

УДК 547.77 + 547.866 + 615.31

Є.В.Гринишин^{1,3*}, Г.Р.Мусійчук³, О.З.Комаровська-Порохнявець²,
О.П.Іськів², Н.І.Москаленко², М.В.Стасевич², Н.М.Цизорик³, М.В.Вовк³

СИНТЕЗ ТА ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ 4-АРИЛТІО- ТА 4-АЛКІЛТІОФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ПІРАЗОЛО[1,5-*a*]ПІРАЗИНІВ

¹ Національний університет “Києво-Могилянська академія”,
вул. Г.Сковороди, 2, Київ, 04655, Україна

² Національний університет “Львівська політехніка”,
вул. С.Бандери, 12, Львів, 79013, Україна

³ Інститут органічної хімії НАН України, вул. Мурманська, 5, Київ, 02660, Україна
* e-mail: yevhenii.hrynyshyn@ukma.edu.ua

Взаємодією 4-бромопіразоло[1,5-*a*]піразинів із тіофенолами та піразоло[1,5-*a*]піразин-4(5*H*)-тіонів із функціоналізованими бромалканами синтезовано нові 4-арилтіо- та 4-алкілтіопіразоло[1,5-*a*]піразини. В ряду отриманих сполук виявлено речовини із вираженою антибактеріальною активністю по відношенню до штамів *S. aureus* та *M. luteum* та проти-грибковою дією стосовно штаму *A. niger*.

К л ю ч о в і с л о в а: 4-бромопіразоло[1,5-*a*]піразини, піразоло[1,5-*a*]піразин-4(5*H*)тіони, тіофеноли, функціоналізовані бромалкани, 4-арил(алкіл) тіопохідні піразоло[1,5-*a*]піразинів, антибактеріальна та протигрибкова активність.

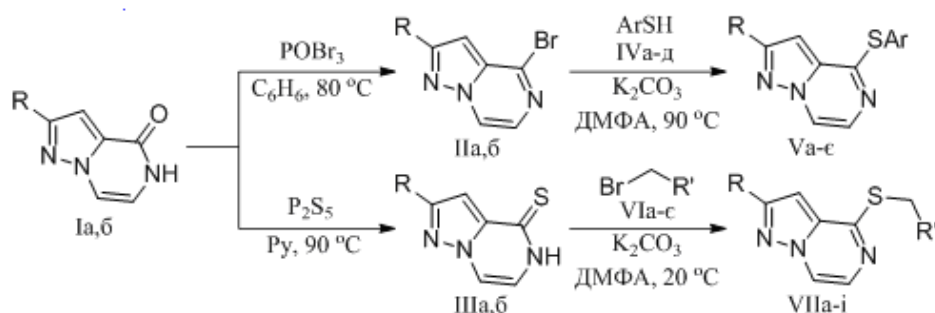
ВСТУП. Піразоло[1,5-*a*]піразини відносяться до важливого типу конденсованих гетероциклічних сполук із потужним синтетичним та медико-біологічним потенціалом [1]. Наявність у їх структурі декількох атомів азоту істотно позначається на модуляції фізико-хімічних властивостей (ліпофільність, полярність, здатність до формування водневих зв'язків), які є вкрай суттєвими при створенні нових фармацевтичних субстанцій [2]. Проведені впродовж останнього десятиріччя дослідження сприяли виявленню в ряду піразоло[1,5-*a*]піразинів інгібіторів декількох видів кіназ [3–6], агоністів допамінового рецептора [7], антагоністів вазопресинового V1b [8, 9] та орексинового [10] рецепторів.

Сучасні методології розроблення нових біоактивних сполук на основі піразоло[1,5-*a*]піразиного скафолда зазвичай ґрунтуються на біоструктурній модифікації положення 4 його біциклічної системи [11–13]. Такий підхід виявився продуктивним для конструювання ни-

зки 4-тіозаміщених піразоло[1,5-*a*]піразинів та їх конденсованих аналогів як потенційних агентів для лікування неврологічних, психіатричних [10] та протизапальних [14–16] захворювань. Саме тому доцільним, з нашого погляду, є синтез нових типів 4-арилтіо- та 4-алкілтіопіразоло[1,5-*a*]піразинів та дослідження деяких видів їх біологічної дії.

ЕКСПЕРИМЕНТ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ. У ролі базових об'єктів для спрямованих синтетичних перетворень були використані нещодавно синтезовані нами [17] піразоло[1,5-*a*]піразин-4(5*H*)-они (I а,б), взаємодією яких із трибромоксидом фосфору в киплячому бензені були отримані 4-бромопіразоло[1,5-*a*]піразини (II а,б), а тіонуванням пентасульфідом фосфору в піридині при 90 °С — піразоло[1,5-*a*]піразин-4(5*H*)-тіони (III а,б). Сполуки II а,б є електрофільними, а III а,б — нуклеофільними субстратами, подальшу структурну модифікацію яких в першому випадку доцільно проводити взаємодією із заміщеними тіофенолами, а в

© Є.В.Гринишин, Г.Р.Мусійчук, О.З.Комаровська-Порохнявець, О.П.Іськів, Н.І.Москаленко, М.В.Стасевич, Н.М.Цизорик, М.В.Вовк, 2019



I–III: R = H(a), Me(б); IV: Ar = 4-FC₆H₄ (a), 4-ClC₆H₄ (б), 4-MeOC₆H₄ (в), 2-HO(O)CC₆H₄ (г), 2-NCC₆H₄ (д); V: R = H, Ar = 4-FC₆H₄ (a), 4-ClC₆H₄ (б), 4-MeOC₆H₄ (в), 2-HO(O)CC₆H₄ (г), 2-NCC₆H₄ (д); R = Me, Ar = 4-ClC₆H₄ (e), 4-MeOC₆H₄ (e); VI: R' = MeC(O) (a), PhC(O) (б), 4-FC₆H₄C(O) (в), 3-BrC₆H₄C(O) (г), HOС(O) (д), EtOC(O) (e), NC (e); VII: R = H, R' = MeC(O) (a), PhC(O) (б), 4-FC₆H₄C(O) (в), 3-BrC₆H₄C(O) (г), HOС(O) (д); EtOC(O) (e); R = Me, R' = MeC(O) (e), HOС(O) (ж), EtOC(O) (з), N = C (i).

тонів тіоарильних замісників у діапазоні 7.04–8.05 м.ч., а в спектрах ЯМР ¹H сполук VII а–і — сигнали екзоциклічних метиленових протонів при 4.11–5.02 м.ч.

Синтезовані сполуки Va–e та VII а–і були досліджені на здатність проявляти протимікробні властивості по відношенню до штамів бактерій *Escherichia coli* B-906, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Mycobacterium luteum* B-917 та грибів *Candidatenuis VKM Y-70* і *Aspergillus ni-*

другому — із функціональними галогеноалканами. Нами показано, що броміди II а,б реагують із тіофенолами (IV а–д) у диметилформаміді в присутності карбонату калію при 90 °С з утворенням 4-арилтіопіразоло[1,5-а]-піразинів (V а–e) з виходами 65–83 %. В свою чергу, алкілування тіонів III а,б α-бромокетонами (VI а–г), бромоектовою кислотою (VI д), етил бромоецетатом (VI е) та бромоецетонітрилом (VI є) перебігає відносно легко в системі K₂CO₃—ДМФА при кімнатній температурі і приводить до 4-S-метилфункціоналізованих похідних (VII а–і) з виходами 60–78 %.

Склад усіх синтезованих сполук узгоджується з результатами елементного аналізу і мас-спектрів (табл. 1). Їх будова підтверджена даними вимірів ЯМР ¹H та ¹³C спектрів (табл. 2). Зокрема, в спектрах ЯМР ¹H сполук Va–e, окрім характерних сигналів піразольного та піразиного ядер, наявні сигнали про-

Т а б л и ц я 1

Фізико-хімічні параметри сполук II а,б, III а,б, V а–e, VII а–і

Сполука	Вихід, %	T _{пл.} , °С	Формула	Знайдено, %			[M+1] ⁺
				С	Н	N	
II а	67	89–90	C ₆ H ₄ BrN ₃	36.49	2.15	21.42	198.0
б	65	87–88	C ₇ H ₆ BrN ₃	39.55	2.95	19.75	212.0
III а	75	205 _{розкл}	C ₆ H ₅ N ₃ S	47.67	3.23	27.83	152.2
б	72	210 _{розкл}	C ₇ H ₇ N ₃ S	50.99	4.37	25.53	166.0
V а	82	103–104	C ₁₂ H ₈ FN ₃ S	58.56	3.49	17.08	246.0
б	83	126–127	C ₁₂ H ₈ ClN ₃ S	55.17	2.98	16.15	262.0
в	79	107–108	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ OS	60.78	4.41	16.41	258.0
г	68	203–205	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₂ S	57.35	3.44	15.28	272.0
д	75	98–99	C ₁₃ H ₈ N ₄ S	61.79	3.15	22.16	253.0
е	65	119–120	C ₁₃ H ₁₀ ClN ₃ S	56.52	3.55	15.35	276.0
є	69	101–102	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ OS	61.87	4.93	15.53	272.0
VII а	62	72–73	C ₉ H ₉ N ₃ OS	52.20	4.49	20.36	208.0
б	77	113–114	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ OS	62.34	4.22	15.71	270.0
в	67	143–144	C ₁₄ H ₁₀ FN ₃ OS	58.73	3.45	14.55	288.0
г	60	149–150	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ OS	48.39	2.98	12.14	348.0
д	72	183–184	C ₈ H ₇ N ₃ O ₂ S	45.76	3.28	20.10	210.0
е	78	79–80	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	50.42	4.59	17.84	238.0
є	64	67–68	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	54.30	5.13	18.89	222.0
ж	72	178–179	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S	48.32	4.15	18.93	224.0
з	70	69–70	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	52.57	5.32	16.65	252.0
і	67	119–120	C ₉ H ₈ N ₄ S	52.89	3.86	27.55	205.0

Таблиця 2

Спектри ЯМР ^1H та ^{13}C сполук II а, б, III а, б, V а-є, VII а-і

Сполука	ЯМР ^1H , δ , м.ч. (J , Гц)	ЯМР ^{13}C , δ , м.ч.
II а	6.82 (1H, д, $J=1.6$, H-3); 7.61 (1H, д, $J=4.8$, H-6); 8.02 (1H, д, $J=1.6$, H-2); 8.32 (1H, д, $J=4.8$, H-7)	100.3 (C-3); 122.7 (C-7); 128.0 (C-6); 134.3 (C-3a); 143.1 (C-2); 143.6 (C-4)
б	2.49 (3H, с, CH_3); 6.57 (1H, с, H-3); 7.53 (1H, д, $J=4.8$, H-6); 8.20 (1H, д, $J=4.8$, H-7)	13.9 (CH_3); 99.2 (C-3); 120.8 (C-7); 126.7 (C-6); 135.4 (C-3a); 143.6 (C-4); 152.7 (C-2)
III а	7.01–7.09 (1H, м, H-6); 7.13 (1H, д, $J=1.6$, H-3); 7.97 (1H, д, $J=1.6$, H-2); 8.14 (1H, д, $J=5.2$, H-7); 13.09 (1H, уш.с., NH)	104.8 (C-3); 110.5 (C-7); 116.5 (C-6); 133.9 (C-3a); 140.6 (C-2); 155.9 (C-4)
б	2.35 (3H, с, CH_3); 6.91 (1H, с, H-3); 6.94–7.02 (1H, м, H-6); 8.01 (1H, д, $J=5.2$, H-7); 12.99 (1H, уш.с., NH)	13.7 (CH_3); 103.9 (C-3); 110.4 (C-7); 115.7 (C-6); 134.6 (C-3a); 149.9 (C-2); 155.8 (C-4)
V а	6.88 (1H, д, $J=1.0$, H-3); 7.36 (2H, т, $J=6.8$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.64 (1H, д, $J=4.0$, H-7); 7.68 (2H, т, $J=6.8$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.15 (1H, д, $J=1.0$, H-2); 8.57 (1H, д, $J=4.0$, H-6)	98.9 (C-3); 117.1 (д, $J=22.5$, $2\text{C}_{\text{аром}}$); 120.2 (C-7); 123.0 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 128.8 (C-6); 132.9 (C-3a); 138.3 (д, $J=8.7$, $2\text{C}_{\text{аром}}$); 142.4 (C-2); 153.1 (C-4); 163.4 (д, $J=278.7$, $\text{C}_{\text{аром}}$)
б	6.89 (1H, д, $J=1.2$, H-3); 7.55 (2H, д, $J=8.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.60–7.69 (3H, м, H-6+ $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.16 (1H, д, $J=1.2$, H-2); 8.60 (1H, д, $J=5.5$, H-6)	98.9 (C-3); 120.3 (C-7); 126.5 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 128.8 (C-6); 130.0 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 133.1 (C-3a); 135.1 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 137.3 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 142.5 (C-2); 152.6 (C-4)
в	3.82 (3H, с, OCH_3); 6.81 (1H, д, $J=1.6$, H-3); 7.05 (2H, д, $J=9.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.54 (2H, д, $J=9.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.62 (1H, д, $J=4.5$, H-7); 8.13 (1H, д, $J=1.6$, H-2); 8.55 (1H, д, $J=4.5$, H-6)	55.9 (OCH_3); 98.8 (C-3); 115.6 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 117.6 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 119.9 (C-7); 128.8 (C-6); 132.9 (C-3a); 137.8 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 142.3 (C-2); 154.1 (C-4); 161.1 ($\text{C}_{\text{аром}}$)
г	6.78 (1H, д, $J=1.6$, H-3); 7.43–7.57 (3H, м, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.72 (1H, д, $J=4.5$, H-7); 7.92 (1H, д, $J=7.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.13 (1H, д, $J=1.0$, H-2); 8.64 (1H, д, $J=4.5$, H-6); 13.24 (1H, уш.с., C(O)OH)	99.2 (C-3); 120.8 (C-7); 128.8 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 129.0 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 130.3 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 130.9 (C-6); 132.3 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 134.1 (C-3a); 134.4 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 135.0 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 142.5 (C-2); 152.5 (C-4); 167.9 (C(O)OH)
д	7.00 (1H, д, $J=1.6$, H-3); 7.66 (1H, д, $J=4.5$, H-7); 7.72 (1H, т, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.81 (1H, т, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.89 (1H, д, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.05 (1H, д, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.20 (1H, д, $J=1.6$, H-2); 8.63 (1H, д, $J=4.5$, H-6)	99.0 (C-3); 117.4 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 119.1 (CN); 120.6 (C-7); 128.7 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 130.7 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 131.2 (C-6); 133.1 (C-3a); 134.5 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 134.9 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 137.5 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 142.6 (C-2); 151.5 (C-4)
е	2.44 (3H, с, CH_3); 6.68 (1H, д, $J=1.0$, H-3); 157.51–7.75 (5H, м, H-7+ $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.48 (1H, д, $J=4.0$, H-6)	14.0 (CH_3); 98.1 (C-3); 119.7 (C-7); 126.9 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 128.3 (C-6); 129.8 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 134.0 (C-3a); 135.4 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 136.7 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 151.3 (C-2); 152.0 (C-4)
є	2.42 (3H, с, CH_3); 3.81 (3H, с, OCH_3); 6.60 (1H, д, $J=1.0$, H-3); 7.04 (2H, д, $J=9.2$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.49–7.57 (3H, м, H-7+ $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.42 (1H, д, $J=4.4$, H-6)	14.0 (CH_3); 55.8 (OCH_3); 97.7 (C-3); 115.5 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 117.6 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 119.4 (C-7); 128.1 (C-6); 133.8 (C-3a); 137.6 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 151.5 (C-2); 151.3 (C-4); 160.9 ($\text{C}_{\text{аром}}$)
VII а	2.28 (3H, с, CH_3); 4.29 (2H, с, CH_2); 6.94 (1H, д, $J=1.0$, H-3); 7.69 (1H, д, $J=4.8$, H-7); 8.11 (1H, д, $J=1.0$, H-2); 8.51 (1H, д, $J=4.8$, H-6)	29.3 (CH_3); 39.9 (CH_2); 98.9 (C-3); 119.3 (C-7); 128.4 (C-6); 133.2 (C-3a); 142.3 (C-2); 152.6 (C-4); 202.3 (CO)
б	5.02 (2H, с, CH_2); 6.98 (1H, д, $J=1.0$, H-3); 7.56 (2H, т, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.63 (1H, д, $J=4.0$, H-7); 7.68 (1H, т, $J=7.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.07 (2H, д, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.13 (1H, д, $J=1.0$, H-2); 8.50 (1H, д, $J=4.0$, H-6)	37.5 (CH_2); 98.8 (C-3); 119.4 (C-7); 128.5 (C-6); 128.8 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 129.3 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 133.1 (C-3a); 134.0 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 136.2 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 142.2 (C-2); 152.5 (C-4); 193.5 (CO)

Сполука	ЯМР ^1H , δ , м.ч. (J , Гц)	ЯМР ^{13}C , δ , м.ч.
в	5.0 (2H, с, CH_2); 6.97 (1H, д, $J=1.0$, Н-3); 7.38 (2H, т, $J=8.4$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.62 (1H, д, $J=4.8$, Н-7); 8.05–8.24 (3H, м, Н-2+ $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.49 (1H, д, $J=4.8$, Н-6)	37.3 (CH_2); 98.7 (C-3); 116.5 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 119.1 (C-7); 128.3 (C-6); 131.7 ($2\text{C}_{\text{аром}}$); 133.0 (C-3a); 133.2 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 142.3 (C-2); 152.5 (C-4); 165.7 (д, $J=251.2$, $\text{C}_{\text{аром}}$); 192.3 (CO)
г	5.0 (2H, с, CH_2); 6.99 (1H, д, $J=1.5$, Н-3); 7.54 (1H, т, $J=8.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 7.62 (1H, д, $J=4.5$, Н-7); 7.89 (1H, д, $J=8.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.07 (1H, д, $J=8.0$, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.14 (1H, д, $J=1.5$, Н-2); 8.21 (1H, с, $\text{H}_{\text{аром}}$); 8.51 (1H, д, $J=4.5$, Н-6)	37.3 (CH_2); 98.7 (C-3); 119.6 (C-7); 122.6 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 127.6 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 128.4 (C-6); 131.1 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 131.6 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 133.1 (C-3a); 136.5 ($\text{C}_{\text{аром}}$); 142.1 (C-2); 152.3 (C-4); 192.7 (CO)
д	4.13 (2H, с, CH_2); 6.92 (1H, д, $J=2.0$, Н-3); 7.72 (1H, д, $J=4.8$, Н-7); 8.11 (1H, д, $J=2.0$, Н-2); 8.52 (1H, д, $J=4.8$, Н-6)	31.8 (CH_2); 98.6 (C-3); 119.4 (C-7); 128.6 (C-6); 133.2 (C-3a); 142.1 (C-2); 152.6 (C-4); 170.1 (C(O)OH)
е	1.17 (3H, т, $J=7.0$, CH_3); 4.13 (2H, кв, $J=7.0$, OCH_2); 4.20 (2H, с, CH_2); 6.93 (1H, д, $J=1.0$, Н-3); 7.71 (1H, д, $J=4.8$, Н-7); 8.12 (1H, д, $J=1.0$, Н-2); 8.53 (1H, д, $J=4.8$, Н-6)	14.3 (CH_3); 31.6 (CH_2); 61.6 (OCH_2); 98.5 (C-3); 119.4 (C-7); 128.6 (C-6); 133.1 (C-3a); 142.2 (C-2); 152.3 (C-4); 168.8 (C(O)OEt)
є	2.28 (3H, с, C(O)CH_3); 2.41 (3H, с, CH_3); 4.27 (2H, с, CH_2); 6.68 (1H, с, Н-3); 7.61 (1H, д, $J=4.5$, Н-7); 8.39 (1H, д, $J=4.5$, Н-6)	13.7 (CH_3); 29.4 (C(O)CH_3); 39.8 (CH_2); 97.8 (C-3); 119.0 (C-7); 128.0 (C-6); 133.9 (C-3a); 151.4 (C-2); 151.7 (C-4); 202.3 (CO)
ж	2.41 (3H, с, CH_3); 4.11 (2H, с, CH_2); 6.67 (1H, с, Н-3); 7.65 (1H, д, $J=4.5$, Н-7); 8.39 (1H, д, $J=4.5$, Н-6)	13.9 (CH_3); 31.7 (CH_2); 97.4 (C-3); 118.9 (C-7); 127.8 (C-6); 133.9 (C-3a); 151.3 (C-2); 151.7 (C-4); 170.0 (C(O)OH)
з	1.17 (3H, т, $J=7.0$, CH_2CH_3); 2.41 (3H, с, CH_3); 4.12 (2H, кв, $J=7.0$, OCH_2); 4.17 (2H, с, CH_2); 6.68 (1H, с, Н-3); 7.63 (1H, д, $J=4.4$, Н-7); 8.39 (1H, д, $J=4.4$, Н-6)	13.9 (CH_3); 14.3 (CH_2CH_3); 31.6 (CH_2); 61.6 (OCH_2CH_3); 97.7 (C-3); 119.1 (C-7); 127.9 (C-6); 133.9 (C-3a); 151.0 (C-2); 151.8 (C-4); 168.9 (C(O)OEt)
і	2.42 (3H, с, CH_3); 4.41 (2H, с, CH_2); 6.70 (1H, с, Н-3); 7.78 (1H, д, $J=5.0$, Н-7); 8.50 (1H, д, $J=5.0$, Н-6)	13.9 (CH_3); 14.9 (CH_2); 97.5 (C-3); 118.1 (CN); 119.7 (C-7); 127.7 (C-6); 135.6 (C-3a); 148.9 (C-2); 152.1 (C-4)

ger VKM F-1119 для первинної оцінки дії методом дифузії речовин в агар [18] та визначення ефективних концентрацій методом серійних розведень [19]. Антибактеріальну активність синтезованих речовин щодо бактерій порівнювали з відомим антибактеріальним препаратом ванкомицином, а протигрибкову активність — з протигрибковим препаратом ністатином (контроль).

Згідно з даними табл. 3, штам грам-негативної бактерії *E. coli* виявився нечутливим до дії досліджуваних сполук за винятком похідної VII в, для якої при 0.5%-й концентрації діаметр затримки росту мікроорганізму складав 15.0 мм (на рівні контролю). Помірно- та малочутливими показала себе бактерія *S.*

aureus по відношенню до сполук VII г,з,є,і ($d = 11.0$ – 15.0 мм) у тій самій концентрації. Грам-позитивна бактерія *M. luteum* була малочутливою до дії піразолопіразинів VII з,є ($d = 10.0$ мм). Дослідження протигрибкової дії методом дифузії показало, що тест-культура гриба *S. tenuis* є нечутливою до впливу всіх похідних сполук V та VII, в той час як штам *A niger* виявив високу чутливість (на рівні тест-контролю) у концентрації 0.5 % до піразолопіразину VII в ($d = 20.0$ мм). Для сполук V г,д та VII д,є,і зафіксовано незначний вплив на ріст гриба *A. niger* ($d = 8.0$ – 10.0 мм) при дослідженні методом дифузії в агар. В усіх інших випадках протимікробної дії не спостерігалось.

Таблиця 3
Протимікробна активність сполук V г–д та VII в–і за методом дифузії речовин в агар¹

Сполука	Концентрація, %	Діаметр зон пригнічення росту мікроорганізмів, мм				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteum</i>	<i>C. tenuis</i>	<i>A. niger</i>
V г	0.5	0	0	0	0	10.0
	0.1	0	0	0	0	7.0
д	0.5	0	0	0	0	10.0
	0.1	0	0	0	0	7.0
VII в	0.5	15.0	0	0	0	20.0
	0.1	0	0	0	0	0
г	0.5	0	15.0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0
д	0.5	0	0	0	0	10.0
	0.1	0	0	0	0	0
е	0.5	0	0	0	0	8.0
	0.1	0	0	0	0	0
є	0.5	0	13.0	10.0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0
з	0.5	0	15.0	10.0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0
і	0.5	0	11.0	0	0	10.0
	0.1	0	0	0	0	0
Контроль	0.5	14.0	15.0	18.0	19.0	20.0

¹ Наведені сполуки з позитивними результатами.

Для визначення точних діючих концентрацій досліджуваних сполук був використаний метод серійних розведень, основні результати якого представлені у табл. 4. Аналіз одержаних даних дозволив встановити високоактивні сполуки з вираженими показниками протимікробної та протигрибкової активності. Зокрема, сполука V а показала виражений ефект по відношенню до штаму *S. aureus* у мінімальній інгібуючій концентрації (МІК) 7.8 мкг/мл (на рівні контролю) та мінімальній бактерицидній концентрації (МБК) 15.6 мкг/мл (нижче за контроль). Окрім того, піразолопіразин V е також відзначився кращими показниками протимікробного ефекту стосовно тест-культур *S. aureus* (МІК = 3.9, МБК = 7.8 мкг/мл) та *M. luteum* (МІК = 3.9, МБК = 31.2 мкг/мл), ніж препарат порівняння ванкоміцин. Похідна VII в, яка

була відзначена при дослідженні методом дифузії, при тестуванні в серійних розведеннях на противагу слабкій антибактеріальній активності відносно *E. coli* (МІК = 250.0, МБК = 500.0 мкг/мл), показала високу протигрибкову дію стосовно тест-культури гриба *A. niger* (МІК = 7.8, МБК = 15.6 мкг/мл). В свою чергу, штаму *C. tenuis* виявився помірно чутливим тільки до дії сполуки V а. В ряду сполук V б, VII а, д, є, з, і МІК по відношенню до тест-культур *S. aureus*, *M. luteum*, *C. tenuis* та *A. niger* були в межах 62.5–500 мкг/мл. Сполуки V а, в проявляли МІК у концентрації 15.6 мкг/мл стосовно штаму бактерії *M. luteum*.

Отримані експериментальні результати дозволяють виявити деяку залежність між структурою та активністю синтезованих сполук. Зокрема, встановлено, що введення в структуру 4-S-заміщених піразолопіразинів *para*-фторофенільного (сполука V а) або *para*-хлорофенільного (сполука V е) фрагментів приводить до значного підсилення антибактеріального ефекту по відношенню до тест-культур *S. aureus* та *M. luteum*. В той самий час поява протигрибкової дії відносно *C. tenuis* та *A. niger* відзначається тільки при наявності атома фтору у похідній сполуки V а.

Введення метиленкарбофункціоналізованого угруповання до атома сірки у ряду похідних VII а–і загалом викликало незначний прояв протимікробної дії. Характерно, що наявність фенацильних замісників значно знижувала активність сполук, приводячи до мінімального антибактеріального ефекту або росту мікроорганізмів у досліджуваних концентраціях. Тільки у випадку похідної VII в із *para*-фторофенацильним фрагментом спостерігався значний протигрибковий ефект стосовно *A. niger*.

Таким чином, у результаті проведених досліджень протимікробної активності 4-S-заміщених піразоло[1,5-а]піразинів V а–є та VII а–і виявлені перспективні похідні з антибактеріальною активністю стосовно тест-культур *S. aureus* із МІК 7.8 мкг/мл (сполука V а), *S. aureus* та *M. luteum* із МІК 3.9 мкг/мл (V е) та протигрибковою дією по відношенню до тест-культури гриба *A. niger* із МІК 7.8 мкг/мл (VII в).

Т а б л и ц я 4

Протимікробна активність сполук V та VII за методом серійних розведень¹

Сполука	Культура мікроорганізму, мкг/мл									
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>M. luteum</i>		<i>C. tenuis</i>		<i>A. niger</i>	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МФК	МІК	МФК
V а	+	+	7.8	15.6	15.6	62.5	31.2	62.5	62.5	*
б	+	+	+	+	62.5	*	+	+	+	+
в	+	+	+	+	15.6	*	+	+	+	+i
д	+	+	125.0	250.0	+	+	+	+	+	+
е	+	+	3.9	7.8	3.9	31.2	+	+	500.0	*
є	+	+	+	+	62.5	*	+	+	+	+
VII а	+	+	62.5	250.0	250.0	500.0	+	+	500.0	*
в	250.0	500.0	+	+	+	+	+	+	7.8	15.6
д	+	+	+	+	+	+	500.0	*	250.0	*
е	+	+	+	+	+	+	250.0	500.0	250.0	500.0
є	+	+	500.0	+	+	+	250.0	500.0	500.0	*
з	+	+	62.5	125.0	62.5	125.0	125.0	*	250.0	500.0
і	+	+	250.0	500.0	125.0	250.0	31.2	125.0	62.5	250.0
Контроль	3.9	31.2	7.8	31.2	7.8	31.2	15.6	31.2	3.9	31.2

¹ Наведені сполуки з позитивними результатами; + — у досліджуваних концентраціях біоцидного ефекту не було (спостерігався ріст мікроорганізмів); * — показників біоцидного ефекту не встановлено.

Спектри ЯМР ¹H та ¹³C отримані на спектрометрі Varian VXR-400 (399.97 і 100.57 відповідно) у розчині CDCl₃ (сполуки II а,б) або DMSO-*d*₆ (решта сполук), внутрішній стандарт ТМС. Хроматомас-спектри одержані на приладі Agilent 1100/DAD/HSD/VLG119562. Температури плавлення визначені на столику Кофлера і невідкоректовані.

4-Бромпіразоло[1,5-а]піразини (II а,б). До суспензії 5.0 ммоль піразоло[1,5-а]піразин-4-ону I а,б у 40 мл сухого бензену при перемішуванні додавали 2.15 г (7.5 ммоль) POBr₃ і декілька крапель ДМФА. Реакційну суміш перемішували при кип'ятінні впродовж 8–12 год і упарювали. Сухий залишок обробляли 40 мл 10 %-го розчину Na₂CO₃ та екстрагували CH₂Cl₂ (3×20 мл). Органічний шар сушили над безводним Na₂SO₄, упарювали, отриманий залишок кристалізували із суміші бензол–гексан (2:3).

Піразоло[1,5-а]піразин-4-іони (III а,б). До суспензії 5.0 ммоль піразоло[1,5-а]піразин-4-ону I а,б у 40 мл сухого піридину при перемішу-

ванні додавали 1.33 г (6.0 ммоль) P₂S₅ і перемішували при 90 °C впродовж 15–18 год. Реакційну суміш упарювали, розводили 50 мл води, утворений осад відфільтровували і сушили на повітрі.

4-(Арилтіо)піразоло[1,5-а]піразини (V а–є). До розчину 2.0 ммоль 4-бромпіразоло[1,5-а]піразину II а,б в 15 мл ДМФА додавали 2.0 ммоль тіофенолу IV а–д, 0.29 г (2.1 ммоль) K₂CO₃ і перемішували при 90 °C впродовж 6–8 год. Реакційну суміш упарювали, до залишку додавали 20 мл води, утворений осад відфільтровували, сушили на повітрі і кристалізували із ацетонітрилу.

Піразоло[1,5-а]піразин-4-ілтііонохідні (VII а–і). До розчину 2.0 ммоль піразоло[1,5-а]піразин-4-іону III а,б в 15 мл ДМФА додавали 2.1 ммоль алкіл броміду VI а–є, 0.29 г (2.1 ммоль) K₂CO₃ і перемішували при кімнатній температурі впродовж 12 год. Реакційну суміш упарювали, додавали 20 мл води, утворений осад відфільтровували (у разі сполук VII

б,в,г,д,ж,і) або екстрагували EtOAc (у разі сполук VII а,е,є,з) і кристалізували із ацетонітрилу або ізопропанолу.

Антимікробну активність сполук вивчали методом дифузії речовин в агар на твердому поживному середовищі (м'ясо-пептонний агар (МПА) — для бактерій, сусло-агар (СА) — для грибів). Мікробне навантаження 10^9 клітин (спор) на 1 мл. Тривалість інкубації бактерій 24 год при температурі 35 °С, грибів — 48–72 год при 28–30 °С. У дослідях використовували наступні тест-культури: бактерії *Escherichiacoli* B-906, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Mycobacterium luteum* B-917 та гриби *Candida tenuis* VKM Y-70 і *Aspergillus niger* VKM F-1119. Ступінь активності досліджуваних сполук оцінювали за величиною зон пригнічення росту тест-культур мікроорганізмів. Повторюваність досліду — трикратна.

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МК) методом серійних розведень досліджувану речовину розчиняли у ДМСО, досягаючи необхідної концентрації. Певний об'єм розчину речовини вносили у поживне середовище (МПБ — м'ясо-пептонний бульйон — для бактерій; СА — неохмелене пивне сусло — для грибів) та інокулювали в ньому посівний матеріал бактерій або грибів. Засіяні пробірки витримували у термостаті при відповідній температурі (37 °С — для бактерій; 30 °С — для грибів) упродовж 24–72 год. Результати оцінювали за наявністю або відсутністю росту мікроорганізмів (за ступенем мікробної мутності поживного середовища).

Щоб встановити мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК) та мінімальну фунгіцидну концентрацію (МФК) сполук методом серійних розведень із пробірок, в яких розчини середовища виявились візуально прозорими, відбирали по 0.02 мл середовища і наносили на стерильне МПА (для бактерій) або СА (для грибів) у стерильних чашках Петрі, які інкубували в термостаті. Оцінку результатів здійснювали для тест-бактерій через 24 год, для тест-грибів — 48–72 год. За відсутністю росту колоній мікроорганізмів на інкубованих чашках Петрі, визначали мінімальну бактерицидну

концентрацію (МБК) або мінімальну фунгіцидну концентрацію (МФК) досліджуваної речовини. Повторюваність досліду — трикратна.

СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ 4-АРИЛТИО- И 4-АЛКИЛТИОФУНКЦИОНИЗИРОВАННЫХ ПИРАЗОЛО[1,5-а]ПИРАЗИНОВ

Е.В.Гринишин^{1,3*}, А.Р.Мусійчук³, Е.З.Комаровська-Порохнявець², О.П.Иськів², Н.И.Москаленко², М.В.Стасевич², Н.М.Цизорик³, М.В.Вовк³

¹ *Национальный университет “Киево-Могилянская академия”, ул. Г.Сковороды, 2, Киев, 04655, Украина*

² *Национальный университет “Львовская политехника”, ул. С.Бандеры, 12, Львов, 79013, Украина*

³ *Институт органической химии НАН Украины, ул. Мурманская, 5, Киев, 02660, Украина*
* e-mail: yevhenii.hrynyshyn@ukma.edu.ua

Взаимодействием 4-бромпиразоло[1,5-а]-пиразинов с тиофенолами и пиразоло[1,5-а]пиразин-4(5H)тионов с функционализированными бромалканами синтезированы новые 4-арилтио- и 4-алкилтиопиразоло[1,5-а]пиразины. Среди полученных соединений выявлены вещества с выраженной антибактериальной активностью по отношению к штаммам *S. aureus* и *M. luteum* и противогрибковым действием относительно штамма *A. niger*.

К л ю ч е в ы е с л о в а : 4-бромпиразоло[1,5-а]пиразины, пиразоло[1,5-а]пиразин-4(5H)тионы, тиофенолы, функционализированные бромалканы, 4-арил(алкил)тиопроизводные пиразоло[1,5-а]пиразинов, антибактериальная и противогрибковая активность.

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 4-ARYLTHIO- AND 4-ALKYLTHIOFUNCTIONALIZED PYRAZOLO[1,5-a]PYRAZINES

Ye.V.Hrynyshyn^{1,3*}, H.R.Musiichuk³, O.Z.Komarovska-Porokhnyavets², O.P.Is'kiv², N.I.Moskalenko², M.V.Stasevych², N.M.Tsyzoryk³, M.V.Vovk³

¹ *National University of “Kyiv-Mohyla Academy”, 2 G.Skovoroda Str., Kyiv, 04655, Ukraine*

² *Lviv Polytechnic National University, 12 S.Bandera Str., Lviv, 79000, Ukraine*

³ *Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, 5 Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine*

* e-mail: yevhenii.hrynyshyn@ukma.edu.ua

The reaction of pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine-4(5*H*)-ones with phosphorus tribromoxide in boiling benzene yielded 4-bromopyrazolo[1,5-*a*]pyrazines, and the thionation with phosphorus pentasulfide in pyridine at 90 °C led to pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine-4(5*H*)-thiones. The synthesized bromine derivatives are electrophilic, and thiones are nucleophilic substrates. Their subsequent structural modification in the first case was carried out by interaction with thiophenols, and in the second case was conducted with functional haloalkanes. It was shown that bromides react with substituted thiophenols in dimethylformamide in the presence of potassium carbonate at 90 °C to form 4-arylthiopyrazolo[1,5-*a*]pyrazines with yields of 65–83 %. 4-*S*-methyl-functionalized derivatives of pyrazolo[1,5-*a*]pyrazines with yields of 60–78 % were easily obtained by the alkylation of pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine-4(5*H*)-thiones with α -bromoketones, bromoacetic acid, ethyl bromoacetate and bromoacetonitrile in the K₂CO₃—DMF system at room temperature. The composition of all synthesized compounds is in agreement with the results of elemental analysis and mass spectra. Their structure is confirmed by NMR ¹H and ¹³C spectra. In particular, in the NMR ¹H spectra of 4-arylthiopyrazolo[1,5-*a*]pyrazines, in addition to the characteristic signals of the pyrazole and pyrazine nuclei, signals of protons of thioaryl substituents are present in the range of 7.04–8.05 ppm, and in NMR spectra of the ¹H 4-*S*-methyl-functionalized derivatives of pyrazolo[1,5-*a*]pyrazines signals of exocyclic methylene protons are present at 4.11–5.02 ppm. Promising derivatives with antibacterial activity against the test cultures *S. aureus* (MIC = 7.8 g/mL), *M. luteum* (MIC = 3.9 g/mL), and antifungal activity against the test culture of fungus *A. niger* (MIC = 7.8 g/mL) were determined among 4-*S*-substituted pyrazolo[1,5-*a*]pyrazines as a result of studies of the antimicrobial activity.

Key words: 4-bromopyrazolo[1,5-*a*]pyrazines, pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine-4(5*H*) thiones, thiophenols, functionalized bromoalkanes, 4-aryl(alkyl)thio derivatives of pyrazolo[1,5-*a*]pyrazines, antibacterial and antifungal activity.

ЛІТЕРАТУРА

1. Abdul-Malik M.A., Zaki R.M., Kamal El-Dean A.M. et al. A Concise Review on the Synthesis and Reactions of Pyrazolopyrazine Heterocycles. // *J. Het. Chem.* -2018. -**55**. -P 1828–1853.
2. Pennington L.D., Moustakas D.T. The Necessary Nitrogen Atom: A Versatile High-Impact Design Element for Multiparameter Optimization // *J.*

3. Med. Chem. -2017. -**60**, № 9. -P. 3552–3579.
3. Zhenga L.-W., Shao J.-H., Zhao B.-X. et al. Synthesis of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine-4 (5*H*)-one derivatives and their inhibition against growth of A549 and H322 lung cancer cells // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* -2011. -**21**, № 13. -P. 3909–3913.
4. *WO Patent 101161*. Pyrazole Derivatives as JAK Inhibitors / Bach Tana J., Pages Santacana L.M., Taltavull Moll J. et al. -Опубл. 2011.
5. *WO Patent 141713*. New bicyclic compounds as PI3-K and mTOR inhibitors / Pastor F.J., Martinez G.S., Rodrigues H.A. et al. -Опубл. 2011.
6. *WO Patent 016005*. Substituted 2-Heterocyclamino Pyrazine Compounds as CHK-1 Inhibitors / Ninkovic S., Braganza J.F., Collins M.R. et al. -Опубл. 2010.
7. *WO Patent 166370*. Heteroaromatic Compounds and Their Use as Dopamine D1 Ligands / Gray D.L.F., Davoren J.E., Dounay A.B. et al. -Опубл. 2015.
8. Ting P.C., Lee J.F., Albanese M.M. et al. The synthesis and structure–activity relationship of 4-benzimidazolyl-piperidinylcarbonyl-piperidine analogs as histamine H₃ antagonists // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* -2010. -**20**, № 17. -P. 5004–5008.
9. *WO Patent 130232*. Pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine Derivatives as Antagonists of V1B Receptors / Di Fabio R., Gentile G., Pozzan A. et al. -Опубл. 2009.
10. *WO Patent 1011119*. Fused heteroaryl derivatives as orexin receptor antagonists / Liverton N., Kuduk S.D., Beshore D.C. et al. -Опубл. 2016.
11. *WO Patent 119916*. Compounds for treating spinal muscular atrophy / Qi H., Choi S., Dacka A. et al. -Опубл. 2013.
12. Woll M.G., Qi H., Turpoff A. et al. Discovery and optimization of small molecule splicing modifiers of survival motor neuron 2 as a treatment for spinal muscular atrophy // *J Med. Chem.* -2016. -**59**, № 13. -P. 6070–6085.
13. Shen S.-L., Zheng L.-W., Wang S.-Q. et al. Solvent-free microwave-assisted synthesis of tetrahydrooxazolo[3,2-*a*]pyrazolo[1,5-*d*]pyrazine-5-ones // *ARKIVOC.* -2013. -**4**. -P. 44–56.
14. *US Patent 4077956*. 5-Substituted Derivatives of Dipyrzolo[1,5-*a*:4',3'-*e*]pyrazine-6-carboxylic Acids and Esters / Treuner U.D. -Опубл. 1978.
15. *US Patent 412871604*. 4-Halo Derivatives of Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline-3-carboxylic Acids and Esters / Treuner U.D. -Опубл. 1978.
16. *US Patent 4052393*. 4-Substituted Derivatives of Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline-3-carboxylic Acids and Esters / Treuner U.D. -Опубл. 1977.

17. Гринишин Є.В., Цизорик Н.М., Мусійчук Г.Р. та ін. Синтез 8*H*-піразоло[5',1':3,4]піразино[2,1-*b*]хіназолін-8-онов // Хім. гетероцикл. соед. -2017. -53, № 11. -С 1242–1247.
18. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests – Fourth Edition: Approved Standards, Document M2-A4, NCCLS.* -Villanova: PA, 1990.
19. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium Forming Filamentous Fungi: Proposed Standard, Document M38-P, NCCLS.* -Wayne: PA, 1998.
1. Abdul-Malik M.A., Zaki R.M., Kamal El-Dean A.M., Radwan S.M. A Concise Review on the Synthesis and Reactions of Pyrazolopyrazine Heterocycles. *J. Het.Chem.* 2018. **55**: 1828.
2. Pennington L.D., Moustakas D.T. The Necessary Nitrogen Atom: A Versatile High-Impact Design Element for Multiparameter Optimization. *J. Med. Chem.* 2017. **60**(9): 3552.
3. Zhenga L.-W., Shao J.-H., Zhao B.-X., Miao J.-Y. Synthesis of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4(5*H*)-one derivatives and their inhibition against growth of A549 and H322 lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. **21**(13): 3909.
4. Patent WO 101161. Bach Tana J., Pages Santacana L.M., Taltavull Moll J., Eastwood P.R., Gonzalez Rodrigues J., Giulio Matassa V. Pyrazole Derivatives as JAK Inhibitors. 2011.
5. Patent WO 141713. Pastor F.J., Martinez G.S., Rodrigues H.A., Ramos Lima F.J., Alvarez Escobar R.M., Higuera Hernandez A.I. 6 Substituted 2-Heterocyclylamino Pyrazine Compounds as CHK-1 Inhibitors. 2011.
6. Patent WO 016005. Ninkovic S., Braganza J.F., Collins M.R., Kath J.C., Li H., Richter D.T. 6 Substituted 2-Heterocyclylamino Pyrazine Compounds as CHK-1 Inhibitors. 2010.
7. Patent WO 166370. Gray D.L.F., Davoren J.E., Dounay A.B., Efremov I.V., Mente S.R., Subramanyam C. Heteroaromatic Compounds and Their Use as Dopamine D1 Ligands. 2015.
8. Ting P.C., Lee J.F., Albanese M.M., Wu J., Aslanian R., Favreau L., Nardo C., Korfmacher W.A., West R.E., Williams S.M., Anthes J.C., Rivelli M.A., Corboz M.R., Heyc J.A. The synthesis and structure-activity relationship of 4-benzimidazolyl-piperidinylcarbonyl-piperidine analogs as histamine H₃ antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. **20**(17): 5004.
9. Patent WO 130232. Di Fabio R., Gentile G., Pozzan A., Tarsi L., Terreni S., Tonelli F. Pyrazolo[1,5-*a*]pyrazine Derivatives as Antagonists of V1B Receptors. 2009.
10. Patent WO 1011119. Liverton N., Kuduk S.D., Beshore D.C., Meng N., Luo Y. Fused heteroaryl derivatives as orexin receptor antagonists. 2016.
11. Patent WO 119916. Qi H., Choi S., Dakka A., Karp G.M., Narasimhan J., Naryshkin N., Turpoff A.A., Weetall M.L. Welch E., Woll M.G., Yang T., Zhang N., Zhang X., Zhao X., Green L., Pinard E., Ratni H. Compounds for treating spinal muscular atrophy. 2013.
12. Woll M.G., Qi H., Turpoff A., Zhang N., Zhang X., Chen G., Li C., Huang S., Yang T., Moon Y.-C., Lee C.-S., Choi S., Almstead N.G., Naryshkin N.A., Dakka A., Narasimhan J., Gabbeta V., Welch E., Zhao X., Risher N., Sheedy J., Weetall M., Karp G.M. Discovery and optimization of small molecule splicing modifiers of survival motor neuron 2 as a treatment for spinal muscular atrophy. *J. Med. Chem.* 2016. **59**(13): 6070.
13. Shen S.-L., Zheng L.-W., Wang S.-Q., Zhang Y.-R., Zhang Y., Liu Y. R., Zhao B.-X. Solvent-free microwave-assisted synthesis of tetrahydrooxazolo[3,2-*a*]pyrazolo[1,5-*d*]pyrazin-5-ones. *ARKIVOC.* 2013. **4**: 44.
14. Patent 4077956 USA. Treuner U.D. 5-Substituted Derivatives of Dipyrazolo[1,5-*a*:4',3'-*e*]pyrazine-6-carboxylic Acids and Esters. 1978.
15. Patent 4128716 USA. Treuner U.D. 4-Halo Derivatives of Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline-3-carboxylic Acids and Esters. 1978.
16. Patent 4052393 USA. Treuner U.D. 4-Substituted Derivatives of Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline-3-carboxylic Acids and Esters. 1977.
17. Hrynyshyn Y.V., Tsyzyryk N.M., Musiychuk A.R., Bol'but A.V., Vovk M.V. Synthesis of 8*H*-pyrazolo[5',1':3,4]pyrazino[2,1-*b*]quinazolin-8-ones. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2017. **53** (11): 1242.
18. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests – 4-th Edition: Approved Standards, Document M2-A4, NCCLS.* Villanova. PA, 1990.
19. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium Forming Filamentous Fungi: Proposed Standard, Document M38-P, NCCLS.* Wayne. PA, 1998.

Надійшла 18.02.2019