

Є. В. Гринишин<sup>1,2</sup>, Г. Р. Мусійчук<sup>2</sup>, Н. М. Цизорик<sup>2</sup>, А. М. Грозав<sup>3</sup>, Н. Д. Яковичук<sup>3</sup>,  
А. В. Больбут<sup>2</sup>, М. В. Вовк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний університет «Києво-Могилянська академія»

04655, м. Київ, вул. Григорія Сковороди, 2. E-mail: yevhenii.hrynyshyn@ukma.edu.ua

<sup>2</sup> Інститут органічної хімії НАН України

<sup>3</sup> ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»

## Синтез, протибактеріальна та протигрибкова дія нових 4-амінозаміщених піразоло[1,5-а]піразинів

**Мета роботи** – створення препаративно зручного способу одержання нових похідних 4-амінопіразоло[1,5-а]піразинів та скринінг їх протибактеріальних і протигрибкових властивостей.

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що 4-хлоропіразоло[1,5-а]піразини селективно реагують із різноманітними алкіламінами з утворенням з високими виходами відповідних 4-амінопіразоло[1,5-а]піразинів. Біологічний скринінг синтезованих похідних дозволив виявити сполуки з протибактеріальною та протигрибковою активністю в концентраціях 31,25-250 мкг/мл.

**Експериментальна частина.** Взаємодією 4-хлоропіразоло[1,5-а]піразинів із первинними та вторинними алкіламінами за кімнатної температури або при кип'ятінні в етанолі отримані нові похідні 4-амінопіразоло[1,5-а]піразинів, будова яких доведена методами ЯМР <sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C) спектроскопії та хроматомас-спектрометрії. Результати мікробіологічного скринінгу з використанням мікрометоду дворазових серійних розведень у рідкому поживному середовищі показали, що синтезовані сполуки виявляють помірну бактерицидну дію.

**Висновки.** Знайдено, що реакція 4-хлоропіразоло[1,5-а]піразинів із первинними та вторинними алкіламінами є зручним методом синтезу амінопіразоло[1,5-а]піразинів, які виявляють помірну антимікробну активність по відношенню до бактерій *S. aureus* 209, *B. subtilis* ATCC6633, *M. luteus* 4698 та грибів *C. ablicans* 669/1080 і *C. krusei* ATCC 6258.

**Ключові слова:** електрофільні субстрати; амінування; 4-амінопіразоло[1,5-а]піразини; протибактеріальна та протигрибкова активність

Ye. V. Hrynyshyn, H. R. Musiichuk, N. M. Tsyzyryk, A. M. Grozav, N. D. Yakovychuk,  
A. V. Bol'but, M. V. Vovk

### Synthesis, the antibacterial and antifungal action of 4-aminopyrazolo[1,5-a]pyrazines

**Aim.** To create a convenient preparative method for the synthesis of new 4-aminopyrazolo[1,5-a] pyrazines derivatives and perform the screening of their antibacterial and antifungal properties.

**Results and discussion.** It was determined that 4-chloropyrazolo[1,5-a]pyrazines selectively reacted with various alkylamines producing the corresponding 4-aminopyrazolo[1,5-a]pyrazines with high yields. The biological screening of the derivatives synthesized allowed us to identify compounds with the antibacterial and antifungal activity in the concentrations of 31.25-250 µg/ml.

**Experimental part.** The new 4-aminopyrazolo[1,5-a]pyrazines derivatives were produced by the reaction of 4-chloropyrazolo[1,5-a]pyrazines with the primary and secondary alkylamines at room temperature or by refluxing in ethanol. The structures of the compounds synthesized were confirmed with <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR-spectra and mass spectra. The results of the microbiological screening using a micromethod of double serial dilutions in a liquid nutrient medium showed that the compounds synthesized exhibited a moderate bactericidal activity.

**Conclusions.** It has been found that the reaction of 4-chloropyrazolo[1,5-a]pyrazines with the primary and secondary alkylamines is a convenient method for the synthesis of aminopyrazolo[1,5-a]pyrazines that exhibit a moderate antimicrobial activity against *S. aureus* 209, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 4698 (bacteria) and the antifungal activity against *C. ablicans* 669/1080 and *C. krusei* ATCC 6258 (fungi).

**Key words:** electrophilic substrates; amination; 4-aminopyrazolo[1,5-a]pyrazines; antibacterial and antifungal activity

Е. В. Гринишин, А. Р. Мусійчук, Н. М. Цизорик, А. Н. Грозав, Н. Д. Яковичук,  
А. В. Больбут, М. В. Вовк

### Синтез, протибактериальное и противогрибковое действие 4-аминопиразоло[1,5-а]пиразинов

**Цель работы** – создание препаративно удобного способа получения новых производных 4-аминопиразоло[1,5-а] пиразинов и скрининг их протибактериальных и противогрибковых свойств.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что 4-хлорпиразоло[1,5-а]пиразини селективно реагируют с разнообразными алкіламінами с образованием с высокими выходами соответствующих 4-аминопиразоло[1,5-а]пиразинов. Биологический скрининг синтезированных производных позволил выявить соединения с протибактериальной и противогрибковой активностью в концентрациях 31,25-250 мкг/мл.

**Экспериментальная часть.** Взаимодействием 4-хлорпиразоло[1,5-а]пиразинов с первичными и вторичными алкіламінами при комнатной температуре или при кипячении в этаноле получены новые производные 4-хлорпиразоло[1,5-а]пиразинов, строение которых доказано методами ЯМР <sup>1</sup>H (<sup>13</sup>C) спектроскопии и хроматомас-спектрометрии. Результаты микробиологического скрининга с использованием микрометода двухразовых серийных разбавлений в жидкой питательной среде показали, что синтезированные соединения обладают умеренным бактерицидным действием.

**Выводы.** Найдено, что реакція 4-хлорпіразоло[1,5-а]піразинів з первичними і вторичними алкіламінами являється зручним методом синтезу амінопіразоло[1,5-а]піразинов, які проявляють умеренну протимікробну активність по відношенню до бактерій *S. aureus* 209, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 4698 і грибів *C. ablicans* 669/1080 і *C. krusei* ATCC 6258.

**Ключевые слова:** электрофильные субстраты; аминирование; 4-аминопиразоло[1,5-а]пиразини; протибактериальная и противогрибковая активность

Біциклічна система піразоло[1,5-*a*]піразину в останні роки інтенсивно використовується як ефективний скафолд для конструювання нових типів біологічно активних сполук. В сенсі молекулярної архітектури така інноваційна технологія зазвичай реалізується шляхом структурної модифікації як азольного, так і азинового ядер. Детальний аналіз літературних джерел засвідчує, що серед лінійно модифікованих піразоло[1,5-*a*]піразинів [1-3] особлива роль у контексті фармакологічної дії належить їх 4-амінофункціоналізованим похідним. Серед них виявлені інгібітори протеїн- і ліпідкіназ [4-6] та хемокінінових рецепторів [7], які можуть бути використані для створення протипухлинних препаратів, інгібітори глікогенсинтазкінази [8] як перспективні гематологічні субстанції, а також антагоністи орексинових рецепторів [9] для лікування та попередження неврологічних і психіатричних захворювань. Разом з тим, найпростіші представники 4-амінопіразоло[1,5-*a*]піразинів, які не містять додаткових функціональних груп у піразольному та піразиновому ядрах, ще й досі не описані. Саме тому предметом даного повідомлення став синтез та скринінг антимікробних властивостей такого типу структур.

Як базові електрофільні субстрати для амінофункціоналізації були використані нещодавно [10] синтезовані нами 4-хлоропіразоло[1,5-*a*]піразини **1a,b**, у взаємодію з якими вводили первинні **2a-e** та вторинні **2f-h** аміни. Оптимальними умовами перебігу їх реакції з *N*-метил- та *N,N*-диметиламинами **2a,f** або водним розчином *N*-етиламіну **2b** виявилось перемішування реакційних сумішей впродовж 12 годин за кімнатної температури. Натомість при використанні інших амінів **2c-e**, **g,h** для повного завершення реакції необхідне 3-6-годинне нагрівання реагентів у киплячому етанолі. При цьому виходи цільових продуктів **3a-k** складали 52-88 % (схема).

Склад та структура 4-амінопохідних **3a-k** надійно встановлені методами хроматомас-спектрометрії та ЯМР  $^1\text{H}$  ( $^{13}\text{C}$ ) спектроскопії. Показово, що у спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  за рахунок донорного впливу аміногрупи спостерігається зсув сигналів атомів  $\text{C}^4$  на 4-10 м. ч. у слабке поле порівняно із сигналами

аналогічних атомів у відповідних 4-хлоропіразоло[1,5-*a*]піразинах [10].

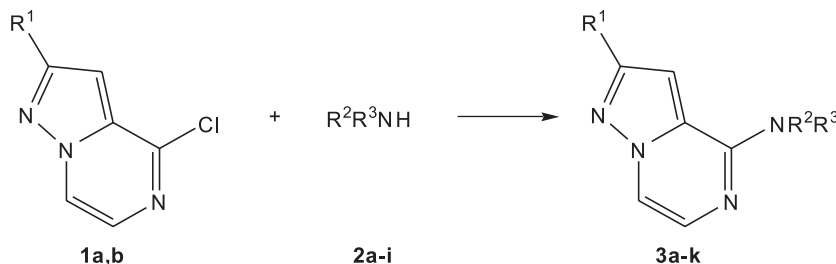
Протибактеріальна та антимікробна активність піразоло[1,5-*a*]піразинів **3a-k** була оцінена за величиною мінімальних бактеріостатичної (МБСК) та бактерицидної (МБЦК) чи фунгістатичної (МФСК) та фунгіцидної (МФЦК) концентрацій по відношенню до ряду бактерій та грибів. Проведений біоскринінг показав, що 4-амінозаміщені піразоло[1,5-*a*]піразини **3a-k** характеризуються помірно протибактеріальною та протигрибковою активністю, МБСК та МФСК знаходяться в діапазоні концентрацій 31,25-250 мкг/мл (табл. 1-4). Найактивнішою виявилась сполука **3c** по відношенню до штаму *Micrococcus luteus* ATCC 4698, МБСК та МБЦК для якої становить 31,25 мкг/мл. Аналіз отриманих результатів дає підстави стверджувати, що замісник у положенні 4 піразоло[1,5-*a*]піразинів **3a-k** суттєво не впливає на силу і характер протигрибкової та протибактеріальної активності.

### Експериментальна хімічна частина

Спектри ЯМР  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  отримані на спектрометрі Varian VXR-400 (399.97 і 125.74 відповідно) у розчині  $\text{DMSO-}d_6$ , внутрішній стандарт ТМС. Хроматомас-спектри одержані на приладі Agilent 1100/DAD/HSD/VLG119562. Температури плавлення визначені на столику Кофлера і невідкореговані.

**4-Хлоропіразоло[1,5-*a*]піразини 1a,b** синтезовані за методом [10].

**4-Амінопіразоло[1,5-*a*]піразини 3a,f,i**. До 7 мл 20 %-вого розчину  $\text{MeNH}_2$  в метанолі (для **3a,i**) або 7 мл 40 %-вого розчину  $\text{Me}_2\text{NH}$  у воді (для **3f**) при перемішуванні додавали 2,0 ммоль 4-хлоропіразоло[1,5-*a*]піразину **1a** (для **3a,f**) або 2-метил-4-хлоропіразоло[1,5-*a*]піразину **1b** (для **3i**). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі впродовж 12 год, упарювали, додавали 7 мл ацетонітрилу, відфільтровували гідрохлорид відповідного аміну, фільтрат упарювали. Сполуку **3i** висушували у вакуумі водоструминного насосу. До сполук **3a,f** додавали 5 мл діоксану, насиченого  $\text{HCl}$ , перемішували впродовж 30 хв, відфільтровували утворений осад та висушували у вакуумі водоструминного насосу.



**1**:  $\text{R}^1 = \text{H}$  (a),  $\text{Me}$  (b); **2**:  $\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}^3 = \text{Me}$  (a),  $\text{Et}$  (b),  $\text{PhCH}_2$  (c), *цикло*- $\text{C}_3\text{H}_5\text{CH}_2$  (d),  $\text{Et}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$  (e),  $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Me}$  (f),  $\text{R}^2\text{R}^3 = (\text{CH}_2)_4$  (g),  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$  (h); **3**:  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}^3 = \text{Me}$  (a),  $\text{Et}$  (b),  $\text{PhCH}_2$  (c), *цикло*- $\text{C}_3\text{H}_5\text{CH}_2$  (d),  $\text{Et}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$  (e);  $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Me}$  (f);  $\text{R}^2\text{R}^3 = (\text{CH}_2)_4$  (g),  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$  (h);  $\text{R}^1 = \text{Me}$ ,  $\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}^3 = \text{Me}$  (i);  $\text{R}^2\text{R}^3 = (\text{CH}_2)_4$  (j),  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$  (k).

Схема

Таблиця 1

Виходи, температури плавлення, мас-спектри та результати елементного аналізу сполук **3a-k**

Сполука	Вихід, %	Т. пл., °С	[M+1] <sup>+</sup>	Знайдено, %			Формула	Розраховано, %		
				С	Н	N		С	Н	N
<b>3a</b>	69	169-171	185	45,79	5,11	30,10	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub>	45,54	4,91	30,35
<b>3b</b>	88	103-105	163	59,38	6,01	34,31	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub>	59,24	6,21	34,54
<b>3c</b>	53	88-90	225	69,41	5,21	25,18	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	69,62	5,39	24,98
<b>3d</b>	79	олія	189	63,64	6,60	29,86	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	63,81	6,43	29,77
<b>3e</b>	52	олія	234	61,98	8,31	29,81	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub>	61,77	8,21	30,02
<b>3f</b>	61	173-175	199	48,54	5,45	28,01	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	48,37	5,58	28,20
<b>3g</b>	58	101-103	189	64,01	6,30	29,69	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	63,81	6,43	29,77
<b>3h</b>	70	86-88	205	59,07	6,05	27,26	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	58,81	5,92	27,43
<b>3i</b>	81	65-67	163	59,47	6,19	34,37	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub>	59,24	6,21	34,54
<b>3j</b>	87	110-115	203	65,54	7,15	27,81	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub>	65,32	6,98	27,70
<b>3k</b>	73	75-77	219	60,79	6,57	25,52	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O	60,53	6,47	25,67

**4-(N-Етиламіно)піразоло[1,5-a]піразин 3b.**

До суміші 5 мл 70 %-вого водного EtNH<sub>2</sub> та 5 мл етанолу при перемішуванні додавали 0,31 г (2,0 ммоль) 4-хлоропіразоло[1,5-a]піразину **1a**. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі впродовж 12 год, упарювали, додавали 10 мл етилацетату, доводили до кип'ятіння, охолоджували і відфільтровували осад гідрохлориду етиламіну. Фільтрат упарювали, отриманий продукт висушували у вакуумі водоструминного насосу.

**4-Амінопіразоло[1,5-a]піразини 3c-e,g,h,j,k.**

До розчину 5,0 ммоль аміну **2c-e,g,h** в 5 мл етанолу додавали 2,0 ммоль 4-хлоропіразоло[1,5-a]піразину **1a,b** і кип'ятили впродовж 3 год (для **3g**), 4 год (для **3h,j**), 5 год (для **3c,d,k**) та 6 год (для **3e**). Реакційну суміш упарювали, додавали 10 мл етилацетату, 6 мл 2н HCl, органічний шар відділяли, висушували над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарювали, отриманий твердий продукт висушували у вакуумі водоструминного насосу.

Таблиця 2

Дані спектрів ЯМР <sup>1</sup>H сполук **3a-k**

Сполука	ЯМР <sup>1</sup> H спектр, δ, м.ч. (J, Гц)
<b>3a</b>	3,17 с (3H, CH <sub>3</sub> ), 7,19 д (1H, <sup>3</sup> J = 5,0, H-7), 7,78 д (1H, <sup>3</sup> J = 1,6, H-3), 8,09-8,14 м (2H, H-2, H-6), 10,89 ш. с (1H, NH)
<b>3b</b>	1,20 т (3H, J = 7,2, CH <sub>3</sub> ), 3,42-3,50 м (2H, CH <sub>2</sub> ), 7,00 д (1H, J = 1,0, H-3), 7,24 д (1H, J = 4,4, H-7), 7,74 ш. с (1H, NH), 7,84-7,90 м (2H, H-2, H-6)
<b>3c</b>	4,69 с (2H, CH <sub>2</sub> ), 7,05 д (1H, J = 1,4, H-3), 7,19-7,27 м (2H, H-7, H <sub>аром</sub> ), 7,28-7,38 м (4H, H <sub>аром</sub> ), 7,87-7,94 м (2H, H-2, H-6), 8,19 ш. с (1H, NH)
<b>3d</b>	0,19-0,29 м (2H, 2CH), 0,39-0,49 м (2H, 2CH), 1,09-1,18 м (1H, CH), 3,32-3,36 м (2H, CH <sub>2</sub> ), 7,02 д (1H, J = 1,2, H-3), 7,25 д (1H, J = 4,5, H-7), 7,64 ш. с (1H, NH), 7,82-7,90 м (2H, H-2, H-6)
<b>3e</b>	0,92 т (6H, J = 7,0, 2 CH <sub>3</sub> ), 2,51 к (4H, J = 7,0, 2 CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,61 т (2H, J = 6,0, CH <sub>2</sub> ), 3,47-3,54 м (2H, CH <sub>2</sub> ), 6,94 д (1H, J = 1,2, H-3), 7,26 д (1H, J = 4,8, H-7), 7,46 ш. с (1H, NH), 7,83-7,90 м (2H, H-2, H-6)
<b>3f</b>	3,56 с (6H, 2 CH <sub>3</sub> ), 7,20 д (1H, J = 5,5, H-7), 7,61 д (1H, J = 2,0, H-3), 8,15 д (1H, J = 5,5, H-6), 8,20 д (1H, J = 2,0, H-2)
<b>3g</b>	1,93-2,00 м (4H, 2CH <sub>2</sub> ), 3,71-3,79 м (4H, 2CH <sub>2</sub> N), 6,99 д (1H, J = 1,0, H-3), 7,26 д (1H, J = 4,0, H-7), 7,86-7,94 м (2H, H-2, H-6)
<b>3h</b>	3,66 т (4H, J = 5,0, 2CH <sub>2</sub> N), 3,74 т (4H, J = 5,0, 2CH <sub>2</sub> O), 6,99 с (1H, H-3), 7,39 д (1H, J = 4,5, H-7), 7,99 с (1H, H-2), 8,13 д (1H, J = 4,5, H-6)
<b>3i</b>	2,34 с (3H, 2-CH <sub>3</sub> ), 2,91 д (3H, J = 5,0, NCH <sub>3</sub> ), 6,67 с (1H, H-3), 7,19 д (1H, J = 4,5, H-7), 7,55 ш. с (1H, NH), 7,75 д (1H, J = 4,5, H-6)
<b>3j</b>	1,91-1,98 м (2H, 2CH <sub>2</sub> ), 2,35 с (3H, 2-CH <sub>3</sub> ), 3,67-3,75 м (2H, 2CH <sub>2</sub> N), 6,75 д (1H, J = 1,2, H-3), 7,18 д (1H, J = 4,8, H-7), 7,75 д (1H, J = 4,8, H-6)
<b>3k</b>	2,38 с (3H, 2-CH <sub>3</sub> ), 3,62 т (4H, J = 5,2, 2CH <sub>2</sub> N), 3,73 т (4H, J = 5,2, 2CH <sub>2</sub> O), 6,78 с (1H, H-3), 7,33 д (1H, J = 4,4, H-7), 8,03 д (1H, J = 4,4, H-6)

Таблиця 3

Дані спектрів ЯМР  $^{13}\text{C}$  сполук **3a-k**

Сполука	ЯМР $^{13}\text{C}$ спектри, $\delta$ , м.ч.
<b>3a</b>	30,0 (CH <sub>3</sub> ), 101,6 (C <sup>3</sup> ), 114,8 (C <sup>7</sup> ), 115,8 (C <sup>6</sup> ), 127,1 (C <sup>3a</sup> ), 142,5 (C <sup>2</sup> ), 147,8 (C <sup>4</sup> )
<b>3b</b>	14,9 (CH <sub>3</sub> ), 35,5 (CH <sub>2</sub> ), 98,7 (C <sup>3</sup> ), 112,7 (C <sup>7</sup> ), 112,8 (C <sup>6</sup> ), 127,8 (C <sup>3a</sup> ), 140,2 (C <sup>2</sup> ), 150,6 (C <sup>4</sup> )
<b>3c</b>	43,7 (CH <sub>2</sub> ), 98,3 (C <sup>3</sup> ), 113,1 (C <sup>7</sup> ), 127,2 (C <sup>6</sup> ), 127,7 (C <sub>аром.</sub> ), 127,8 (C <sup>3a</sup> ), 128,4 (C <sub>аром.</sub> ), 128,7 (C <sub>аром.</sub> ), 140,2 (C <sup>2</sup> ), 140,3 (C <sub>аром.</sub> ), 150,7 (C <sup>4</sup> )
<b>3d</b>	4,0 (2CH <sub>2</sub> ), 11,1 (CH), 42,3 (CH <sub>2</sub> ), 98,3 (C <sup>3</sup> ), 112,7 (C <sup>7</sup> ), 127,8 (C <sup>3a</sup> ), 128,4 (C <sup>6</sup> ), 139,9 (C <sup>2</sup> ), 151,1 (C <sup>4</sup> )
<b>3e</b>	12,2 (2CH <sub>3</sub> ), 39,1 (NHCH <sub>2</sub> ), 47,3 (2CH <sub>2</sub> ), 51,8 (NCH <sub>2</sub> ), 97,8 (C <sup>3</sup> ), 112,5 (C <sup>7</sup> ), 127,8 (C <sup>3a</sup> ), 128,4 (C <sup>6</sup> ), 140,0 (C <sup>2</sup> ), 151,1 (C <sup>4</sup> )
<b>3f</b>	43,2 (CH <sub>3</sub> ), 109,4 (C <sup>3</sup> ), 114,9 (C <sup>7</sup> ), 116,9 (C <sup>6</sup> ), 126,8 (C <sup>3a</sup> ), 142,3 (C <sup>2</sup> ), 148,8 (C <sup>4</sup> )
<b>3g</b>	25,4 (2CH <sub>2</sub> ), 48,6 (2CH <sub>2</sub> N), 100,7 (C <sup>3</sup> ), 112,4 (C <sup>7</sup> ), 127,8 (C <sup>3a</sup> ), 128,8 (C <sup>6</sup> ), 139,7 (C <sup>2</sup> ), 150,6 (C <sup>4</sup> )
<b>3h</b>	47,6 (2CH <sub>2</sub> N), 66,5 (2CH <sub>2</sub> O), 100,7 (C <sup>3</sup> ), 115,3 (C <sup>7</sup> ), 127,4 (C <sup>6</sup> ), 128,1 (C <sup>3a</sup> ), 140,5 (C <sup>2</sup> ), 152,9 (C <sup>4</sup> )
<b>3i</b>	14,0 (2-CH <sub>3</sub> ), 27,8 (NCH <sub>3</sub> ), 97,1 (C <sup>3</sup> ), 112,3 (C <sup>7</sup> ), 127,5 (C <sup>6</sup> ), 128,5 (C <sup>3a</sup> ), 148,9 (C <sup>4</sup> ), 151,0 (C <sup>2</sup> )
<b>3j</b>	13,8 (2-CH <sub>3</sub> ), 25,5 (2CH <sub>2</sub> ), 48,6 (2CH <sub>2</sub> N), 99,8 (C <sup>3</sup> ), 112,2 (C <sup>7</sup> ), 128,0 (C <sup>6</sup> ), 128,6 (C <sup>3a</sup> ), 148,6 (C <sup>2</sup> ), 150,2 (C <sup>4</sup> )
<b>3k</b>	13,9 (2-CH <sub>3</sub> ), 47,6 (2CH <sub>2</sub> N), 66,6 (2CH <sub>2</sub> O), 99,6 (C <sup>3</sup> ), 115,1 (C <sup>7</sup> ), 126,7 (C <sup>6</sup> ), 128,7 (C <sup>3a</sup> ), 149,5 (C <sup>2</sup> ), 152,1 (C <sup>4</sup> )

**Експериментальна біологічна частина**

Дослідження протигрибової та протибактеріальної дії отриманих сполук проводили із використанням мікрометоду дворазових серійних розведень у рідкому поживному середовищі [11]. Визначали мінімальні бактеріостатичні (МБСК) та бактерицидні (МБЦК) чи фунгістатичні (МФСК) та фунгіцидні (МФЦК) концентрації 4-амінозаміщених піразоло[1,5-*a*]піразинів **3a-k** щодо референс-штамів бактерій (*S. aureus* 209, *M. luteus* ATCC 4698,

*B. subtilis* ATCC 6633) та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (*C. albicans* 669/1080 та *C. krusei* ATCC 6258). До стерильних 96 лункових полістиролових планшетів вносили по 0,05 мл 4-годинної культури мікроорганізмів (для грибів використовували 10<sup>3</sup> КУО/мл у рідкому середовищі Сабуро, а для бактерій в 1 мл м'ясо-пептонного бульйону містилося 10<sup>5</sup> КУО/мл). Суспензію досліджуваних мікроорганізмів (інокулюму) готували з добової культури. Петлею для посівів відбирали кілька однотипних ізольованих колоній, пере-

Таблиця 4

Протибактеріальна та протигрибкова активність сполук **3a-k**

Сполуки	Тестові культури мікроорганізмів									
	<i>S. aureus</i> 209		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>M. luteus</i> ATCC 4698		<i>C. albicans</i> 669/1080		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	Концентрація препаратів (мкг/мл)									
	МБСК	МБЦК	МБСК	МБЦК	МБСК	МБЦК	МФСК	МФЦК	МФСК	МФЦК
<b>3a</b>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3b</b>	62,5	125	125	250	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5
<b>3c</b>	62,5	125	125	250	31,25	31,25	62,5	125	62,5	62,5
<b>3d</b>	62,5	125	125	250	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5
<b>3e</b>	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3f</b>	62,5	125	125	250	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3g</b>	125	125	62,5	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5
<b>3h</b>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3i</b>	125	125	125	125	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3j</b>	62,5	125	125	125	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>3k</b>	62,5	125	125	250	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5
<b>*Контроль</b>	31,25	125	31,25	62,5	31,25	125	15,62	31,25	1,95	1,95

Примітка: \* – як контроль використовували препарат «Кетодин» виробництва Спільного українсько-іспанського підприємства «Сперко Україна» (вагінальні супозиторії), м. Вінниця



носили незначну кількість матеріалу в пробірку зі стерильним фізіологічним розчином і за допомогою денситометра (DEN-1 Biosan) отримували суспензію мікроорганізмів у концентрації  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл, яка відповідає стандарту мутності 0,5 за МакФарландом. Потім не пізніше як через 15 хв десятикратними розведеннями в поживному середовищі отримували необхідну роботу мікробну суспензію. Готували розчини досліджуваних сполук **3a-k** для мікрометоду серійних розведень (у концентрації 1000 мкг/мл), використовуючи як розчинник ДМСО. Основні робочі розчини зберігали при температурі не вище 20 °С. В першу лунку вносили 0,05 мл матричного розчину дослідної речовини, після перемішування переносили по 0,05 мл у наступні лунки першого ряду, в такий спосіб отримували розведення від 500 мкг/мл до 0,24 мкг/мл. Після цього планшету з посівами бактерій поміщали у вологу камеру в термостат при температурі 37 °С, інкубували впродовж 24 год (для грибів – відповідно 28 °С, 48 год).

Найменшу концентрацію досліджуваної речовини, у присутності якої не спостерігався ріст культури, приймали за бактеріостатичну чи фунгістатичну (МБСК, МФСК) концентрацію, а мінімальні

бактерицидні чи фунгіцидні (МБЦК, МФЦК) визначали шляхом висіву вмісту лунок планшету з розведеннями на відповідні щільні поживні середовища (для бактерій – м'ясо-пептонний агар, для дріжджоподібних грибів – щільне середовище Сабуро). За результатами росту на відповідних середовищах встановлювали мінімальну бактерицидну (фунгіцидну) концентрацію дослідних сполук.

Усі досліді супроводжувалися відповідними видами контролю (контролем середовища на стерильність, контролем росту культури в середовищі без сполуки, контролем росту культури в середовищі з розчинником /ДМСО/), а з метою отримання достовірних результатів експерименти проводилися тричі з кожною концентрацією сполуки та досліджуваною культурою мікроорганізмів.

## Висновки

Знайдено, що реакція 4-хлоропіразоло[1,5-*a*]піразинів із первинними та вторинними алкіламінами є зручним методом синтезу амінопіразоло[1,5-*a*]піразинів, які виявляють помірну антимікробну активність по відношенню до бактерій *S. aureus* 209, *B. subtilis* ATCC6633, *M. luteus* 4698 та грибів *C. ablicans* 669/1080 і *C. krusei* ATCC 6258.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Перелік використаних джерел інформації

1. Pat. WO 119916. Compounds for treating spinal muscular atrophy / Qi H., Choi S., Dakka A. et al. – Declared : 08.02.2013 ; published : 15.08.2013.
2. Discovery and optimization of small molecule splicing modifiers of survival motor neuron 2 as a treatment for spinal muscular atrophy / M. G. Woll, H. Qi, A. Turpoff et al. // J. Med. Chem. – 2016. – Vol. 59, Issue 13. – P. 6070–6085. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00460>
3. Solvent-free microwave-assisted synthesis of tetrahydrooxazolo[3,2-*a*]pyrazolo[1,5-*d*]pyrazin-5-ones / S.-L. Shen, L.-W. Zheng, S.-Q. Wang et al. // ARKIVOC. – 2013. – Vol. 2013, Issue 4. – P. 44–56. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p008.083>
4. Pat. WO 141713. New bicyclic compounds as PI3-K and mTOR inhibitors / Pastor F. J., Martinez G. S., Rodrigues H. A. et al. – Declared : 13.05.2011 ; published : 17.11.2011.
5. Pat. WO 089400. Inhibitors of PI3 kinase / Pastor F. J., Martinez G. S., Alvarez E. R. M. et al. – Declared : 24.01.2011 ; published : 28.07.2011.
6. Identification of novel PI3K inhibitors through a scaffold hopping strategy / S. M. Martinez, A. I. Hernandez, R. M. Alvarez et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – Vol. 27, Issue 21. – P. 4794–4799. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.059>
7. Pat. US 154179. CXCR7 antagonists / Fan J., Krasinski A., Lange C. W. et al. – Declared : 27.11.2013 ; published : 05.07.2014.
8. Pat. US 053929. Imidazo-, pyrazolopyrazines and imidazotriazines and their use / Siegel S., Wilman A., Roehrig S. et al. – Declared : 28.06.2008 ; published : 03.03.2011.
9. Pat. WO 085784. Methyl diazepane orexin receptors antagonists / Kuduk S. D., Reger T. S., Skudlarek J. W. – Declared : 20.11.2015 ; published : 02.06.2016.
10. Синтез 8*H*-піразоло[5',1':3,4]піразино[2,1-*b*]хіназолін-8-онов / Є. В. Гринишин, Н. М. Цизорик, Г. Р. Мусійчук та ін. // Хім. гетероцикл. соед. – 2017. – Т. 53, № 11. – С. 1242–1247.
11. Методичні вказівки 9.9.5-143-2007 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – К.: МОЗ України, 2007. – 63 с.

## References

1. Qi, H., Choi, S., Dakka, A., Karp, A., Narasimhan, G. M., Naryshkin, J., ... Ratn, H. (2013). *Compounds for treating spinal muscular atrophy*. Pat. WO 119916; declared 08.02.2013; published 15.08.2013.
2. Woll, M. G., Qi, H., Turpoff, A., Zhang, N., Zhang, X., Chen, G., ... Karp, G. M. (2016). Discovery and Optimization of Small Molecule Splicing Modifiers of Survival Motor Neuron 2 as a Treatment for Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 6070–6085. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00460>
3. Solvent-free microwave-assisted synthesis of tetrahydrooxazolo[3,2-*a*]pyrazolo[1,5-*d*]pyrazin-5-ones. (2013). *Arkivoc*, 2013(4), 44. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p008.083>
4. Pastor, F. J., Martinez, G. S., Rodrigues, H. A., Ramos, L., Alvarez, E., Higuera, H. (2011). *New bicyclic compounds as PI3-K and mTOR inhibitors*. Pat. WO 141713; declared 13.05.2011; published 17.11.2011.
5. Pastor, F. J., Martinez, G. S., Rodrigues, H. A., Ramos, L., Alvarez, E., Higuera, H. (2011). *Inhibitors of PI3 kinase*. Pat. WO 089400; declared 24.01.2011; published 28.07.2011.
6. Martínez González, S., Hernández, A. I., Álvarez, R. M., Rodríguez, A., Ramos-Lima, F., Bischoff, J. R., ... Pastor, J. (2017). Identification of novel PI3K inhibitors through a scaffold hopping strategy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(21), 4794–4799. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.059>
7. Fan, J., Krasinski, A., Lange, C. W., Lui, R. L., McMahon, J. P., Powers, J. P., Zeng, Y., Zhang, P. (2014). *CXCR7 antagonists*. Pat. US 154179; declared 27.11.2013; published 05.07.2014.
8. Siegel, S., Wilman, A., Roehrig, S., Svenstrup, N., Gnoth, M. J., Heitmeier, S., ... Gerisch, M. (2011). *Imidazo-, pyrazolopyrazines and imidazotriazines and their use*. Pat. US 053929; declared 28.06.2008; published 03.03.2011.
9. Kuduk, S. D., Reger, T. S., Skudlarek, J. W. (2016). *Methyl diazepane orexin receptors antagonists*. Pat. WO 085784; declared 20.11.2015; published 02.06.2016.
10. Hrynshyn, Ye. V., Tsyzyryk, N. M., Musiichuk, H. R., Bolbut, A. V., Vovk, M. V. (2017). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 53 (11), 1242–1247.
11. Методичні вказівки 9.9.5-143-2007. (2007). «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». Київ: МОЗ України, 63.