

Методы синтеза и противовирусная активность новых 4-алкил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов

Роман А. Дрокин^{1*}, Дмитрий В. Тюфяков¹, Егор К. Воинков¹, Павел А. Слепухин², Евгений Н. Уломский^{1,2}, Яна Л. Есаулкова³, Александрина С. Волобуева³, Кристина С. Ланцева⁴, Мария А. Мисюрина³, Владимир В. Зарубаев³, Владимир Л. Русинов^{1,2}

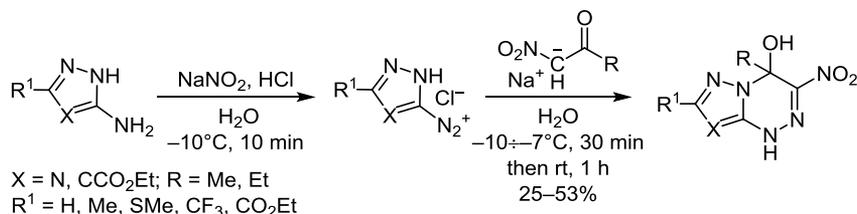
¹ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, ул. Мира, 19, Екатеринбург 620002, Россия; e-mail: drokinroman@gmail.com

² Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН, ул. Софьи Ковалевской, 22/20, Екатеринбург 620108, Россия e-mail: slepukhin@ios.uran.ru

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, ул. Мира, 14, Санкт-Петербург 197101, Россия; e-mail: IanaEsaulkova@gmail.com

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург 199034, Россия e-mail: ashitsu@gmail.com

Поступило 11.11.2020
Принято после доработки 30.12.2020



Реакцией азосочетания α -нитрокетонов с 5-диазаазолами получены 4-алкил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазины, определена их противовирусная активность в отношении вирусов гриппа и Коксаки В3.

Ключевые слова: 3-нитроазоло[5,1-с][1,2,4]триазины, α -нитрокетоны, триазины, вирус гриппа, вирус Коксаки В3, противовирусная активность.

За последние годы человечество столкнулось с новыми заболеваниями, вызванными такими ранее неизвестными вирусами, как человеческий метапневмовирус, новые разновидности коронавирусов и вирусов гриппа, вирусы геморрагических лихорадок.^{1,2} Грипп и ОРВИ составляют около 90% инфекционной респираторной патологии человека. Ежегодно в России регистрируется от 18 до 33 млн случаев этих заболеваний. Из них грипп представляет наибольшую опасность в связи с быстрым распространением вируса, тяжестью течения и возможностью возникновения серьезных осложнений. Для специфического лечения гриппа используются препараты нескольких химических групп, различающиеся по мишеням и механизму действия. К таким препаратам относятся ингибиторы ионного канала М2 римантадин и амантадин, ингибиторы нейраминидазы осельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир,³ а также блокатор вирусного

полимеразного комплекса балоксавира марбоксил.⁴ В России, Китае и ряде других стран зарегистрирован ингибитор вирусного гемагглютинина умифеновир (Арбидол).⁵ Однако из-за особенностей организации генома вирус гриппа способен быстро мутировать с образованием новых штаммов, устойчивые к действию известных противовирусных лекарств, не теряя при этом своей вирулентности и патогенности.⁶ Противогриппозную активность проявляет также ряд нуклеозидных аналогов. Так, в Японии был разработан препарат фавипиравир, обладающий широким спектром противовирусной активности.⁷ К нуклеозидным аналогам также относится рибавирин, проявляющий противогриппозные свойства. Тем не менее из-за большого количества побочных эффектов нуклеозидные аналоги не часто используются в клинике при лечении гриппа.

Серьезную опасность представляют также вирусы, принадлежащие к семейству энтеровирусов, в част-

ности вирусы Коксаки группы В. Эти безоболочечные вирусы с (+)-РНК-геномом вызывают широкий спектр патологий, включая перикардиты и миокардиты, полиомиелит, неспецифическую фебрильную лихорадку, серозный менингит и менингоэнцефалит и др. Коксакивирусный миокардит представляет исключительные трудности для диагностики и лечения, что обусловлено как чисто клиническими особенностями (разной степенью выраженности органических и функциональных повреждений миокарда, трудностями при получении материала для биопсии, отсутствием четких маркеров заболевания), так и отсутствием эффективных этиотропных препаратов для лечения.⁸ С учетом всего перечисленного разработка новых эффективных противовирусных препаратов, в том числе активных против вируса Коксаки В3, является одной из первостепенных задач медицинской химии и практического здравоохранения.

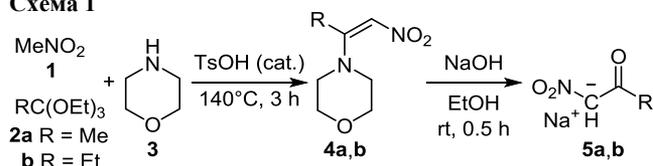
Азоло[5,1-с][1,2,4]триазины представляют собой гетероциклические системы, обладающие рядом полезных биологических свойств.⁹ Устойчивый интерес к таким соединениям связан, прежде всего, с их структурным сходством с гетероциклическими основаниями ДНК и РНК. Благодаря этой особенности они могут выступать в роли антиметаболитов, оказываясь эффективными биологически активными соединениями. Особый интерес в этом направлении представляют соединения, содержащие нитрогруппу в [1,2,4]триазиновом фрагменте молекулы и обладающие широким спектром противовирусного действия. Представителем этого класса соединений является препарат Триазавирин (натриевая соль дигидрата 6-метилсульфанил-3-нитро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-она), разрешенный к медицинскому применению и используемый для лечения гриппа, ОРВИ, клещевого энцефалита.^{10–15}

Для построения азоло[1,2,4]триазиновых систем используют два принципиальных подхода: аннелирование азольного фрагмента к [1,2,4]триазиновому или достройка триазинового фрагмента молекулы на основе азольной части.¹⁶ Особый интерес для синтеза азоло[1,2,4]триазинов представляют нитросинтоны. В качестве компонентов, содержащих нитрогруппу, используются этилнитроацетат,⁹ этилнитромалонат,¹⁷ нитроацетонитрил,^{18–20} нитромалоновый альдегид¹⁷ и нитроуксусный альдегид в виде калиевой соли.²¹

Перспективными синтетическими блоками в реакциях достройки триазинового фрагмента являются α -нитрокетоны. Это – высокорекреационные соединения с широким синтетическим потенциалом, но с низкой термодинамической стабильностью, что сдерживает их использование в органическом синтезе. Ранее нами была представлена работа, в которой был описан новый эффективный метод синтеза солей α -нитрокетонов **5a,b** из нитроаминов **4a,b**, которые, в свою очередь, были получены из нитрометана (**1**), ортоэфиров **2a,b** и морфолина (**3**) (схема 1).^{22,23}

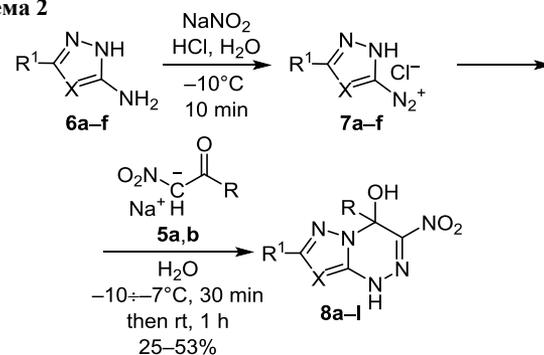
Азосочетание натриевых солей 1-нитро-2-пропанона (**5a**) и 1-нитро-2-бутанона (**5b**) с 5-диазозолами **7a–f**, полученными *in situ* из аминов **6a–f**, приводит к

Схема 1



образованию новых 4-метил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов **8a–f** и 3-нитро-4-этил-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов **8g–l** с выходами 25–53% (схема 2).

Схема 2



- 8 a** X = N, R¹ = H, R = Me; **b** X = N, R¹ = Me, R = Me;
c X = N, R¹ = SMe, R = Me; **d** X = N, R¹ = CF₃, R = Me;
e X = N, R¹ = CO₂Et, R = Me; **f** X = CCO₂Et, R¹ = H, R = Me;
g X = N, R¹ = H, R = Et; **h** X = N, R¹ = Me, R = Et;
i X = N, R¹ = SMe, R = Et; **j** X = N, R¹ = CF₃, R = Et;
k X = N, R¹ = CO₂Et, R = Et; **l** X = CCO₂Et, R¹ = H, R = Et

Алкил-1,4-дигидротриазоло[1,2,4]триазин-4-олы в литературе представлены единичными примерами. Подобные соединения были получены с использованием 3-фторалкил-3-оксопропаноата и его аналогов,^{24,25} являющихся дорогостоящими и труднодоступными соединениями. Описанные 4-фторалкил-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олы проявили селективную ингибирующую активность в отношении карбоксилэстеразы смешанного типа.²⁴

Структуры 4-алкилазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов **8a–l** были охарактеризованы на основании данных ИК, ЯМР ¹H и ¹³C спектроскопии и данных элементного анализа. Для кристалла соединения **8j** были получены данные РСА (рис. 1). В спектрах ЯМР ¹H 4-алкилазоло-

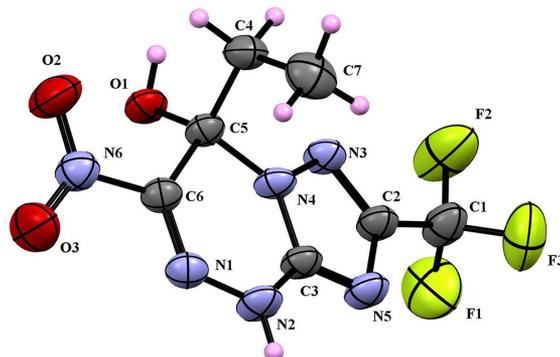
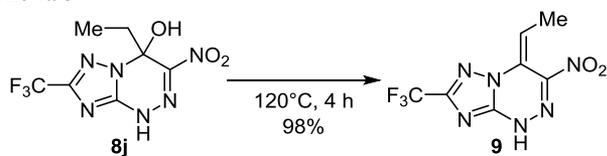


Рисунок 1. Молекулярная структура соединения **8j** в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 50% вероятностью.

[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов **8a–l** характеристичными являются сигналы алкильной группы в положении 4 триазинового цикла в сильном поле, а также синглет гидроксильной группы в области 5.97–7.92 м. д. В спектрах ЯМР ^{13}C соединений **8a–l** характеристичными являются сигнал алкильной группы в положение 4 триазинового цикла в сильном поле, а также сигналы заместителей азольного цикла. В ИК спектрах характеристичными являются полосы нитрогруппы в областях 1530–1580 и 1316–1338 cm^{-1} .

На примере соединения **8j** было продемонстрировано, что соединения ряда 4-алкил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-олов могут отщеплять H_2O при постепенном нагревании с образованием сопряженной триазолотриазиновой системы **9** (схема 3). Структура соединения **9** была подтверждена данными спектроскопии ЯМР ^1H . Для него характеристичным является дублет при 2.27 м. д., соответствующий метильной группе, и квартет, соответствующий метиленовому фрагменту при 5.76 м. д. Также для соединения **9** были получены данные ИК спектроскопии, спектроскопии ЯМР ^{13}C и данные элементного анализа.

Схема 3



Для ряда синтезированных соединений **8a–l** были определены параметры их биологической активности. Были оценены цитотоксические свойства соединений **8a–l** в отношении культур клеток, а также ингибирующая активность в отношении филогенетически неродственных вирусов – вирусов гриппа и Коксаки В3 (табл. 1).

Как следует из полученных данных, изученные соединения характеризуются широким диапазоном токсичности. Наиболее токсичным оказалось соединение **8f** (CC_{50} 139 мкМ), наименее токсичным – соединение **8b**, не вызывающее признаков цитодеструкции вплоть до максимальной из изученных концентраций (300 мкг/мл, 1415 мкМ). Несмотря на небольшое число проанализированных соединений, можно говорить о повышении токсичности соединений этой группы при наличии в азольном цикле метилсульфанильного или трифторметильного заместителя.

Из всех полученных соединений лишь соединение **8i**, имеющее метилсульфанильный заместитель, проявило умеренную противовирусную активность в отношении вируса гриппа. Остальные соединения в той или иной степени подавляли репродукцию вируса лишь в концентрациях, близких к токсическим. Следует отметить, что разработанный ранее противовирусный препарат Триазавирин, принадлежащий к классу азолоазинов, также содержит метилсульфанильный фрагмент. По всей видимости, этот фрагмент следует рассматривать

Таблица 1. Цитотоксические и противовирусные свойства 4-алкил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов **8a–l** в культуре клеток

Соединение	Вирус гриппа (клетки MDCK)			Вирус Коксаки В3 (клетки Vero)		
	CC_{50}^* , мкМ	IC_{50}^{**} , мкМ	SI^{***}	CC_{50}^* , мкМ	IC_{50}^{**} , мкМ	SI^{***}
8a	N/T* ⁴	N/T	–	N/T	N/T	–
8b	>1415	472±30	3	N/T	N/T	–
8c	N/T	N/T	–	N/T	N/T	–
8d	N/T	N/T	–	N/T	N/T	–
8e	371 ± 22	>370	1	N/T	N/T	–
8f	139 ± 11	91 ± 12	2	N/T	N/T	–
8g	742 ± 51	>469	2	390	>235	2
8h	907 ± 78	233 ± 29	4	436	>220	2
8i	419 ± 36	32 ± 4	13	368	>194	2
8j	432 ± 28	>357	1	425	129	3
8k	>1056	>1056	1	N/T	N/T	–
8l	1060 ± 55	336 ± 40	3	777	>353	2
Рибавирин	>2130	39 ± 5	55	>2130	56 ± 8	38

* CC_{50} – 50% цитотоксическая концентрация – концентрация соединения, приводящая к гибели 50% клеток.

** IC_{50} – 50% ингибирующая концентрация – концентрация соединения, снижающая титр вируса на 50% по сравнению с контролем без препаратов.

*** SI – индекс селективности – отношение CC_{50} к IC_{50} .

*⁴ N/T (Not Tested) – не определялось.

как важное условие наличия противогриппозной активности азолоазинов и учитывать это при дальнейшей оптимизации и фокусировке химических библиотек. В отношении филогенетически далекого вируса Коксаки В3 ни одно из проанализированных соединений, в том числе и соединение **8i**, не проявило ингибирующих свойств. Значения IC_{50} в этом случае были в диапазоне сотен микромолей и близки к показателям токсичности для этих соединений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что функциональный фрагмент соединения **8i** обуславливает специфическую противовирусную активность в отношении вируса гриппа.

Таким образом, нами был синтезирован ряд 4-алкил-3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, с использованием солей α -нитрокетонов. Для полученных соединений были оценены цитотоксические свойства в отношении культур клеток, а также ингибирующая активность в отношении филогенетически неродственных вирусов – вирусов гриппа и Коксаки В3. Полученные результаты и литературные данные позволяют утверждать, что азоло[5,1-с][1,2,4]триазины перспективны для дальнейшего изучения в рамках задач, стоящих перед медицинской химией.

Экспериментальная часть

ИК спектры записаны на спектрометре Bruker Alpha, ZnSe (НПВО). Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{19}F записаны на приборе Bruker Avance NEO 600 (600, 151 и 565 МГц соответственно) в CD_3CN и $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, внутренний стандарт ТМС. Элементный анализ выполнен С,Н,Н,С-анализаторе PerkinElmer 2400 Series II. Температуры плавления определены на приборе Electrothermal IA 9100. Контроль за ходом реакций и чистотой

полученных соединений осуществлен методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254.

В работе использованы коммерчески доступные реагенты и растворители без дополнительной очистки, если не указано другое.

Получение 3-нитро-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]-триазин-4-олов 8a–f (общая методика). К раствору 0.01 моль 3-аминоазола **6a–f** в 4 мл H₂O и 6 мл (0.072 моль) концентрированной HCl порциями добавляют раствор 0.76 г (0.011 моль) NaNO₂ в 2 мл H₂O при –10÷–7°C. Реакционную смесь выдерживают в течение 10 мин и добавляют к ней раствор 0.01 моль моногидрата натриевой соли 1-нитропропан-2-она (**5a**) или натриевой соли 1-нитробутан-2-она (**5b**) в 6 мл H₂O. Смесь выдерживают в течение 30 мин при –10÷–7°C и затем при комнатной температуре в течение 1 ч. Продукт экстрагируют EtOAc, растворитель упаривают, остаток перемешивают в 20 мл CHCl₃ в течение 30 мин и фильтруют, промывают EtOH.

4-Метил-3-нитро-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-4-ол (8a). Выход 0.71 г (36%), желтый порошок, т. пл. 146–148°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3223 (O–H), 3141 (N–H), 1530, 1320 (NO₂), 1206, 1184 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 2.40 (3H, с, CH₃); 7.03 (1H, с, CH); 7.86 (1H, с, OH); 12.12 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 25.5; 83.2; 144.4; 146.5; 152.1. Найдено, %: C 30.69; H 3.05; N 42.62. C₅H₆N₆O₃. Вычислено, %: C 30.31; H 3.05; N 42.21.

4,7-Диметил-3-нитро-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8b). Выход 0.53 г (25%), желтый порошок, т. пл. 151–153°C (с разл.). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3264 (O–H), 3100 (N–H), 1556, 1318 (NO₂), 1174 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 2.26 (3H, с, CH₃); 2.36 (3H, с, CH₃); 6.89 (1H, с, OH); 11.98 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 14.5; 25.6; 82.9; 144.5; 146.7; 161.4. Найдено, %: C 33.91; H 3.81; N 39.54. C₆H₈N₆O₃. Вычислено, %: 33.97; H 3.80; N 39.61.

4-Метил-7-(метилсульфанил)-3-нитро-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8c). Выход 0.63 г (26%), желтый порошок, т. пл. 151–153°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3250 (O–H), 3168 (N–H сл), 1556, 1316 (NO₂), 1157 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 2.37 (3H, с, CH₃); 2.56 (3H, с, SCH₃); 6.99 (1H, с, OH); 12.07 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 14.0; 25.4; 83.1; 144.7; 147.2; 162.8. Найдено, %: C 29.51; H 3.18; N 34.05. C₆H₈N₆O₃S. Вычислено, %: C 29.51; H 3.30; N 34.41.

4-Метил-3-нитро-7-(трифторметил)-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8d). Выход 0.85 г (32%), желтый порошок, т. пл. 164–166°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3329 (O–H), 3196 (N–H), 1539, 1329 (NO₂), 1152 (C–F). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 2.43 (3H, с, CH₃); 7.37 (1H, с, OH); 12.41 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д. (*J*, Гц): 25.4; 84.2; 120.2 (к, *J* = 269.2); 144.8; 147.8; 153.5 (к, *J* = 39.6). Спектр ЯМР ¹⁹F (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: –66.65 (CF₃). Найдено, %: C 27.14; H 1.66; N 31.55. C₆H₅N₆O₃F₃. Вычислено, %: C 27.08; H 1.89; N 31.58.

Этил-4-гидрокси-4-метил-3-нитро-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-карбоксилат (8e). Выход 1.11 г (41%), желтый порошок, т. пл. 194–196°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3272 (O–H), 1676 (C=O), 1579, 1322 (NO₂), 1148 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.37 (3H, т, *J* = 7.1, CH₃); 2.44 (3H, с, CH₃); 4.35–4.44 (2H, м, CH₂); 7.22 (1H, с, OH); 12.28 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 14.5; 25.6; 62.3; 84.1; 144.6; 147.2; 154.8; 160.1. Найдено, %: C 35.40; H 3.90; N 31.32. C₈H₁₀N₆O₅. Вычислено, %: C 35.56; H 3.73; N 31.10.

Этил-4-гидрокси-4-метил-3-нитро-1,4-дигидропирозоло[5,1-с][1,2,4]триазин-8-карбоксилат (8f). Выход 1.34 г (50%), желтый порошок, т. пл. 153–155°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3272 (O–H), 1676 (C=O), 1579, 1322 (NO₂), 1148 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.32 (3H, т, *J* = 7.1, CH₃); 2.42 (3H, с, CH₃); 4.32 (2H, к, *J* = 7.1, CH₂); 6.96 (1H, с, CH); 7.90 (1H, с, OH); 11.48 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 14.9; 25.2; 60.9; 81.8; 97.4; 138.6; 142.1; 144.9; 162.7. Найдено, %: C 39.64; H 3.92; N 25.81. C₉H₁₁N₅O₅. Вычислено, %: C 40.15; H 4.12; N 26.01.

3-Нитро-4-этил-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-4-ол (8g). Выход 1.09 г (51%), желтый порошок, т. пл. 147–149°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1540, 1321 (NO₂), 1029 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (CD₃CN), δ , м. д. (*J*, Гц): 0.65 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 2.68–2.80 (2H, м, CH₂); 5.72 (1H, с, CH); 7.84 (1H, с, OH); 10.82 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (CD₃CN), δ , м. д.: 8.7; 31.1; 87.9; 143.4; 147.4; 152.5. Найдено, %: C 33.80; H 3.73; N 39.26. C₆H₈N₆O₃. Вычислено, %: C 33.97; H 3.80; N 39.61.

7-Метил-3-нитро-4-этил-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8h). Выход 0.98 г (43%), желтый порошок, т. пл. 163–165°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1545, 1330 (NO₂ с), 1132 (C–O с). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д. (*J*, Гц): 0.71 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 2.27 (3H, с, CH₃); 2.74–2.88 (2H, м, CH₂); 6.98 (1H, с, OH); 12.04 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 8.6; 14.4; 30.9; 87.3; 142.9; 147.2; 162.1. Найдено, %: C 37.06; H 4.54; N 37.22. C₇H₁₀N₆O₃. Вычислено, %: C 37.17; H 4.46; N 37.15.

7-(Метилсульфанил)-3-нитро-4-этил-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8i). Выход 1.18 г (46%), желтый порошок, т. пл. 151–153°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1539, 1326 (NO₂ с), 1133 (C–O с). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д. (*J*, Гц): 0.75 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 2.56 (3H, с, SCH₃); 2.73–2.89 (2H, м, CH₂); 7.05 (1H, с, OH); 12.10 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-*d*₆), δ , м. д.: 8.8; 14.1; 30.9; 87.9; 143.7; 148.1; 163.3. Найдено, %: C 32.60; H 3.93; N 32.56. C₇H₁₀N₆O₃S. Вычислено, %: C 32.55; H 3.90; N 32.54.

3-Нитро-7-(трифторметил)-4-этил-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (8j). Выход 1.50 г (53%), желтый порошок, т. пл. 171–173°C (EtOAc). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3431 (O–H), 1553, 1338 (NO₂), 1157 (C–F), 1133 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (CD₃CN), δ , м. д. (*J*, Гц): 0.70 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 2.68–2.78 (2H, м, CH₂); 5.97 (1H, с, OH); 10.97 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C

(CD₃CN), δ, м. д. (J, Гц): 8.6; 31.3; 88.8; 120.1 (к, J = 270.3); 143.8; 148.7; 153.9 (к, J = 39.3). Спектр ЯМР ¹⁹F (CD₃CN), δ, м. д.: –67.13 (CF₃). Найдено, %: С 29.91; Н 2.48; N 30.00. С₇H₇N₆O₃F₃. Вычислено, %: С 30.01; Н 2.52; N 30.00.

Этил-4-гидрокси-3-нитро-4-этил-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-карбоксилат (8k). Выход 1.13 г (40%), желтый порошок, т. пл. 189–191°C (EtOAc). ИК спектр, ν, см⁻¹: 1748 (C=O), 1540, 1328 (NO₂), 1033 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 0.75 (3H, т, J = 7.5, CH₃); 1.37 (3H, т, J = 7.1, CH₃); 2.82–2.92 (3H, м, CH₃); 4.35–4.44 (2H, м, CH₂); 7.37 (1H, с, OH); 12.35 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-d₆), δ, м. д.: 8.7; 14.5; 31.4; 62.4; 88.7; 143.5; 148.1; 155.2; 160.0. Найдено, %: С 38.01; Н 4.11; N 29.61. С₉H₁₂N₆O₅. Вычислено, %: С 38.03; Н 4.26; N 29.57.

Этил-4-гидрокси-3-нитро-4-этил-1,4-дигидро-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин-8-карбоксилат (8l). Выход 1.34 г (50%), желтый порошок, т. пл. 184–186°C (EtOAc). ИК спектр, ν, см⁻¹: 3256 (O–H), 3128 (N–H), 1682 (C=O), 1580, 1317 (NO₂), 1156, 1116 (C–O). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 0.69 (3H, т, J = 7.5, CH₃); 1.33 (3H, т, J = 7.1, CH₃); 2.78–3.02 (2H, м, CH₂); 4.29–4.37 (2H, м, CH₂); 7.05 (1H, с, CH); 7.92 (1H, с, OH); 11.52 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-d₆), δ, м. д.: 8.8; 14.8; 30.7; 60.9; 86.5; 97.4; 139.4; 142.5; 143.7; 162.6. Найдено, %: С 42.06; Н 4.57; N 23.68. С₁₀H₁₃N₅O₅. Вычислено, %: С 42.40; Н 4.63; N 24.73.

3-Нитро-7-(трифторметил)-4-этилиден-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (9). 3-Нитро-7-(трифторметил)-4-этил-1,4-дигидро[1,2,4]триазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-4-ол (8j) 0.28 г (0.001 моль) нагревают без растворителя до 120°C и выдерживают в течение 4 ч. Выход 0.26 г (98%), коричневый порошок, т. пл. 174–176°C. ИК спектр, ν, см⁻¹: 1540, 1362 (NO₂), 1148 (C–F). Спектр ЯМР ¹H (Me₂CO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 2.27 (3H, д, J = 7.7, CH₃); 5.76 (1H, к, J = 7.7, CH); 12.17 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (Me₂CO-d₆), δ, м. д. (J, Гц): 12.9; 111.2; 119.9 (к, J = 269.3); 121.1; 147.6; 149.6; 153.4 (к, J = 39.4). Спектр ЯМР ¹⁹F (C₃D₆O), δ, м. д.: –66.88 (3F, CF₃). Найдено, %: С 32.04; Н 1.74; N 31.92. С₇H₅N₆O₂F₃. Вычислено, %: С 32.07; Н 1.92; N 32.06.

Исследование цитотоксического действия полученных соединений 8a–l в культуре клеток проводят на основе оценки жизнеспособности клеток при помощи реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ (бромид 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2H-тетразолия) митохондриальными дегидрогеназами жизнеспособных клеток. При восстановлении МТТ раствор приобретает окраску, интенсивность которой отражает степень жизнеспособности клеток.

Исследование цитотоксичности проводят на культурах клеток MDCK и Vero. Рассмотренные соединения в диапазоне концентраций 4–300 мкг/мл для культуры клеток MDCK и 12.5–400 мкг/мл для культуры клеток Vero, растворенные в среде для культивирования клеток, вносят в лунки 96-луночного планшета с монослоем клеток в объеме 200 мкл/лунку и инкубируют в течение 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По истечении

инкубации клетки промывают средой альфа-МЕМ, и в лунки планшетов добавляют по 100 мкл раствора (0.5 мг/мл) МТТ в среде для клеток. Клетки инкубируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч и промывают в течение 5 мин физиологическим раствором. Осадок растворяют в 100 мкл ДМСО на лунку, после чего оптическую плотность измеряют при длине волны 540 нм с помощью планшетного анализатора Multiscan FC (Thermo Scientific). На основании полученных данных рассчитывают 50% цитотоксическую концентрацию (CC₅₀), то есть концентрацию соединения, снижающую оптическую плотность в лунках вдвое по сравнению с контрольными клетками без препаратов.

Исследование противовирусной активности полученных соединений 8a–l. В работе используют вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и вирус Коксаки В3 (штамм Nancy). Вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) реплицируется в культуре клеток MDCK, вирус Коксаки В3 – в культуре клеток Vero. Исследуемые образцы в диапазоне концентраций 4–300 мкг/мл для вируса гриппа и 12.5–400 мкг/мл для вируса Коксаки В3, растворенные в среде для культивирования клеток, вносят в лунки планшетов с монослоем в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты с клетками инкубируют в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносят по 100 мкл соответствующего вируса при множественности инфицирования (m.o.i.) 0.01 TCID₅₀ на клетку в среде альфа-МЕМ и инкубируют в течение 48 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По истечении срока инкубации клетки промывают средой альфа-МЕМ и проводят анализ жизнеспособности клеток, как описано выше. На основании полученных данных рассчитывают значение 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) – той концентрации соединения, которая приводит к 50% снижению цитодеструктивного действия вируса.

Анализ данных. Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) и 50% эффективной концентрации (IC₅₀) проводят при помощи пакета программ GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа принимают 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню "Нелинейная регрессия" – "логарифм ингибитора – ответ"). На основании полученных данных для каждого соединения рассчитывают индекс селективности (SI), коэффициент, равный отношению CC₅₀ к IC₅₀. Перспективными считают те соединения, для которых SI составляет 10 и выше.

Рентгеноструктурный анализ соединения 8j выполнен на автоматическом дифрактометре Xcalibur 3 по стандартной методике: MoKα-излучение, λ 0.71073 Å, графитовый монохроматор, ω-сканирование с шагом 1° при 292(2)K. Введена эмпирическая поправка на поглощение. Структура расшифрована прямым статистическим методом и уточнена полноматричным МНК по F² в анизотропном приближении для всех неводородных атомов. Положения атомов водорода связей C–H рассчитаны геометрически, положения протонов групп

ОН и NH уточнены независимо в изотропном приближении. Все расчеты проведены с использованием программного пакета SHELXTL.²⁶ Основные кристаллографические параметры соединения: кристалл триклинный, пространственная группа $P\bar{1}$; a 6.2042(6), b 8.5391(7), c 10.6202(9) Å; α 85.326(7), β 77.235(8), γ 76.542(8)°; μ 0.170 мм⁻¹. На углах $3.60 < \theta < 30.83^\circ$ собрано 4608 отражений, из них независимых 2874 (R_{int} 0.0318). Окончательные параметры уточнения: R_1 0.0972, wR_2 0.2003 (по всем отражениям), R_1 0.0585, wR_2 0.1536 (по отражениям с $I > 2\sigma(I)$) при факторе добротности GOOF 1.004. Пики остаточной электронной плотности 0.280/–0.365 еÅ⁻³. Полный набор рентгеноструктурных данных соединения депонирован в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 2042591).

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР ¹H, ¹³C и ¹⁹F синтезированных соединений, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-13-00142).

Рентгеноструктурное исследование проведено на оборудовании Центра коллективного пользования "САОС" Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН. Спектральные данные получены на оборудовании лаборатории "Комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов".

Список литературы

1. Зайцев, А. А.; Синопальников, А. И. *Рус. мед. журн.* **2008**, 22, 1494.
2. Никонов, О. С.; Черных, Е. С.; Гарбер, М. Б.; Никонова, Е. Ю. *Успехи биол. химии* **2017**, 57, 119.
3. Tonelli, M.; Cichero, E. *Curr. Med. Chem.* **2016**, 23, 1802.
4. Hayden, F. G.; Sugaya, N.; Hirotsu, N.; Lee, N.; de Jong, M. D.; Hurt, A. C.; Ishida, T.; Sekino, H.; Yamada, K.; Portsmouth, S.; Kawaguchi, K.; Shishido, T.; Arai, M.; Tsuchiya, K.; Uehara, T.; Watanabe, A. N. *Engl. J. Med.* **2018**, 379, 913.
5. Blaising, J.; Polyak, S. J.; Pécheur, E.-I. *Antiviral Res.* **2014**, 107, 84.
6. Lampejo, T. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, 39, 1201.
7. Shiraki, K.; Daikoku, T. *Pharmacol Ther.* **2020**, 209, 107512.
8. Lincez, P. J.; Walic, M.; Horwitz, M. S. In *Myocarditis*; Cihakova D., Ed.; InTech: China, 2011, p. 243.
9. Rusinov, V. L.; Charushin, V. N.; Chupakhin, O. N. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2018**, 67, 573. [*Изв. АН, Сер. хим.* **2018**, 573.]
10. Токин, И. И.; Цветков, В. В.; Голобоков, Г. С. *Журн. инфектологии* **2018**, 10(2), 110.
11. Веревицкий, В. К.; Шемякина, Е. К.; Сабитов, А. У.; Бацкалевич, Н. А. *Антибиотики и химиотерапия* **2018**, 63(7–8), 47.
12. Тихонова, Е. П.; Кузьмина, Т. Ю.; Анисимова, А. А.; Калинина, Ю. С. *Экспериментальная и клиническая фармакология* **2018**, 81(9), 21.
13. Leneva, I. A.; Falynskova, I. N.; Makhmudova, N. R.; Glubokova, E. A.; Kartashova, N. P.; Leonova, E. I.; Mikhailova, N. A.; Shestakova, I. V. *MIR J.* **2017**, 4, 52.
14. Веревицкий, В. К.; Шемякина, Е. К.; Сабитов, А. У.; Хаманова, Ю. Б. *Антибиотики и химиотерапия* **2019**, 64(3–4), 10.
15. Токин, И. И.; Зубкова, Т. Г.; Дроздова, Ю. В.; Лиюзнов, Д. А. *Инфекционные болезни* **2019**, 17(4), 13.
16. Rusinov, V. L.; Ulomskii, E. N.; Chupakhin, O. N.; Charushin, V. N. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2008**, 57, 985. [*Изв. АН, Сер. хим.* **2008**, 967.]
17. Rusinov, V. L.; Pilicheva, T. L.; Chupakhin, O. N.; Klyuev, N. A.; Allakhverdieva, D. T. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1986**, 22, 543. [*Химия гетероцикл. соединений* **1986**, 662.]
18. Rusinov, V. L.; Petrov, A. Yu.; Chupakhin, O. N.; Klyuev, N. A.; Aleksandrov, G. G. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1985**, 21, 576. [*Химия гетероцикл. соединений* **1985**, 682.]
19. Creegan, S. E.; Piercey, D. G. *RSC Adv.* **2020**, 10, 39478.
20. Voinkov, E. K.; Ulomskiy, E. N.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N.; Gorbunov, E. B.; Drokin, R. A.; Fedotov, V. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 51, 1057. [*Химия гетероцикл. соединений* **2015**, 51, 1057.]
21. Voinkov, E. K.; Ulomskiy, E. N.; Rusinov, V. L.; Drokin, R. A.; Fedotov, V. V.; Gorbunov, E. B. *Mendeleev Commun.* **2017**, 27, 285.
22. Rusinov, V. L.; Drokin, R. A.; Tiufiakov, D. V.; Voinkov, E. K.; Ulomsky, E. N. *Mendeleev Commun.* **2020**, 30, 177.
23. Gharui C.; Pan S. C. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 5190.
24. Shchegol'kov, E. V.; Makhaeva, G. F.; Boltneva, N. P.; Lushchekina, S. V.; Serebryakova, O. G.; Rudakova, E. V.; Kovaleva, N. V.; Burgart, Y. V.; Saloutin, V. I.; Chupakhin, O. N.; Bachurin, S. O.; Richardson, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 3997.
25. Khudina, O. G.; Shchegol'kov, E. V.; Burgart, Ya. V.; Kodess, M. I.; Kazheva, O. N.; Chekhlov, A. N.; Shilov, G. V.; Dyachenko, O. A.; Saloutin, V. I.; Chupakhin, O. N. *J. Fluorine Chem.* **2005**, 126, 1230.
26. Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, A64, 112.