152.
65. Studies on organosulfur compounds. XIV: Sulfurations and oxidations of 2,3-disubstituted-4(3H)-quinazolinones / T. Hisano et al. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1976. Vol. 24. P. 2244–2247
66. Studies on biologically active halogenated compounds-II: Chemical modifications of 6-amino-2-fluoromethyl-3-(o-tolyl)-4(3H)-quinazolinone and the CNS depressant activities of related compounds / J. Tani et al. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1979. Vol. 27. P. 2675–2687
67. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery / R. Gupta et al. *Molecular Diversity*. 2021. Vol. 25(3). P. 1315-1360.
68. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP) / J. H. Kehne et al. *Neurochemical research*. 2017. Vol. 42, № 7. P. 1894–1903.
69. Stables J. P., Kupferberg H. J. The NIH anticonvulsant drug development (ADD) program: preclinical anticonvulsant screening project. *Molecular and cellular*



- targets for antiepileptic drugs* / G. Avanzini, P. Tanganelli, M. Avoli (eds). John Libbey & Company Ltd, London, 1997. С. 4–17.
70. Synthesis, modelling, and anticonvulsant studies of new quinazolines showing three highly active compounds with low toxicity and high affinity to the GABA-A receptor / M. F. Zayed et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22(2). P. 188-203.
71. Северіна Г.І. Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону: дис. ... д-ра фармац. наук: 15.00.02 / НФаУ. Х., 2021. 456 с.
72. Palanirajan T. P. S., Kumar V. Quinazoline Marketed drugs. *Research in Pharmacy*. 2011. Vol. 1(1). P.1-21.
73. Design, synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as anticonvulsant agents / M. F. Zayed et al. *Medicinal Chemistry Research*. 2013. Vol. 22. P. 5823–5831.
74. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Methaqualone / J. A. Inger et al. *ACS Chemical Neuroscience*. 2023. Vol. 14(3). P. 340-350.
75. Qua-Alluding to the Past: A Case of Methaqualone Analog Ingestion / K. Lund et al. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021. Vol. 21: bkab103.
76. Dimmock J. R., Vashishtha S. C., Stables J. P. Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2000. Vol. 35, № 2. P. 241–248.
77. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пириимидин- и хиनाзолин-4(3H)-онов / А. И. и др. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
78. The algorithm of virtual screening and prediction of the promising anticonvulsants' mechanism of action / H. I. Severina et al. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп.

- II наук.-практ. Інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 41–42.
79. Peterson S. L. Glycine potentiation of anticonvulsant drugs in pentylenetetrazol seizures in rats. *Brain Research Bulletin*. 1991. Vol. 26(1). P. 43–7.
80. Löscher W., Klein P. The Pharmacology and Clinical Efficacy of Antiseizure Medications: From Bromide Salts to Cenobamate and Beyond. *CNS Drugs*. 2021. Vol. 35. P. 935–963.
81. Дизайн потенціальних антиконвульсантів среди производних хиназолин-4(3H)-оноів / А. И. Северина и др. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. дистанц. міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. с. 139.
82. Early preclinical evaluation of dihydropyrimidin(thi)ones as potential anticonvulsant drug candidates / M. Matias et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 102. P. 264–274.
83. Synthesis, anticonvulsant activity and toxicity screening of newer pyrimidine semicarbazone derivatives / A. Ozair et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 45, № 6. P. 2467–2472.
84. Habib M. M. W., Abdelfattah M. A. O., Abadi A.H. Design and synthesis of novel phenylpiperazine derivatives as potential anticonvulsant agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2015. Vol. 348. P. 868–874.
85. Hassan M. Z., Khan S., Amir M. Design, synthesis and evaluation of N-(substituted benzothiazol-2-yl)amides as anticonvulsant and neuroprotective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012. Vol. 58. P. 206–213.
86. Graham L. P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press. fifth edition. 2013. P. 223.
87. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3H)-one derivatives as new anticonvulsants / El Kayal W. et al. *Протиепілептичні*

- препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування: мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7-10.
88. Северіна Г.І. Синтез та фізико-хімічні характеристики ЦНС-агентів серед похідних піримідин-4-ону та піримідин-2(4)-тіону: автореф. дис. ... д-ра фармац. наук : 15.00.02 / НФаУ. Х., 2021. 47 с.
89. Miller P. S., Aricescu A. R. Crystalstructure of a human GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature*. 2014. Vol. 512 (7514). P. 270–275.
90. GABA<sub>A</sub> receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology / S. Masiulis et al. 2019. *Nature*. Vol. 565(7740). P. 454-459.
91. Crystal structure of GABA aminotransferase, a target for antiepileptic drug therapy / P. Storici et al. 1999. *Biochemistry*. Vol. 38. P. 8628–34.
92. McCarthy G., Myers B., Siegfried N. Treatment for methaqualone dependence in adults. *Cochrane Library: Cochrane Reviews*. 2005. Vol. 2: CD004146.
93. Synthesis of some new quinazolin-4(3H)-one derivatives and evaluation of their anticonvulsant activity / N. M. Boshta et al. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2016. Vol. 147. P. 2031–2042
94. GARD: a generally applicable replacement for RMSD / J. C. Baber et al. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2009. Vol. 49(8). P. 1889–900
95. Molecular docking studies of the N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo1H-quinazolin-3-yl)acetamide of the active site of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>A</sub>T / W. M. El Kayal et al. *Science and practice 2019 : the 10th International pharmaceutical conference*, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 109.
96. Crystal structure and pharmacological characterization of a novel N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist at the GluN1 glycine binding site / T. Kvist et al. *The Journal of biological chemistry*. 2013. Vol. 288. P. 33124–33135.
97. Bialer M., White H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature reviews. Drug discovery*. 2010. Vol. 9, № 1. P. 68–82.

98. Yelshanskaya M. V., Singh A. K., Sampson J. M. Structural bases of noncompetitive inhibition of AMPA-Subtype ionotropic glutamate receptors by antiepileptic drugs. *Neuron*. 2016. Vol. 91. P. 1305–1315.
99. The coumarin-binding site in carbonic anhydrase accommodates structurally diverse inhibitors: the antiepileptic lacosamide as an example and lead molecule for novel classes of carbonic anhydrase inhibitors / C. Temperini et al. *Journal of medicinal chemistry*. 2010. Vol. 53, № (2). P. 850–854.
100. Intrinsic thermodynamics of high affinity inhibitor binding to recombinant human carbonic anhydrase IV / A. Mickeviciute et al. *European Biophysics Journal*. 2018. Vol. 47. P. 271–290.
101. Aggarwal M., Kondeti B., McKenna R. Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2013. № 23. P. 717–724
102. Key topics in molecular docking for drug design / P. H. M. Torres et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20(18). P. 4574–603.
103. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010. Vol. 31. P. 455–461.
104. Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Date of access: 05.10.2019).
105. Ivachtchenko A.V., Kovalenko S.M., Drushlyak O.G. Synthesis of Substituted 4-Oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolines and 4-Oxo-3,4-dihydroquinazoline-2-thioles. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2003. Vol. 5(6). P. 775–788.
106. Recherches sur la formation et la transformation des esters LXXIX. Sur la réaction de l'isothiocyanate d'o-méthoxycarbonyl-phényle avec divers acides et l'acide sérinephosphorique / E. Cherbuliez et al. *Helvetica chimica acta*. 1968. Vol. 51. 1. P. 241 – 248.

107. Lee K. S., Kim K. D. Efficient synthesis of primary amides from carboxylic acids using N,N'-carbonyldiimidazole and ammonium acetate in ionic Liquid. *Synthetic Communications*. 2011. Vol. 41(23). P. 3497–3500.
108. Figueiredo R. M., Frohlich R., Christmann M. N,N'-Carbonyldiimidazole-mediated cyclization of amino alcohols to substituted azetidines and other N-heterocycles. *The Journal of Organic Chemistry*. 2006. Vol. 71. P. 4147–4154.
109. Larrive'e-Aboussafy C., Jones B. P., Price K. E. Catalysis of N,N'-carbonyldiimidazole-mediated amidations. *Organic Letters*, 2010. Vol. 12(2). P. 324–7.
110. Sheehan J. C., Hess G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society*. 1955. Vol.77. P. 1067–1068.
111. Ishihara K., Ohara S., Yamamoto H. 3,4,5-Trifluorobenzeneboronic acid as an extremely active amidation catalyst. *The Journal of Organic Chemistry*. 1996. Vol. 61. P. 4196–4197.
112. Keshavamurthy K. S., Vankar Y. D., Dhar D. N. Preparation of acid anhydrides, amides, and esters using chlorosulfonyl isocyanate as a dehydrating agent *Synthesis*. 1982. Vol. 6. P. 506–508.
113. Pozdnev V. F. Activation of carboxylic acids by pyrocarbonates. Application of di-tert-butyl pyrocarbonate as condensing reagent in the synthesis of amides of protected amino acids and peptides. *Tetrahedron Lett*. 1995. Vol. 36. P. 7115–7118.
114. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules / J. S. Carey et al. *Org. Biomol. Chem*. 2006. Vol. 4. P. 2337–2347.
115. Perspectives of biologically active compounds creation in the range of (2,4-dioxo-(2-thio-4-oxo) -quinazolin-3-yl) acetic acid derivatives / W. El Kayal et al. *9th international conference of pharmacy «Science and practice 2019»*: the book of abstracts of 50th Conference, Kaunas, Lithuania, November 9th, 2018. Kaunas, 2018. P. 52.

116. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-3(2H)quinazolinyl)acetamides / N. D. Bunyatyan et al. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020. Vol. 54. № 1. P. 1–8
117. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1H-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів / Г. Северіна та ін. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021: мат. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 82*
118. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening / R. L Krall et al. *Epilepsia*. 1978. Vol. 19. P. 409–428.
119. Mula M. New antiepileptic drugs: molecular targets. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2009. № 2. P. 79–86.
120. (Synthesis and anticonvulsant activity of 6-methyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one acetamides / H. Severina et al. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019. Vol. 9(02). P. 012–019.
121. Vogel H. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Berlin : Springer-Verlag, 2008. 2068 p.
122. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-3(2H)quinazolinyl)acetamides / N. D. Bunyatyan et al. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020. Vol. 54. № 1. 1-8.
123. Philipova I., Heimgartner H., Linden A. Application of the "Direct amide cyclization" to peptides containing an anthranilic acid residue. *Helvetica Chimica Acta*. Vol. 88(7). P.1711–1733
124. Villalgorido J. M., Heimgartner H. Synthesis of cyclic depsipeptides and peptides via direct amide cyclization. *Helvetica Chimica Acta*. 1997. Vol. 80. P. 748-766.
125. Synthesis of chiral 3-substituted 2,4(1h,3h)-quinazolinediones / P. Canonne et al. *Heterocycles*. 1993. Vol. 36(6). P.1305–14.
126. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide / W. M. El

- Kayal et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134–142.
127. Похідні 2-(2,4-Діоксо-1,4-дигідро-2H-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію: пат. 137806 на корисну модель, №U 2019 03594 ; заявл. 08.04.2019 ; опубл. 11.11.19, Бюл. № 21.
128. Kim D., Soo K., Kwan L. Efficient synthesis of primary amides from carboxylic acids using N,N'-Carbonyldiimidazole and ammonium acetate in ionic liquid. *Synthetic Communications*. 2011. Vol. 41 (23). P. 3497–3500.
129. Synthesis of hydroxamic acids by activation of carboxylic acids with N,N'-Carbonyldiimidazole: exploring the efficiency of the method / N. Usachova et al. *Synthetic Communications*. 2010. Vol. 40 (6). P. 927–935.
130. 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 / S. Shtrygol'et al. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2022. Vol. 71. P. 224-233.
131. Hodge H. C., Sterner J. H. Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association quarterly*. 1943. Vol. 10, № 4. P. 93–96.
132. Castel-Branco M. M., Alves G. L., Figueiredo I. V. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2009. Vol. 31, № 2. P. 101–6.
133. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011. Vol. 20. P. 359–68.
134. Structure-based optimization strategies for G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulators: A case study from analyses of new metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) X-ray structures / J. A. Christopher et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 62. P. 207–222.

135. The effect of propoxazepam on development of thiosemicarbazide-induced GABA-deficient seizures in mice / M. Ya. Golovenko et al. 2017. *Clinical pharmacy*. Vol. 21(2). P. 34–40.
136. Пастушенко Т. В., Маруший П. Б., Жуков А. А. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ. *Гигиена и санитария*. 1985. № 6. С. 46–49.
137. Hock F. J. (Ed.) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. 1215–1306.
138. Drug design strategies for the discovery of novel anticonvulsants concerned with four site binding pharmacophoric model studies / K. J. Deepak, S. Avineesh, V. Ravichandran, A. Navneet. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2017. №17(1). P. 30–50.
139. Tasso S.M., Bruno-Blanch L.E., Moon S.C., Estiu, G.L. Pharmacophore searching and QSAR analysis in the design of anticonvulsant drugs. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2000. Vol/ 504 (1-3). P. 229–240.
140. Severina H.I., Skupa O.O., Voloshchuk N.I., Georgiyants V.A. Synthesis, docking study, and pharmacological evaluation of S-acetamide derivatives of 4,6-dimethyl-2-thiopyrimidine as anticonvulsant agents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2020. Vol 10(07). P. 001-008.
141. Shakya A. K., Kamal M., Balaramnavar V. M. Design, synthesis and evaluation of benzofuran-acetamide scaffold as potential anticonvulsant agent. *Acta Pharm*. 2016. Vol. 66, № 3. P. 353–72. 248.
142. Obniska J. et al. Synthesis and Anticonvulsant Properties of New 3,3-Diphenyl-2,5,3-dioxo-pyrrolidin-1-yl-acetamides and 3,3-Diphenyl-propionamides. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2017. Vol. 350, № 3-4. P. 1600368.
143. Pyridazinone hybrids: design, synthesis and evaluation as potential anticonvulsant agents / S. Partap et al. *Bioorganic Chemistry*. 2018. Vol. 77. P. 74–83.
144. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-



- benzylsubstituted derivatives / W. El Kayal et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69.
145. Ель Кайал В. М., Северина А. И., Георгиянц В. А. Синтез 1-бензилзамещенных производных N-[(2,4-дихлорофенил)метил]-2-(2,4-диоксо-1H-хиназолин-3-ил)ацетамида как возможных противосудорожных агентов. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : сб. матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 138-141.
146. Severina H.I., El Kayal W. M., abu Shark A., Georgiyants V. A. Synthesis of 1-acetamide derivatives of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide as new anticonvulsant agents. *100 years of success and quality* : materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy. Kharkiv, October 18th, 2021, Kharkiv: НФаУ, 2021. P. 42.
147. Experimental and Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski., F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney. *Advanced drug delivery reviews*. 2001. Vol. 46(1-3). P. 3–26.
148. Crystal structures of human glycine receptor  $\alpha 3$  bound to a novel class of analgesic potentiators / X. Huang et al. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2017. Vol. 24(2). P. 108–113.
149. Jaakola V. P., Griffith M. T., Hanson M. A. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonis. *Science*. 2008. Vol. 322. P. 1211–1217.
150. Crystal structure of the adenosine A2A receptor bound to an antagonist reveals a potential allosteric pocket / B. Sun et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114. P. 2066–2071.

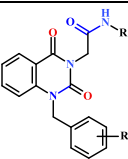
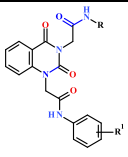
151. Caffeine and seizures: A systematic review and quantitative analysis / R. R. van Koert et al. *Epilepsy & Behavior*. 2018. Vol. 80. P. 37–47.
152. Pitkänen A., Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*. 2011. Vol. 10, № 2. P. 173–186.
153. Goto M., Miyahara I., Hirotsu K. Structural Determinants for Branched-chain Aminotransferase Isozyme-specific Inhibition by the Anticonvulsant Drug Gabapentin. *The Journal of biological chemistry*. 2005. 280, 37246–37256.
154. Structural Basis for (S)-3,4-Dicarboxyphenylglycine (DCPG) As a Potent and Subtype Selective Agonist of the mGlu8 Receptor. / Q. Chen et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 61. P. 10040–10052.
155. Modeling of chronic epilepsy in animals through chemical methods / E. V. Egorova, D. V. Dmitrenko, A. A. Usoltseva, R. F. Nasyrova. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020. Vol. 18 (4). P. 185–196.
156. Li X., Zhang Q., Guo P. Molecular basis for ligand activation of the human KCNQ2 channel. *Cell Res*. 2020. № 4. P. 1–10.
157. A review: animal models used in the screening of antiepileptic drugs / S. Kasthuri, K. Karthigadevi, P. Manjulakshmi, S. Kavimani. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Science*. 2013 Vol. 3, № 3. P. 18–23.
158. Mookherjee P., Green P.S., Watson G. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009. Vol. 30(16). P. 2785–2791.
159. Залевський, С. В., Штриголь, С. Ю., Штриголь, Д. В. Психотропні властивості та гостра токсичність 2-(2,4-диоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду – перспективного антиконвульсанта. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Vol. 15 (6). P. 363-371.

## **ДОДАТКИ**

## Додаток А

Таблиця А.1

## Афінність похідних 2,4-діоксо-хіназоліну до протисудомних біомішеней

Ліганд	Біомішень (рецептор/фермент)			
	ГАМК <sub>A</sub> (6HUP)	NMDA (4KFQ)	AMPA 5L1F	САП (3IEO)
	Енергія зв'язування (ккал/моль)			
Нативний референс-ліганд	-9,9 (діазепам)	-7,8 (ТК-40)	-10,6 (перампанель)	-5,8 (лакосамід)
				
R R <sup>1</sup>				
Bn Bn	-7,2	-7,9	-8,6	-4,6
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4 (Cl)-4	-8,1	-7,1	-7,3	-4,4
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (Cl)-2,4 (Cl)-4	-9,6	-7,2	-7,1	-4,0
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-2 (Cl)-4	-8,9	-7,8	-7,3	-4,2
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-4 (OMe)-4	-7,8	-7,2	-7,0	-4,4
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (Cl)-4	-9,1	-7,8	-7,2	-4,9
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4 (Cl)-4	-9,2	-7,2	-7,2	-4,5
Ph H	-8,0	-7,2	-7,0	-4,2
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-4 H	-8,0	-7,2	-9,2	-4,5
				
Bn H	-6,8	-6,9	-7,6	-5,7
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (Cl)-4 (Cl)-4	-7,1	-7,2	-7,1	-5,4
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (Cl)-2,4 (Cl)-4	-7,7	-7,4	-7,0	-5,0
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OMe)-2 (Cl)-4	-7,9	-6,8	-7,2	-5,3
H H	-7,9	-7,2	-7,1	-5,2
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>3</sub> )-4 H	-7,0	-7,4	-7,2	-5,5

## Додаток Б

Список публікацій здобувача:

1. El Kayal W. M., Shtrygol S. Y., Zalevskyi S. V., Shark A. A., Tsyvunin V. V., Kovalenko S. M., Bunyatyan N. D., Perekhoda L. O., Severina H. I., Georgiyants V. A. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.085> (Q1, Scopus, Web of Science). (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, експериментальних синтетичних досліджень, докінгових досліджень, аналіз результатів спектральних даних, підготовка статті до друку).
2. El Kayal W., Severina H., Tsyvunin V., Zalevskyi S., Shtrygol' S., Vlasov S., Golovchenko O., Kovalenko S., Georgiyants V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.253554> (Q3, Scopus). (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, синтетичні дослідження та інтерпретація спектральних даних, проведення докінгових досліджень, підготовка статті до друку)
3. Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. 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*. 2022. Vol. 71. P. 224–233. (Q3, Scopus) <https://doi.org/10.5817/CSF2022-5-224> (Особистий внесок – проведення літературного пошуку, проведення та інтерпретація даних докінгових досліджень, підготовка статті до друку).

4. Ель Кайал В., Залевський С. В., Абу Шарк А. І., Штриголь С. Ю., Бур'ян Г. О., Цивунін В. В., Георгіянец В. А., Коваленко, С. М. Похідні 2-(2,4-Діоксо-1,4-дигідро-2*H*-хіназолін-3-іл)-ацетаміду, що мають протисудомну дію: пат. 137806 на корисну модель, №U 2019 03594 ; заявл. 08.04.2019 ; опубл. 11.11.19, Бюл. № 21. (Особистий внесок – брав участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
5. El Kayal W., Abu Sharkh A. I., Burian G. O. Perspectives of biologically active compounds creation in the range of (2,4-dioxo-(2-thio-4-oxo) -quinazolin-3-yl) acetic acid derivatives. *9th international conference of pharmacy «Science and practice 2019»* : the book of abstracts of 50<sup>th</sup> Conference, Kaunas, Lithuania, Novemver 9th, 2018. Kaunas, 2018. P. 52.
6. El Kayal W., Abu Sharkh A. I., Burian G. O. Synthesis of biologically active compounds in the range of (2-(4-oxo-2-thio-1,4-dihydro-2h-quinazolin-3-yl)-acetamide derivative. *Topical issues of new medicines development* : мат. XXVI міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 10-12 квіт. 2019 р., м. Харків: НФаУ, 2019. С. 9–10.
7. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгіянец В. А. Реализация фармакофорной концепции и докинговые исследования при поиске антиконвульсантов в ряду производных пиримидин- и хиначолин-4(3*H*)-онов. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 43–44.
8. Severina H. I., El Kayal W. M., Georgiyants V. A. The algorithm of virtual screening and prediction of the promising anticonvulsants' mechanism of action. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. II наук.-практ. Інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 41–42.

9. El Kayal W. M., Severina H. I., Georgiyants V. A. Molecular docking studies of the N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide of the active site of GABAA and GABAAT. *Science and practice 2019 : the 10th International pharmaceutical conference*, Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019. Kaunas, 2019. P. 109.
10. El Kayal Wassim M., Severina H. I. Synthesis of acetamide derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline as perspective anticonvulsants. *Science and modern pharmaceutical manufacturing : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement*, Kyiv, November 21, 2019, «Farmak» JSC, Ukraine; Укр. Мед. Часопис, 6 (134), Т. 2 – XI/XII 2019 с. 17–18.
11. Северина А. И., Ель Кайал В. М., Абу Шарк А., Георгиянц В. А. Дизайн потенциальных антиконвульсантов среди производных хиназолин-4(3H)-онов. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження : матеріали наук.-практ. дистанційної міжнар. конф., присвяч. 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевт. ф-ту, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ : ІФНМУ, 2020. с. 139.*
12. Ель Кайал В. М., Северина А. И., Георгиянц В. А. Синтез 1-бензилзамещенных производных N-[(2,4-дихлорофенил)метил]-2-(2,4-диоксо-1H-хиназолин-3-ил)ацетамида как возможных противосудорожных агентов. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике : сб. матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 138–141.*
13. Severina H. I., El Kayal W. M., abu Shark A., Georgiyants V. A. Synthesis of 1-acetamide derivatives of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide as new anticonvulsant agents. *100 years of success and*

*quality* : materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy. Kharkiv, October 18th, 2021, Kharkiv: НФаУ, 2021. P. 42.

14. Северіна Г., Ель Кайал В., Абу Шарк А., Головченко О., Георгіянц В. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1*H*-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021*: мат. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 82.
15. El Kayal W., Severina H., Golovchenko O., Georgiyants V. Construction, synthesis and prediction of the activity of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives as new anticonvulsants. *Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування*: мат. міжнар. наук.-практ. конф. м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 7–10.



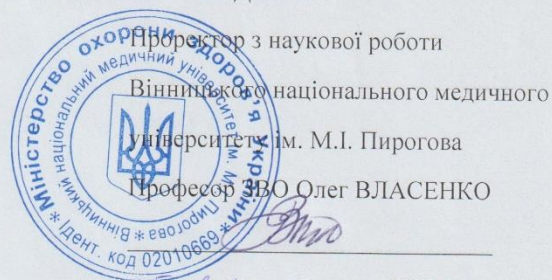
**Продовж. додат. Б**

Основні положення роботи обговорено на науково-практичних конференціях:

1. 9th International Pharmaceutical Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy «*Science and practice 2018*» (Kaunas, November 9, 2018 р., форма участі – публікація тез);
2. XXVI Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів «*Topical issues of new medicines development*» (Харків, 10-12 квіт. 2019 р., форма участі – публікація тез);
3. Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 19-20 вересня 2019 р., форма участі – публікація тез);
4. II Науково-практичних інтернет-конференціях з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 21 листопада 2019 р., форма участі – публікація тез);
5. 10th International pharmaceutical conference «*Science and practice 2019*» (Kaunas, Lithuania, November 15th, 2019 р., форма участі – публікація тез);
6. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «*Science and modern pharmaceutical manufacturing*» (Kyiv, November 21, 2019, «Farmak» JSC, Ukraine, форма участі – публікація тез);
7. Науково-практичній дистанційній міжнародній конференції, присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (Івано-Франківськ, 19-20 травня 2020 р., форма участі – публікація тез);
8. IX Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д.

- Асфендиярова» (г. Алматы, 27 ноября 2020 г. форма участі – публікація тез);
9. International scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy «*100 years of success and quality*» (Kharkiv, October 18th, 2021, форма участі – публікація тез);
10. Северіна Г., Ель Кайал В., Абу Шарк А., Головченко О., Георгіянц В.. Дизайн та синтез похідних 2-(4-оксо-2-тіоксо-1Н-хіназолін-3-іл)-ацетамідів як протисудомних агентів.: Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум – 2021» (м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез);
11. Міжнародна науково-практичній конференції «Протиепілептичні препарати: від дизайну молекули до клінічного застосування» ( м. Харків, 20-21 жовтня 2022 р., форма участі – публікація тез).

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



«5» вересня 2022 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** методики синтезу та оцінка фармакологічної активності похідних 2,4-діоксохіназоліну.
2. **Установа:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, 61002, вул. Пушкінська 53
3. **Автори:** В. Ель Кайал, Г.І. Северіна, В.А. Георгіянци
4. **Джерела інформації:**
  1. El Kayal W.M., Shtrygol S.Y., Zalevskyi S.V., Shark A.A., Tsyvunin V.V., Kovalenko S.M., Bunyatyan N.D., Perekhoda L.O., Severina H.I., Georgiyants V.A. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 134-142.
  2. Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. 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*. 2022. 71. 224-233.
5. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
6. **Форма впровадження:** науковий та навчальний процес кафедри.
7. **Результат впровадження:** удосконалення знань здобувачів освіти та науковців з питань синтезу похідних 2,4-діоксохіназолінів та їх фармакологічної активності.
8. **Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова протокол № 1 від 02 вересня 2022 року.

Завідувач кафедри  
фармацевтичної хімії

доцент ЗВО Тетяна ЮЩЕНКО

«Затверджую»  
 Проректор з наукової роботи  
 Львівського національного медичного  
 університету  
 імені Данила Галицького


д. мед. н., проф. Андрій НАКОНЕЧНИЙ  
 « 5 » березня 2023 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** шляхи одержання, фізико-хімічні властивості та протисудомна активність похідних хіназолін-2,4-діону
2. **Установа:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, 61002, вул. Пушкінська 53
3. **Автори:** В. Ель Кайал, Г.І. Северіна, В.А. Георгіянц
4. **Джерела інформації:**
  1. El Kayal W.M., Shtrygol S.Y., Zalevskiy S.V., Shark A.A., Tsyvunin V.V., Kovalenko S.M., Bunyatyan N.D., Perekhoda L.O., Severina H.I., Georgiyants V.A. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. European Journal of Medicinal Chemistry. 2019. Vol. 180. P. 134-142.
  2. El Kayal, W., Severina, H., Tsyvunin, V., Zalevskiy, S., Shtrygol', S., Vlasov, S., Golovchenko, O., Kovalenko, S., & Georgiyants, V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69.
  3. Shtrygol' S., Zalevskiy S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. 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. 2022. Vol. 71. P.224-233.
5. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.
6. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.
7. **Результат впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань синтезу похідних хіназолін-2,4-діону, умов їх алкілювання та амінування, а також методології пошуку нових біологічно активних речовин.
8. **Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького протокол №14 від 6.03.2023.

Завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, доктор фармацевтичних наук, професор

 Роман ЛЕСИК

«Затверджую»

Проректор закладу вищої освіти з  
наукової роботи

Тернопільського національного  
медичного університету

ім. І. Я. Горбачевського

проф. Кліщ І.М.

« 27 » березня 2023р.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** методики синтезу та *in silico* досліджень для прогнозування протисудомної активності в ряду похідних 2,4-діоксохіназоліну.
2. **Установа:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, 61002, вул. Пушкінська 53
3. **Автори:** В. Ель Кайал, Г.І. Северіна, С.В. Власов, В.А. Георгіянц
4. **Джерело інформації:**  
El Kayal W., Severina, H., Tsyvunin V., Zalevskyi S., Shtrygol' S., Vlasov S., Golovchenko O., Kovalenko S., Georgiyants V. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide novel 1-benzylsubstituted derivatives. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022. Vol. 1(35). P. 58–69.  
Shtrygol' S., Zalevskyi S., Mishchenko M., Shtrygol D., Severina H., El Kayal W., Georgiyants V. 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. 2022. Vol. 71. 224-233.
5. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського.
6. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.
7. **Результат впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань синтезу похідних 2,4-діоксохіназоліну та *in silico* досліджень.
8. **Термін впровадження:** 2022-2023 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського протокол №4 від 26.03.2023 р.

Завідувачка кафедри фармацевтичної хімії  
Тернопільського національного  
медичного університету  
ім. І. Я. Горбачевського,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Л.С. Логойда

