

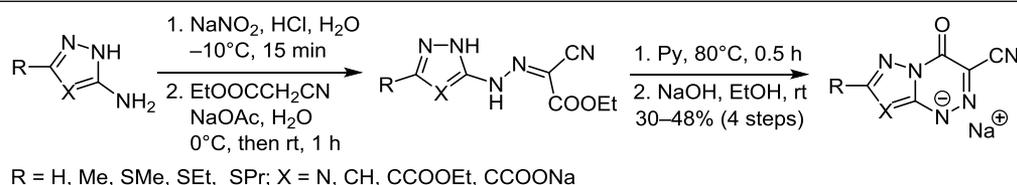
## 3-Цианазоло[5,1-с][1,2,4]триазины: синтез и противовирусная активность

Ирина М. Сапожникова<sup>1\*</sup>, Евгений Н. Уломский<sup>1</sup>,  
Владимир Л. Русинов<sup>1</sup>, Олег Н. Чупахин<sup>1</sup>, Александр В. Степанов<sup>2</sup>,  
Татьяна Н. Саватеева-Любимова<sup>2</sup>, Константин В. Сивак<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина,  
ул. Мира, 19, Екатеринбург 620002, Россия; e-mail: i.m.sapozhnikova@urfu.ru

<sup>2</sup> НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России,  
ул. Профессора Попова, 15/17, Санкт-Петербург 197376, Россия  
e-mail: alexander\_58@mail.ru

Поступило 4.01.2021  
Принято после доработки 15.02.2021



Получен ряд цианосодержащих азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – аналогов препарата Триазавирин (риамиловир). 7-Метилсульфанил-4-оксо-3-циано-4*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ид натрия исследован на противовирусную активность в отношении вирусов клещевого энцефалита, венесуэльского энцефаломиелиита лошадей и восточного энцефаломиелиита лошадей на модели клеток почки эмбриона свиньи и на мышинной модели по протоколу экстренной профилактики и лечебному протоколу, а также исследована его общая токсичность.

**Ключевые слова:** азолоазины, азолотриазины, нитрилы, венесуэльский энцефаломиелиит лошадей, восточный энцефаломиелиит лошадей, клещевой энцефалит, противовирусная активность.

Клещевой энцефалит (КЭ) – природно-очаговая вирусная нейроинфекция, широко распространенная в Евразии и передающаяся в основном через укусы иксодовых клещей. Его возбудителем является вирус клещевого энцефалита, являющийся РНК-вирусом и принадлежащий к семейству флавивирусов. На сегодняшний день заболевание является эндемичным в 27 странах Европы и 4 странах Азии.<sup>1</sup> Так, в Российской Федерации за десятилетний период с 2007 по 2016 г. зафиксировано более 27 тысяч случаев КЭ, и, несмотря на общее снижение динамики, эпидемиологическая ситуация остается достаточно напряженной.<sup>2</sup>

Для постконтактной профилактики и лечения КЭ применяют в первую очередь специфические иммуноглобулины, однако существуют данные о риске развития тяжелых побочных иммунопатологических явлений, в связи с чем, целесообразность применения этих иммуноглобулинов ставится под сомнение. В то же время на сегодняшний день не существует общепризнанных схем лечения клещевого энцефалита низкомолекулярными противовирусными препаратами, что обуславливает актуальность поиска новых этиотропных препаратов.<sup>1</sup>

К другим природно-очаговым инфекциям относятся также венесуэльский энцефаломиелиит лошадей (ВЭЛ) и восточный энцефаломиелиит лошадей (ВсЭЛ), распространенные в Северной и Южной Америке. Вирус ВЭЛ вызывает периодические эпидемические вспышки в эндемичных регионах, летальность для человека при этом составляет 0.7%; летальность для лошадей составляет до 50%, что негативно сказывается на сельском хозяйстве.<sup>3,4</sup> Заболеваемость ВсЭЛ является невысокой, однако летальность при этом варьируется от 36 до 75%, что является важной медицинской проблемой.<sup>5</sup>

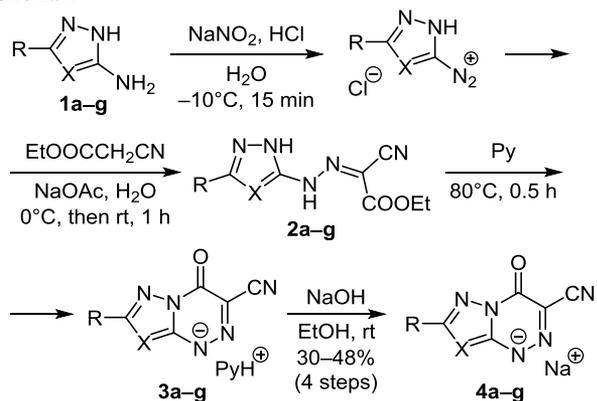
Триазавирин (риамиловир, 7-метилсульфанил-3-нитро-4-оксо-4*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид натрия) – противовирусный препарат широкого спектра действия, который применяется в клинической практике как противогриппозный препарат.<sup>6</sup> Была показана эффективность Триазавиринна как на животных моделях,<sup>7,8</sup> так и в клинических исследованиях.<sup>9</sup> Применение Триазавиринна у больных с лихорадочными формами клещевого энцефалита позволяет сократить лихорадочный период, купирует такие симптомы, как головная боль, гиперестезия и светобоязнь.

Нами были получены аналоги препарата Триазирин – 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины и пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины, содержащие нитрильную группу вместо нитрогруппы в положении 3 триазинового цикла. Ранее была описана натриевая соль 3-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина, незамещенная по триазольному циклу, а также производные пиразоло-триазинов, обладающие противодиабетической активностью.<sup>10–12</sup>

Нитрильная группа является фармакофорной: в одних случаях она отвечает за специфические взаимодействия с ферментами, в других – оказывает положительное влияние на фармакокинетические свойства препарата. Производные нитрилов найдены во многих классах лекарственных препаратов, таких как ингибиторы дипептидилпептидазы-4, препараты против ВИЧ, противоопухолевые препараты и др.<sup>13</sup>

В основе синтеза солей 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов лежит хорошо известный метод получения азолотриазинов, состоящий из диазотирования аминоктолов **1a–g**, азосочетания с СН-активными синтонами и дальнейшей циклизации полученных азолонгидразонов (схема 1). Для введения цианогруппы был использован этилцианацетат, азосочетание при этом проводилось в водном растворе NaOAc. Полученные гидразоны **2a–g** далее циклизовали в пиридине при нагревании до 80°C. Также подобный метод был описан ранее, циклизация при этом проводилась при кипячении в пиридине.<sup>11,14,15</sup> Уменьшение температуры реакции не снижает выход, однако позволяет уменьшить количество примесей в конечном продукте.

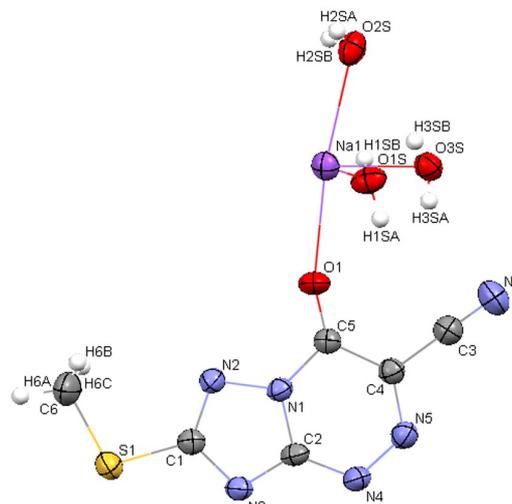
#### Схема 1



**a** R = Me, X = N; **b** R = SMe, X = N; **c** R = SEt, X = N  
**d** R = SPr, X = N; **e** R = H, X = CH; **f** R = SMe, X = CCOEt  
**g** R = SMe, X = CCOONa

В результате циклизации гидразонов **2a–g** образуются пиридиниевые соли азолотриазинов **3a–g**. Нами был разработан удобный одностадийный метод перевода пиридиниевых солей в натриевые без стадии образования NH-кислоты, заключающийся в суспендировании соли пиридина в EtOH и добавлении NaOH, предварительно растворенного в EtOH. Целевые натриевые соли **4a–g** при этом выпадают в осадок и могут быть выделены фильтрацией.

Полученные соединения охарактеризованы с помощью спектроскопии ЯМР и элементного анализа. Установ-



**Рисунок 1.** Молекулярная структура соединения **4b**, в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 50% вероятностью.

лено, что все соединения представляют собой кристаллогидраты, большинство из них – тригидраты. Структура соединения **4b** была также подтверждена с помощью рентгеноструктурного анализа (рис. 1).

Была исследована биологическая активность соединения **4b** в отношении вирусов КЭ, ВЭЛ и ВсЭЛ *in vitro* и *in vivo*.<sup>16–18</sup> Выбор данного соединения был осуществлен по результатам предварительных пилотных исследований в острых опытах заражения на модели КЭ с каждым из полученных соединений данной серии.

Оценку эффективности соединения **4b** в отношении вирусов КЭ (штамм Абсеттаров), ВЭЛ (штамм Венесуэлла 230) и ВсЭЛ (штамм 463) проводили в культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) по уровню подавления репродукции исследуемых возбудителей в присутствии соединения **4b**. Уровень накопления вируса в культуре клеток оценивали титрованием методом формирования негативных колоний.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что соединение **4b** эффективно (в 100 раз) подавляет репродукцию вируса ВсЭЛ в высоких концентрациях (50 и 100 мкг/мл). При этом соединение **4b** в дозе

**Таблица 1.** Эффективность соединения **4b** в отношении вирусов КЭ, ВЭЛ и ВсЭЛ *in vitro*

Концентрация, мкг/мл	Вирус КЭ		Вирус ВЭЛ		Вирус ВсЭЛ	
	Титр вируса, lgBOE*/мл	Снижение титра, Δlg	Титр вируса, lgBOE*/мл	Снижение титра, Δlg	Титр вируса, lgBOE*/мл	Снижение титра, Δlg
0	7.2	нет	7.2	нет	7.2	нет
1	6.3	0.9	6.6	0.6	6.1	1.1
5	5.8	1.4	6.3	0.9	5.8	1.4
10	5.6	1.6	6.1	1.1	5.7	1.5
20	5.5	1.7	6.1	1.1	5.5	1.7
50	–	–	6.0	1.2	5.3	1.9
100	–	–	5.3	1.9	4.6	2.6

\* БОЕ – количество бляшкообразующих единиц.

100 мкг/мл вызывает частичную деструкцию монослоя. В концентрации 1–20 мкг/мл соединение **4b** снижает уровень накопления вируса ВсЭЛ в 10–50 раз. Подавление размножения вируса ВЭЛ под влиянием соединения **4b** в концентрации 100 мкг/мл составило 1.9 IgБОЕ. В диапазоне концентраций 1–20 мкг/мл соединения **4b** снижает уровень накопления вируса в 10–15 раз. Соединение **4b** в диапазоне концентраций 1–20 мкг/мл ингибирует репродукцию вируса КЭ в 8–50 раз.

Вирус КЭ патогенен для новорожденных и взрослых (в возрасте 3–4 недель) белых мышей. Наиболее эффективный путь заражения – в мозг. Инфекция протекает остро с летальным исходом и поражением центральной нервной системы. Заболевание сопровождается вирусемией и диссеминацией вируса во внутренние органы. В ранее проведенных исследованиях показано, что вирус КЭ высокопатогенен для мышей массой 8–10 г не только при интрацеребральном, но и подкожном инфицировании. У зараженных подкожно мышшей инфекция протекает остро с летальным исходом и высоким уровнем накопления вируса в тканях головного мозга. В связи с вышеперечисленным наиболее приемлемой лабораторной моделью для изучения эффективности соединения **4b** в отношении КЭ являются белые мыши массой 8–10 г, инфицированные подкожно вирусом КЭ, штамм Абсеттаров. Данные, полученные в результате проведенных исследований, представлены в табл. 2.

По табл. 2 видно, что соединение **4b** в дозе 100 мг/кг перорально обладает умеренной эффективностью при применении по протоколу экстренной профилактики. Защитный эффект составляет 40%. Умеренно эффективным исследуемое соединение оказалось и при испытании в качестве средства лечения. Защита от гибели инфицированных животных составила 35%. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) инфицированных животных в контрольной группе составила 8.5 сут. При введении соединения **4b** по протоколу экстренной профилактики показатель СПЖ в опытной группе животных значительно изменился, по сравнению с контрольной, и составил 13.1 сут. В группе животных, которым соединение **4b** вводили по лечебному протоколу, этот показатель увеличился на 4.8 сут. То есть, можно констатировать, что протокол применения соединения **4b** в плане экстренной профилактики или лечения КЭ не имеет существенных различий.

Специфическую гибель животных подтверждали выделением вируса из тканей головного мозга погиб-

ших мышшей по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток СПЭВ. Оценивали уровень накопления вируса КЭ в головном мозге погибших животных. Результаты титрования 10% суспензии головного мозга мышшей показали, что соединение **4b** подавляет репродукцию вируса примерно в 100 раз в том случае, когда его вводят через 2 ч после инфицирования и далее в течение всего инкубационного периода. При применении соединения **4b** в лечебных целях существенного отличия в уровне подавления репродукции вируса от применения при профилактике не отмечено.

Для изучения противовирусного действия соединения **4b** в отношении экспериментальной формы ВЭЛ у белых мышшей (доза инфицирования 10 ЛД<sub>50</sub>) использовали следующие протоколы:

Протокол 1. Соединение **4b** вводили мышам перорально в дозе 50 и 100 мг/кг через 2 ч после инфицирования и далее ежедневно в течение 5 сут один раз в сутки.

Протокол 2. Соединение **4b** вводили мышам перорально в дозе 50 и 100 мг/кг через 24 ч после инфицирования и далее ежедневно в течение 4 сут один раз в сутки.

Результаты изучения эффективности тестируемого соединения в отношении экспериментальной формы ВЭЛ у белых мышшей при парентеральном способе инфицирования представлены в табл. 3.

Как свидетельствуют представленные данные, соединение **4b** обладает противовирусной активностью в отношении экспериментальной формы ВЭЛ у белых мышшей. При этом эффект в определенной степени зависит как от протокола введения, так и использованной дозы. Более эффективным оказалось применение соединения **4b** в дозе 100 мг/кг. В этом случае уровень защиты находился в пределах 70–80%, в то же время при применении соединения **4b** в дозе 50 мг/кг, этот показатель находился в пределах 40–60%. В большинстве случаев различия с контрольной группой в показателях защиты носили достоверный ( $p < 0.05$ ) характер. Таким образом, следует признать высокую защитную эффективность соединения **4b** в отношении экспериментальной инфекции ВЭЛ.

Для изучения противовирусного действия соединения **4b** в отношении экспериментальной формы ВсЭЛ у белых мышшей (доза инфицирования 10 ЛД<sub>50</sub>) использовали аналогичную схему, описанную при использовании модели ВЭЛ (табл. 4).

**Таблица 3.** Противовирусная активность соединения **4b** при применении после заражения вирусом ВЭЛ

Экспериментальные группы (10 животных в каждой группе)	Защита от гибели (доверительный интервал), %	Титр вируса, IgБОЕ/мл	Снижение накопления вируса в мозге, Δlg
Контроль плацебо	0	8.4	–
Соединение <b>4b</b> 50 мг/кг, протокол 1	60.0 (26–83)	7.6	0.8
Соединение <b>4b</b> 50 мг/кг, протокол 2	40.0 (12–74)	7.3	1.1
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, протокол 1	80.0 (44–98)	7.2	1.2
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, протокол 2	70.0 (69–100)	7.4	1.0

**Таблица 2.** Противовирусная активность соединения **4b** при применении по протоколу экстренной профилактики и после заражения вирусом КЭ

Экспериментальные группы (10 животных в каждой группе)	Защита от гибели (доверительный интервал), %	Титр вируса, IgБОЕ/мл	Снижение накопления вируса в мозге, Δlg
Контроль плацебо	0	8.8	–
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, 24–120 ч*	40.0 (12–74)	8.0	0.8
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, 24–120 ч	35.0 (11–69)	8.1	0.7

\* Соединение **4b** введено за 2 ч до заражения.

**Таблица 4.** Эффективность соединения **4b** в отношении экспериментальной формы ВсЭЛ у белых мышей при парентеральном инфицировании

Экспериментальные группы (10 животных в каждой группе)	Защита от гибели (доверительный интервал), %	Титр вируса, lgБОЕ/мл	Снижение накопления вируса в мозге, Δlg
Контроль плацебо	0 (0–31)	8.3	–
Соединение <b>4b</b> 50 мг/кг, протокол 1	50.0 (19–81)	7.6	0.8
Соединение <b>4b</b> 50 мг/кг, протокол 2	40.0 (2–74)	7.3	1.1
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, протокол 1	70.0 (35–93)*	7.2	1.2
Соединение <b>4b</b> 100 мг/кг, протокол 2	70.0 (35–93)*	7.4	1.0

\* Различия достоверны по сравнению с контролем (плацебо) при  $p < 0.05$ .

Защитная эффективность соединения **4b** в дозе 50 мг/кг в отношении экспериментальной формы ВсЭЛ у белых мышей при введении его животным по протоколу экстренной профилактики (протокол 1), составила 50.0%; увеличение СПЖ в группе животных составило 7.2 сут. Если же соединение **4b** в аналогичной дозе применяли в качестве терапевтического средства, то его защитная эффективность составляла 40%, а увеличение СПЖ составило 6.8 сут по сравнению с контролем. Более высокую защитную эффективность в отношении экспериментальной формы ВсЭЛ соединение **4b** проявляла в дозе 100 мг/кг. При применении соединения **4b** по протоколу экстренной профилактики (протокол 1) защитный эффект составил 70%, а увеличение СПЖ – 13 сут. Аналогичный уровень защиты регистрировали и при применении соединения **4b** в аналогичной дозе, но по схеме терапии. СПЖ, по сравнению с контролем, составила 11.8 сут. Во всех группах леченных животных значительно увеличился показатель СПЖ. Таким образом, соединение **4b** характеризовалось достаточно высокой активностью в отношении экспериментальной формы ВсЭЛ.

Было проведено также доклиническое исследование общетоксического действия соединения **4b** в соответствии с Руководством по доклиническому исследованию лекарственных средств.<sup>19</sup> Соединение **4b** растворяли в апиrogenной воде. При изучении острой токсичности показано, что внутривенное введение соединения **4b** белым мышам и крысам обоего пола не вызвало патологических изменений поведения и общего состояния животных. Морфологические изменения внутренних органов и головного мозга у опытных животных отсутствовали. Результаты токсикометрии, полученные при внутривенном введении, позволяют отнести соединение **4b** к IV классу малотоксичных веществ. При изучении субхронической токсичности показано, что ежедневное внутривенное введение субстанции в течение 28 сут в дозе, равной 375 мг/кг, крысам самцам и самкам и в дозе, равной 105 мг/кг, кроликам самцам и самкам, не обусловило смертности животных, не вызвало патологических проявлений в состоянии и поведении животных, не

повлияло на интегральные показатели жизнедеятельности и на системы терморегуляции независимо от пола. Массовые коэффициенты органов опытных животных находились в диапазоне референсных значений физиологической нормы для каждого вида. Изучение фармакологической безопасности не выявило токсического воздействия в отношении органов и систем, функции которых могут быть временно нарушены вследствие неблагоприятных фармакодинамических эффектов без причинения необратимого вреда (гепатобилиарная система, системы крови и общего обмена), а также в отношении органов и систем, функции которых остро критичны для жизни (дыхательная, сердечно-сосудистая и центральная нервная системы). Оценка местно-раздражающего действия показала его отсутствие при внутривенном введении соединения **4b** крысам и кроликам обоего пола.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют высокий потенциал цианосодержащих азоло-[5,1-с][1,2,4]триазинов для использования в качестве противовирусных препаратов. Одно из синтезированных соединений – тригидрат 7-метилсульфанил-4-оксо-3-циано-4H-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия, будучи малотоксичным, показало хороший результат при исследованиях как на клеточной культуре, так и на мышинной модели в отношении вирусов клещевого энцефалита, венесуэльского энцефаломиелиита лошадей и восточного энцефаломиелиита лошадей.

#### Экспериментальная часть

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C записаны на спектрометре Bruker Avance II (400 и 100 МГц соответственно) с использованием ТМС в качестве внутреннего стандарта. Элементный анализ проведен на автоматическом CHNS/O анализаторе PerkinElmer 2400 Series II. Температуры плавления определены на приборе Voetius. Соединения **1a–g** синтезированы по известным методикам.<sup>11,20–23</sup>

**Синтез соединений 4a–g** (общая методика). В смеси 10 мл концентрированной HCl и 5 мл H<sub>2</sub>O растворяют 0.05 моль соответствующего аминоазола **1a–g**, раствор охлаждают до –10°C. Далее при интенсивном перемешивании прикапывают раствор 3.5 г (0.051 моль) NaNO<sub>2</sub> в 5 мл H<sub>2</sub>O, после окончания добавления раствор выдерживают в течение 15 мин при –10°C. Полученный раствор соли диазония добавляют к охлажденной до 0°C смеси 5.3 мл (0.05 моль) этилцианацетата и 30 мл (0.12 моль) 3.9 M раствора NaOAc. Реакционную смесь выдерживают в течение 10 мин при температуре 0°C, затем в течение 1 ч при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывают и сушат. Высушенный осадок растворяют в 25 мл пиридина и нагревают при перемешивании при 80°C в течение 30 мин. Реакционную смесь упаривают, промывают EtOAc и сушат. Высушенный осадок суспендируют в 30 мл EtOH, приливают раствор 2 г NaOH в 10 мл EtOH, контролируя pH (не выше 9). Осадок отфильтровывают, промывают EtOH, сушат и перекристаллизовывают из 50% EtOH.

**Тригидрат 7-метил-4-оксо-3-циано-4H-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия (4a)**. Выход

3.80 г (30%), бесцветные кристаллы, т. пл. 249–251°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 2.41 (3H, с,  $\text{CH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 15.0; 116.7; 118.0; 143.0; 150.2; 163.4. Найдено, %: С 28.85; Н 3.73; N 33.04.  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_6\text{NaO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 28.58; Н 3.60; N 33.33.

**Тригидрат 7-метилсульфанил-4-оксо-3-циано-4H-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия (4b).** Выход 6.40 г (45%), бесцветные кристаллы, т. пл. 201–203°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 2.62 (3H, с,  $\text{SCH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 13.3; 117.0; 117.3; 149.0; 159.2; 165.4. Найдено, %: С 25.41; Н 3.33; N 29.55.  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_6\text{NaOS}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 25.36; Н 3.19; N 29.57.

**Тригидрат 4-оксо-3-циано-7-этилсульфанил-4H-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия (4c).** Выход 6.41 г (43%), бесцветные кристаллы, т. пл. 190–192°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.43 (3H, т,  $J = 7.3$ ,  $\text{CH}_3$ ); 3.20 (2H, к,  $J = 7.3$ ,  $\text{CH}_2$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 15.5; 25.4; 117.5; 117.8; 149.4; 159.7; 165.0. Найдено, %: С 28.17; Н 3.71; N 27.95.  $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_6\text{NaOS}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 28.19; Н 3.72; N 28.18.

**Тригидрат 4-оксо-7-пропилсульфанил-3-циано-4H-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия (4d).** Выход 5.93 г (38%), бесцветные кристаллы, т. пл. 204–206°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.06 (3H, т,  $J = 7.3$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1.74–1.85 (2H, м,  $\text{CH}_2$ ); 3.17 (2H, т,  $J = 7.3$ ,  $\text{CH}_2\text{S}$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 13.6; 23.0; 32.9; 117.5; 117.8; 149.4; 159.7; 165.2. Найдено, %: С 30.48; Н 4.23; N 26.83.  $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_6\text{NaOS}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 30.77; Н 4.20; N 26.91.

**Моногидрат 4-оксо-3-циано-4H-пиразоло[5,1-с]-[1,2,4]триазин-1-ида натрия (4e).** Выход 4.02 г (40%), светло-желтые кристаллы, т. пл. 278–279°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 6.68 (1H, с,  $\text{CH}$ ); 7.97 (1H, с,  $\text{CH}$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 96.5; 111.0; 118.7; 143.5; 150.8; 152.0. Найдено, %: С 35.63; Н 1.98; N 34.97.  $\text{C}_6\text{H}_2\text{N}_5\text{NaO}\cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 35.83; Н 2.00; N 34.82.

**Тригидрат 7-метилсульфанил-3-циано-8-этоксикарбонил-4H-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ида натрия (4f).** Выход 3.19 г (18%), желтые кристаллы, т. пл. 265–267°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.38 (3H, т,  $J = 8.0$ ,  $\text{CH}_3$ ); 2.55 (3H, с,  $\text{CH}_3$ ); 4.31 (2H, к,  $J = 8.0$ ,  $\text{CH}_2$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 12.8; 14.4; 59.4; 98.1; 116.4; 117.7; 148.2; 151.9; 156.7; 162.1. Найдено, %: С 33.96; Н 3.78; N 19.58.  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_5\text{O}_3\text{NaS}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 33.80; Н 3.97; N 19.71.

**Пентагидрат 7-метилсульфанил-3-циано-4H-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ид-8-карбоксилата динатрия (4g).** Выход 9.25 г (48%), желтые кристаллы, т. пл. 257–259°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м. д.: 2.61 (3H, с,  $\text{CH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м. д.: 12.8; 105.9; 113.6; 117.1; 150.9; 150.9; 158.6; 169.9. Найдено, %: С 24.79; Н 3.18; N 17.88.  $\text{C}_8\text{H}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 24.94; Н 3.40; N 18.18.

**Исследование противовирусной активности.** Значение ЛД<sub>50</sub> для каждого биопатогена определяют по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева.<sup>19</sup>

**Приготовление инфицирующих препаратов вирусов КЭ, ВЭЛ и ВсЭЛ.** Для приготовления инфицирующего препарата вируса КЭ (штамм Абсеттаров) используют культуру клеток СПЭВ, инфицированную в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> на клетку. Инфекционную активность определяют титрованием методом негативных колоний в культуре клеток СПЭВ и при подкожном инфицировании беспородных белых мышей массой 8–10 г. Инфицирующие вирусные препараты на основе ВЭЛ и ВсЭЛ готовят с использованием 12-суточных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). Вирус в концентрации  $5\cdot 10^7$  БОЕ/мл вводят в желточный мешок РКЭ, инкубируют при температуре  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Через 12–18 ч после инфицирования просматривают РКЭ под овоскопом на предмет неспецифической гибели. Через 36 ч после инфицирования отбирают погибшие РКЭ, извлекают плоды. Из гомогената плодов готовят 10% суспензию на растворе Хенкса – рабочую культуру вируса.

**Исследование эффективности соединения 4b в отношении вирусов КЭ, ВЭЛ и ВсЭЛ in vitro.** Двухсуточный монослой культуры клеток СПЭВ заражают вирусами в дозе 0.02 БОЕ/кл при температуре  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Время адсорбции составляет 60 мин. После адсорбции монослой клеток отмывают 3 объемами среды поддержания, в пробирки вносят свежую среду с различными концентрациями соединения 4b (1, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл). На каждую дозу исследуемого соединения используют 4 пробирки с монослоем клеток. Инкубацию проводят при  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  в течение 2 сут. По окончании инкубации проводят криодеструкцию клеток и определяют уровень накопления вируса по формированию негативных колоний в культуре клеток СПЭВ.

**Исследование противовирусной активности соединения 4b в отношении КЭ (штамм Абсеттаров) на животных моделях.** Изучение противовирусного действия соединения 4b на возбудителя КЭ проводят на белых беспородных мышках массой 8–10 г, полученных из питомника "Рапполово" (Ленинградская обл.). Накопление вирусодержащего материала для заражения лабораторных животных проводят на мышках сосунках. В качестве вирусодержащего материала используют 10% суспензию головного мозга мышечных сосунков. Исходный титр вируса –  $10^2$ – $10^3$  ЛД<sub>50</sub>/мл.

Моделирование смертельной инфекции КЭ проводят путем подкожного заражения белых беспородных мышечной массой 8–10 г вирусодержащим материалом (штамм Абсеттаров) в объеме 0.5 мл в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>. Численность животных в каждой группе – 10 особей. После заражения за инфицированными животными устанавливают ежедневное наблюдение в течение 14 сут с регистрацией количества живых и павших особей. Инкубационный период при моделируемой инфекции составляет 3–4 сут. Заболевание характеризуется следующими признаками: у мышечной развивается адинамия, они отказываются от еды и питья, шерсть становится взъерошенной. В последующем развивается параличи и наступает гибель животных. Максимальная гибель инфицированных мышечной отмечается, как правило, на 5–9 сут после инфицирования. Специфичность гибели мышечной подтверждают выделением вируса из

головного мозга павших животных и оценивают наличие по ЦПД в культуре клеток СПЭВ. Уровень накопления вируса в тканях головного мозга оценивают с использованием метода формирования негативных колоний в монослое культуры клеток СПЭВ под агаровым покрытием.

**Исследование противовирусной активности соединения 4b в отношении ВЭЛ на животных моделях.** Изучение противовирусного действия соединения **4b** на возбудителя ВЭЛ проводят на белых беспородных мышках массой 16–18 г, полученных из питомника "Рапполово" (Ленинградская обл.). Накопление вирусосодержащего материала для последующего заражения лабораторных животных осуществляют с использованием 9–11-дневных развивающихся куриных эмбрионов – 30–50 шт. Надосадочную жидкость разливают во флаконы объемом 1.0 мл и используют для дальнейшего заражения экспериментальных животных. Исходный титр вируса –  $10^7$ – $10^8$  ЛД<sub>50</sub>/мл.

Моделирование смертельной инфекции ВЭЛ проводят путем подкожного заражения белых беспородных мышей массой 16–18 г вирусом ВЭЛ (штамм Венесуэла 230) в объеме 0.3 мл/мышь в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>. Численность животных в каждой группе – 10 особей.

**Исследование противовирусной активности соединения 4b в отношении ВсЭЛ на животных моделях.** Изучение ингибирующего действия соединения **4b** на возбудителя ВсЭЛ проводят на белых беспородных мышках массой 16–18 г, полученных из питомника "Рапполово" (Ленинградская обл.). Накопление вирусосодержащего материала для последующего заражения лабораторных животных осуществляют с использованием 9–11-дневных РКЭ – 30–50 штук. Надосадочную жидкость разливают во флаконы объемом 1.0 мл и используют для дальнейшего заражения экспериментальных животных. Исходный титр вируса –  $10^5$ – $10^6$  ЛД<sub>50</sub>/мл.

Моделирование смертельной инфекции ВсЭЛ проводят путем подкожного заражения белых беспородных мышей массой 16–18 г вирусом ВсЭЛ (штамм 463) в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> в объеме 0.3 мл/мышь. Численность животных в каждой группе – 10 особей.

**Рентгеноструктурное исследование соединения 4b** проведено по стандартной процедуре на дифрактометре Xcalibur 3, оборудованном CCD-детектором (CuK $\alpha$ -излучение,  $\lambda$  1.54184 Å), графитовый монохроматор, 295(2)К,  $\omega$ -сканирование с шагом 1.0°, время измерения – 50 с). Кристаллы для РСА получены медленным упариванием раствора соединения **4b** в MeCN. Структура расшифрована прямым методом и уточнена в полноматричном анизотропном приближении МНК для всех неводородных атомов (в изотропном приближении – для атомов водорода) с использованием программы SHELXL-97.<sup>24</sup>

Файл сопроводительной информации, содержащий кристаллографические данные соединения **4b**, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 19-29-08015МК).

## Список литературы

- Ruzek, D.; Avšič-Županc, T.; Borde, J.; Chrdle, A.; Eyer, L.; Karganova, G.; Kholodilov, I.; Knap, N.; Kozlovskaya, L.; Matveev, A.; Miller, A. D.; Osolodkin, D. L.; Överby, A. K.; Tikunova, N.; Tkachev, S.; Zajkowska, J. *Antivir. Res.* **2019**, *164*, 23.
- Носков, А. К.; Никитин, А. Я.; Андаев, Е. И.; Пакскина, Н. Д.; Яцменко, Е. В.; Веригина, Е. В.; Иннокентьева, Т. И.; Балахонов, С. В. *Проблемы особо опасных инфекций* **2017**, (1), 37.
- Guzmán-Terán, C.; Calderón-Rangel, A.; Rodríguez-Morales, A.; Mattar, S. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2020**, *19*, 19.
- Петров, А. А.; Лебедев, В. Н.; Ручко, В. М.; Карулина, Н. В.; Борисевич, С. В. *Проблемы особо опасных инфекций* **2014**, (2), 80.
- D'Onofrio, L. E. *J. Nurse Pract.* **2020**, *16*, 744.
- Чупахин, О. Н.; Русинов, В. Л.; Уломский, Е. Н.; Чарушин, В. Н.; Петров, А. Ю.; Киселев, О. И. Патент RU 2294936; *Chem. Abstr.* **2007**, *146*, 316949.
- Логонова, С. Я.; Борисевич, С. В.; Русинов, В. Л.; Уломский, Е. Н.; Чарушин, В. Н.; Чупахин, О. Н.; Сорокин, П. В. *Антибиотики и химиотерапия* **2015**, *60*(5–6), 8.
- Логонова, С. Я.; Борисевич, С. В.; Русинов, В. Л.; Уломский, Е. Н.; Чарушин, В. Н.; Чупахин, О. Н.; Сорокин, П. В. *Антибиотики и химиотерапия* **2015**, *60*(7–8), 11.
- Тихонова, Е. П.; Кузьмина, Т. Ю.; Анисимова, А. А.; Калинина, Ю. С. *Экспериментальная и клиническая фармакология* **2018**, *81*(9), 21.
- Rusinov, V. L.; Ulomskii, E. N.; Zubairov, M. M.; Kapustin, A. V.; Mitin, N. I.; Zhiravetskii, M. I.; Vinograd, I. A. *Pharm. Chem. J.* **1990**, *24*, 646. [*Хим.-фарм. журн.* **1990**, *24*(9), 41.]
- Rusinov, V. L.; Sapozhnikova, I. M.; Bliznik, A. M.; Chupakhin, O. N.; Charushin, V. N.; Spasov, A. A.; Vassiliev, P. M.; Kuznetsova, V. A.; Rashchenko, A. I.; Babkov, D. A. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2017**, *350*, 1600361.
- Rusinov, V. L.; Charushin, V. N.; Chupakhin, O. N. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2018**, *67*, 573. [*Изв. АН, Сер. хим.* **2018**, 573.]
- Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7902.
- Gray, E. J.; Stevens, M. F. G.; Tennant, G.; Vevers, R. J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 1496.
- Русинов, В. Л.; Чупахин, О. Н.; Чарушин, В. Н.; Сапожникова, И. М.; Медведева, Н. Р.; Уломский, Е. Н.; Киселев, О. И.; Деева, Э. Г.; Коновалова, Н. И.; Васин, А. В. Патент RU 2607628; *Chem. Abstr.* **2017**, *166*, 145038.
- Герасимов, С. Г. Автореф. дис. канд. мед. наук; Москва, 2012.
- Ma, H.; Kim, A. S.; Kafai, N. M.; Earnest, J. T.; Shan, A. P.; Case, J. B.; Basore, K.; Gilland, Th. C.; Sun, Ch.; Nelson, Ch. A.; Thackray, L. B.; Klimstra, W. B.; Fremont, D. H.; Diamond, M. S. *Nature* **2020**, *588*, 308.
- Руководство по зоонозам*; Покровский, В. И., Ред.; Медицина: Ленинград, 1983, с. 78.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*; Миронова, А. Н., Ред.; Гриф и К: Москва, 2013, ч. I, с. 51.
- Boechat, N.; Pinheiro, L. C. S.; Santos-Filho, O. A.; Silva, I. S. *Molecules* **2011**, *16*, 8083.
- Tolstyakov, V. V.; Pevzner, M. S.; Tselinskii, I. V. *Russ. J. Gen. Chem.* **2000**, *70*, 1458. [*Журн. общ. химии* **2000**, *70*, 1553.]
- Schmidt, P.; Druey, J. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 986.
- Gokulan, P. D.; Jayakar, B.; Alagarsamy, V.; Raja Solomon, V. *Arzneim. Forsch.* **2012**, *62*, 457.
- Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *A64*, 112.