

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Уральский федеральный
университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи



МЕДВЕДЕВА Наталья Розиевна

**ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
ВОЗМОЖНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ *in vivo*
ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА «ТРИАЗАВИРИН»**

02.00.03 – Органическая химия

Диссертация на соискание
ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Уломский Евгений Нарциссович

Екатеринбург – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПИРАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ	8
1.1. Антибактериальная и противогрибковая активности	8
1.2. Лечение заболеваний ЦНС	17
1.3. Противораковая и антиоксидантная активности	22
1.4. Противовирусная активность	28
1.5. Лечение заболеваний дыхательных путей	29
1.6. Пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины с прочей активностью	32
2. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ИМИДАЗО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ	38
3. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ 1,2,4-ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ	43
3.1. Антибактериальная и противогрибковая активности	43
3.2. Противовирусная активность	45
4. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ 1,2,3-ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ	51
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	52
1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ «ТРИАЗАВИРИНА»	52
1.1.1. Модификации по второму положению молекулы «Триазавирина»	52
1.1.2. Биологическая активность гомологов «Триазавирина» <i>in vitro</i> . Сравнение противовирусной активности «Триазавирина» и его гомологов	54
1.2.1. Модификации по шестому положению молекулы «Триазавирина»	58
1.2.2. Данные биологической <i>in vitro</i> активности 6-фтор-триазолотриазинов, сравнение с «Триазавирином»	59
1.3. Сравнение <i>in vivo</i> противовирусной активности «Триазавирина» и его аналогов	61
2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПРЕПАРАТА «ТРИАЗАВИРИН»	62
2.1. Окисление алкилсульфанильной группы «триазавирина» и его гомологов (направление В)	62
2.1.1. Химическое моделирование окисления под действием оксидаз	62
2.1.2. Биологическая активность продуктов S-окисления «Триазавирина»	65
2.2. Компьютерное моделирование взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и нейраминидазой вируса гриппа А/California/04/2009(H1N1)	66
2.3. Нуклеофильное замещение в 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах (направление Д)	71
2.3.1. Постановка модельной реакции замещения метилсульфанильной группы S-нуклеофилами	71
2.3.2. Данные биологической активности продуктов замещения метилсульфонильной группы S-нуклеофилами	73
2.4. Получение алкилированных аналогов «Триазавирина» (Направление Е)	73
2.5. Нуклеофильное замещение нитрогруппы в алкилированных аналогах «Триазавирина» (Направление С)	77
2.5.1. Взаимодействие с N-нуклеофилами	77
2.5.2. Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нуклеофилами	83
2.5.3. Взаимодействие с S-нуклеофилами	87
2.5.4. Удаление защитных групп	91
2.5.5. Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нуклеофилами	93
2.6. Восстановление нитрогруппы как причина противовирусного действия «Триазавирина» (направление А)	95
ВЫВОДЫ	107

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	108
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	147
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 - Длины связей и валентные углы для соединения (35d)	157
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 - Длины связей и валентные углы для соединения (51)	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Актуальность создания новых противовирусных средств обусловлена совместным действием таких постоянно действующих факторов, как распространение социально значимых, особо опасных инфекций, а также появление патогенных вирусных штаммов, устойчивых к действию существующих лекарственных средств. Совместными усилиями Уральского федерального университета, Института органического синтеза УрО РАН и Института гриппа МЗ РФ создан новый противовирусный препарат «Триазавирин» (натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она, дигидрат) [1], проявляющий высокую активность, широкий спектр действия и низкую токсичность. «Триазавирин» и его аналоги обладают высокой эффективностью в опытах *in vivo* [2] и пониженной активностью в экспериментах на клеточных культурах, что позволяет предположить противовирусное действие не самого «Триазавирин», а продуктов его превращений в организме. Одним из способов выявления таких превращений является прогнозирование возможных продуктов модификаций соединений, химический синтез моделей, исследование противовирусного действия и выявление их в биологических объектах.

Цели и задачи исследования:

- Определение влияния молекулярных фрагментов 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – «Триазавирин» и его структурных аналогов – на противовирусное действие.
- Химическое моделирование возможных процессов превращений «Триазавирин» в организме и прогнозирование продуктов реакций (метаболитов).
- Разработка методов синтеза новых 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – возможных активных метаболитов и их структурных аналогов.
- Поиск новых противовирусных соединений в ряду исследуемых 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов.

Научная новизна работы

- Разработаны методы синтеза новых 2-*R*-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов.
- Разработан альтернативный метод синтеза «Триазавирин» и его гомологов, заключающийся в диазотировании имиотиоуразола, последующем азосочетании – цикли-

Автор выражает благодарность академику О.Н. Чупахину, академику О.И. Киселеву и чл.-корр. РАН В.Л. Русинову за постоянное внимание и ценные советы, а также сотрудникам кафедры органической химии УрФУ, ИОС УрОРАН и ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, принявшим участие в работе

зации с получением динатриевой соли 2-меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она и дальнейшем ее алкилировании галоидными алкилами, приводящем к целевым натриевым солям 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов.

- Сформулирована концепция возможных превращений «Триазавирина» в организме и предложен план структурных модификаций молекулы препарата, включающий 6 основных направлений: реакции центров С-2, С-6 и С-7 с нуклеофильными фрагментами белков, алкилирование атома N-4, моделирующее процессы гликозилирования, восстановление нитрогруппы и окисление алкилсульфанильной группы.

- В соответствии с планом структурных модификаций «Триазавирина» исследована реакция окисления в качестве модели действия оксидаз и разработаны методы синтеза 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов, содержащих в триазольном цикле сульфоксидный и сульфонильный фрагменты.

- Исследованы реакции замещения сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-оне биогенными S-нуклеофилами: цистеамином, *L*-цистеином, глутатионом.

- Разработаны методы N-алкилирования 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов в качестве моделей процессов N-гликозилирования и для использования в виде защитных групп.

- Разработаны методы замещения нитрогруппы в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онах S- и N-нуклеофилами с образованием 2-R-6-амино- и 6-алкилсульфанил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов.

- Установлено ингибирующее действие «Триазавирина» на протеин дисульфидизомеразу.

- Впервые выявлено влияние молекулярных фрагментов «Триазавирина» и его структурных аналогов на их противовирусное действие.

Практическая значимость

Установлены молекулярные фрагменты «Триазавирина», необходимые для противовирусной активности препарата, к которым относятся нитрогруппа триазинового фрагмента и алкилсульфанильный фрагмент в триазольном цикле.

Выявлены соединения – структурные аналоги «Триазавирина», проявляющие высокую противовирусную активность, в отношении которых получено 4 патента РФ на изобретение.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и получены 4 патента РФ на изобретение. Результаты работы с опубликованием

тезисов доложены на конференциях всероссийского и международного уровней: XI Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2008); XII Молодежной школе-конференции по органической химии (Иваново, 2009); 16th European Symposium on Organic Chemistry (Prague, Czech Republic, 2009); XIII Молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2010); 18th International Conference on Organic Synthesis (Bergen, Norway, 2010); XIV Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2011); XV Молодежной школе-конференции по органической химии (Уфа, 2012); Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология» (Екатеринбург, 2012); IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии (Уфа, 2013), 18th European Symposium on Organic Chemistry (Marseille, France, 2013); Уральском научном форуме по органической химии (Екатеринбург, 2014).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и приложения. Работа содержит 107 ссылок на литературные источники, 27 таблиц и 19 рисунков.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЗОЛО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНОВ

Литературный обзор посвящен различным аспектам биологического действия азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, где рассмотрена активность соединений в отношении различных заболеваний и объекты молекулярно-биологического действия. Рассмотрение биологически активных соединений – структурных аналогов, отличающихся изменениями в гетероциклической системе и функциональными группами, позволяет оценить влияние азольного фрагмента и заместителей на активность. Подобный подход не только позволяет исследователям-химикам целенаправленно вводить те или иные функциональные группы для повышения активности синтезируемых соединений, но и определить активные центры-мишени и оценить механизм действия похожих по структуре соединений.

Спектр действия соединений, рассмотренных в настоящем обзоре весьма разнообразен: это противовирусная, противомикробная, противораковая, неврологическая, противовоспалительная и другие активности. Направленное действие на определенные рецепторы либо ферменты, гиперактивность которых играет ключевую роль в ряде заболеваний, позволяет некоторым азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазином проявлять активность в отношении широкого спектра расстройств, казалось бы, имеющих различную природу.

Наличие в обзоре большого количества ссылок на патенты свидетельствует о большом потенциале использования азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов в качестве медицинских препаратов. Публикации по синтезу новых соединений в ряду азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов и изучению их биологической активности говорят об актуальности исследований по данной теме.

Таким образом, основной целью обзора является описание биологически активных азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов с указанием спектра их действия и эффективности, анализ влияния заместителей и природы азольного кольца на фармакологические свойства рассматриваемых соединений. Описание соединений приводится в соответствии с их строением по следующим разделам: пиразоло-, имидазо-, 1,2,4-триазоло- и 1,2,3-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины.

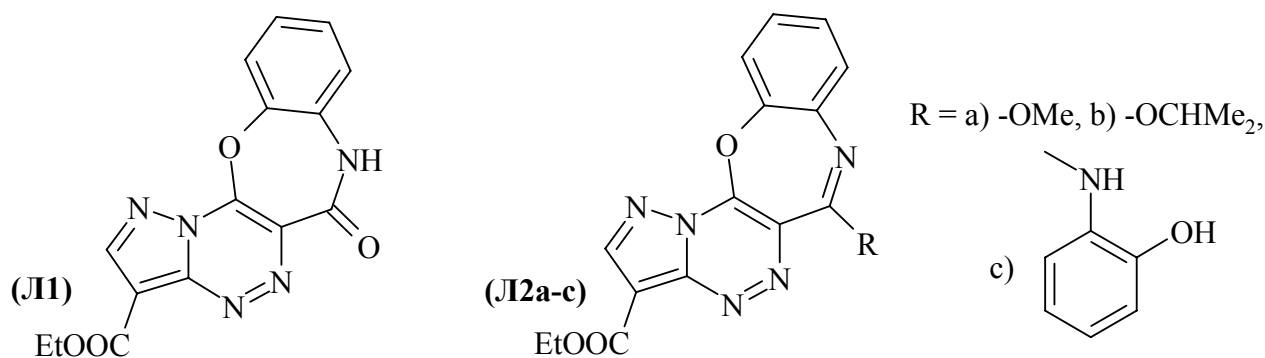
1. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПИРАЗОЛО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНЫ

Данный раздел включает ряд соединений, содержащих в составе молекулы пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазиную структуру и обладающих широким спектром биологической активности.

1.1. Антибактериальная и противогрибковая активности

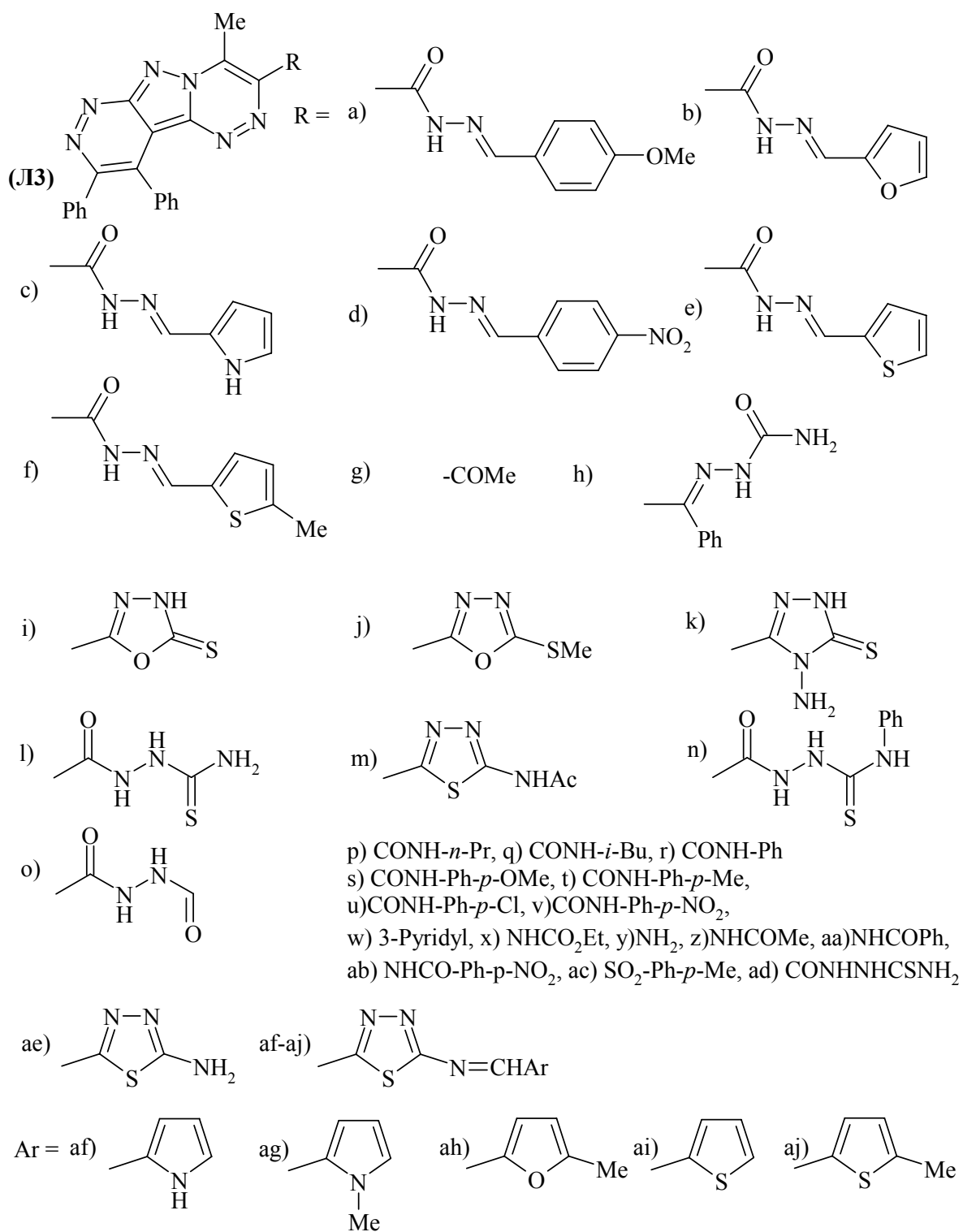
Противомикробной активностью в ряду пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов обладают, как правило, полициклические структуры, содержащие дополнительные бензоксазепиновые, пиридазиновые и пиридиновые кольца.

Так, пиразоло[1,2,4]триазино[5,6-*b*][1,5]бензоксазепин (**Л1**) обладает слабо выраженной антибактериальной активностью в отношении *Xanthomonas oryzae* (100 % подавление роста при концентрации 100 м.д.) [3].



Слабую противогрибковую активность демонстрируют соединения (**Л2а-с**), подавляя рост грибов *Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum* на 26-57 % при концентрации 100 м.д. [3].

Другими представителями полициклических соединений на основе пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина и обладающих антибактериальной и противогрибковой активностями являются соединения (**Л3**). В экспериментах *in vitro* противомикробную активность соединений (**Л3**) определяли по ингибированию грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерий, дрожжей (*Candida albicans*) и грибов (*Aspergillus niger*).



Существенное ингибирование роста всех тестируемых микроорганизмов достигалась растворимыми в воде чистыми соединениями при высокой концентрации 10000 м.д. Численные данные, отражающие активность соединений (J13), сведены в таблицу 1:

Таблица 1

№ соед.	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerugin.</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Л3а	н.о.	3	-	-	-	н.о.
Л3б	н.о.	-	2	-	-	н.о.
Л3с	н.о.	-	2	-	-	н.о.
Л3д	н.о.	-	5	-	-	н.о.
Л3е	н.о.	2	2	-	-	н.о.
Л3ф	н.о.	-	-	-	2	н.о.
Л3г	н.о.	4	-	-	3	н.о.
Л3h	н.о.	4	3	2	-	н.о.
Л3i	н.о.	4	н.о.	8	н.о.	н.о.
Л3j	н.о.	-	н.о.	6	н.о.	н.о.
Л3k	н.о.	6	н.о.	15	н.о.	н.о.
Л3l	н.о.	7	н.о.	-	н.о.	н.о.
Л3m	н.о.	6	н.о.	7	н.о.	н.о.
Л3n	н.о.	-	н.о.	5	н.о.	н.о.
Л3o	н.о.	-	н.о.	4	н.о.	н.о.
Л3p	15-20	20-25	15-20	15-20	15-20	-
Л3q	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	-
Л3r	15-20	20-25	15-20	15-20	15-20	15-20
Л3s	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25
Л3t	15-20	15-20	15-20	15-20	15-20	15-20
Л3u	15-20	15-20	15-20	15-20	15-20	10-15
Л3v	15-20	15-20	15-20	15-20	15-20	-
Л3w	20-25	20-25	20-25	20-25	15-20	15-20
Л3x	15-20	15-20	15-20	15-20	10-15	-
Л3y	10-15	10-15	10-15	10-15	-	-
Л3z	10-15	15-20	-	-	-	-
Л3aa	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3ab	20-25	20-25	-	-	-	-
Л3ac	15-20	20-25	-	-	-	-
Л3ad	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3ae	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3af	15-20	10-15	15-20	15-20	15-20	15-20
Л3ag	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3ah	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3ai	10-15	10-15	-	-	-	-
Л3aj	10-15	10-15	-	-	-	-

«-» = нет ингибирования; «н.о.»-активность не определяли

Из таблицы 1 видно, что производное (Л3г) обладает активностью в отношении *Candida albicans* и ингибирует рост *Staphylococcus aureus*. Соединения (Л3а-ф, h) проявляют активность против *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Кроме того, пиразолотриазин (Л3h) ингибирует рост *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Скрининг соединений (Л3i-o) на противомикробную активность в отношении грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa*) бактерий проводился

в концентрациях 500, 1000, 5000, 10000 м.д., наибольшая активность, как и предполагалось, достигается при 10000 м.д. Именно эти данные и приведены в таблице 1.

Наибольшую активность как против грамположительных, так и в отношении грамотрицательных бактерий среди соединений (**Л3i-o**), рассмотренных в статье [5], демонстрирует соединение (**Л3k**) с амино-1,2,4-триазол-тионом в качестве заместителя R в триазиновом кольце.

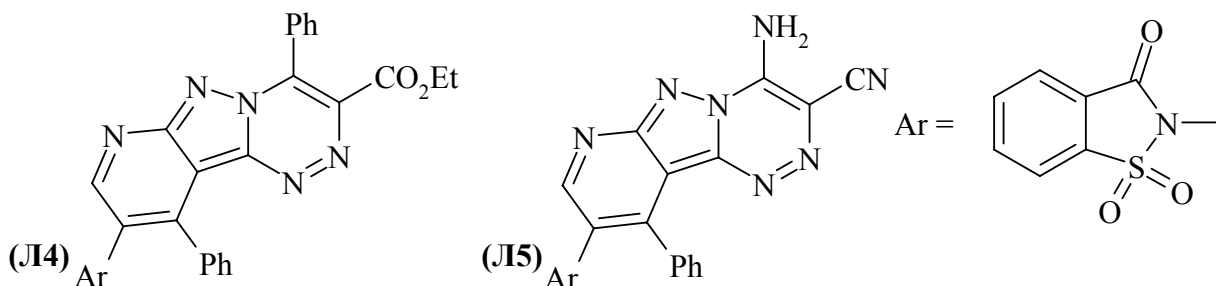
Теми же авторами, что и в двух предыдущих работах [4,5], была синтезирована еще одна обширная библиотека соединений (**Л3p-aj**) на основе 4-метил-9,10-дифенилпиридазино[3',4':3,4]-пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина с заместителями в 3 положении молекулы.

Противомикробная активность была также оценена для соединений (**Л3p-aj**) *in vitro*, а результаты противомикробного сканирования приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы, соединения (**Л3p-w**) ингибируют рост всех протестированных микроорганизмов. N-замещенные производные (**Л3ab,ac**) проявили активность против грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Практически все триадиазольные производные (**Л3ae-aj**) проявляют слабую противомикробную активность [6].

Так как соединения (**Л3**) различаются лишь заместителями R в третьем положении молекулы, то можно сделать общий вывод, что наибольшую активность проявляют соединения с алкил- и ариламидными функциональными группами как в отношении бактерий, так и в отношении грибов и дрожжей.

Другими трициклическими соединениями, обладающими противомикробной активностью, являются пиридо-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины, содержащие в своем составе фрагмент сахарина (**Л4,Л5**). Их активность была исследована *in vitro* в отношении бактерий (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) и грибов (*Candida albicans*, *Penicillium italicum*).



В качестве препаратов сравнения использовались антибактериальное средство «Ампициллин» и противогрибковый антибиотик «Нистатин». Данные по противомикробной активности приведены в таблице 2.

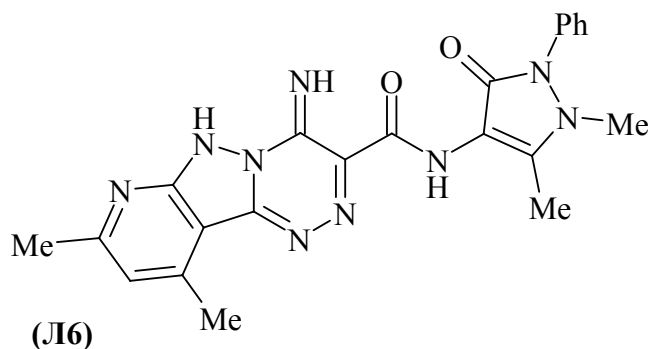
Таблица 2

№ соединения	Антибактериальная активность				Противогрибковая активность	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium italicum</i>
Л4	++	++	+++	++	+	++
Л5	++	+++	++	++	++	+
Ампициллин	+++	+++	++	+++	-	-
Нистатин	-	-	-	-	+++	++

Зона ингибирования (в мм): -, неактивно; +>5 мм, слабая активность; ++>7 мм, средняя активность; +++>9 мм, высокая активность.

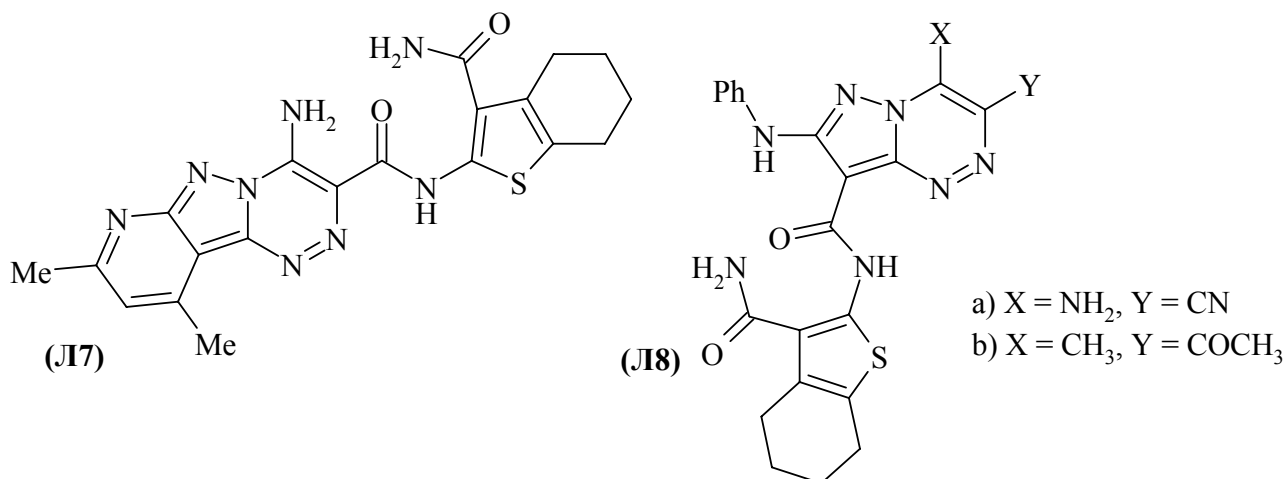
Согласно данным из таблицы 2 можно сделать вывод, что активность соединений (**Л4**) и (**Л5**) сравнима с действием применяемых в медикаментозной практике препаратов, а в отношении, например, *Escherichia coli* соединение (**Л4**) превосходит по своей активности антибактериальный препарат «Ампициллин» [7].

Умеренную активность *in vitro* в отношении грамположительных (*B. Thuringiensis*) и грамотрицательных бактерий (*K. pneumoniae*) проявляет еще один представитель пиридопирозоло[5,1-с][1,2,4]триазинов - соединение (**Л6**).



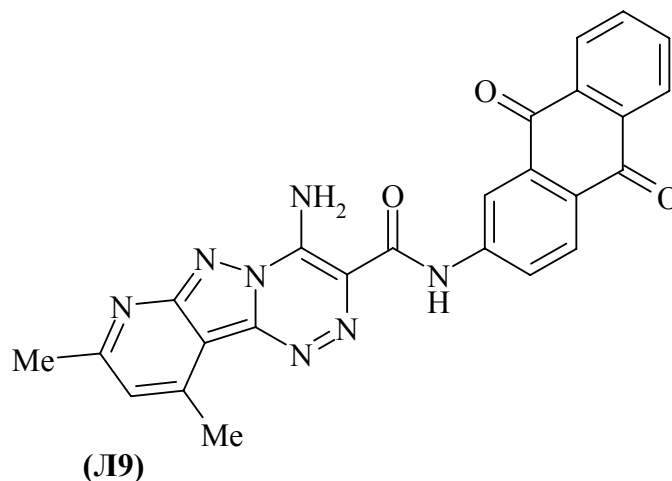
Как показали биологические испытания, зона ингибирования составляет 13 и 14 мм для *B. Thuringiensis* и *K. pneumoniae* соответственно (для сравнения, у «Ампицилина» - 18 и 19 мм, у «Хлорамфеникола» - 23, 20 мм в отношении этих же бактерий); а также противогрибковую активность, зона ингибирования для *B. fabae* - 13 мм и для *F. oxysporum* - 14 мм (для сравнения, активность «Флуконазола» - 22 и 16 мм) [8].

Трициклические и бициклические пиридопирозоло[5,1-с][1,2,4]триазины (**7**) и (**Л8a,b**) на основе 4,5,6,7-тетрагидробензотиофениламида обладают одинаково умеренной антибактериальной активностью в отношении грамположительных (*Bacillus thuringiensis*) и грамотрицательных бактерий (*K. pneumoniae*), зона ингибирования составляет 16 и 18 мм соответственно для каждого штамма.



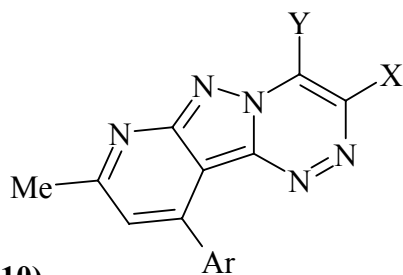
Соединение (**J18b**) не проявляет активность в отношении *Bacillus thuringiensis*, но ингибирует *K. Pneumoniae* (зона ингибирования 12 мм). Кроме того, соединения (**J18**) проявляют высокую противогрибковую активность в отношении *F. oxysporum* (зона ингибирования 16 и 18 мм соответственно) и неактивны в отношении *B. fabae*, в то время как производное (**J17**) одинаково умеренно активно в отношении как в отношении *F. oxysporum*, так и против *B. fabae* (зона ингибирования 13 мм для обоих штаммов) [9].

Другим трициклическим противомикробным соединением является соединение (**J19**) – производное пиридо-пирозоло[5,1-с][1,2,4]триазина и антрахинона.



Согласно биологическим испытаниям данное соединение (**J19**) проявляет высокую, подобную «Ампициллину», активность против грамотрицательных бактерий штамма *P. aeruginosa* (зона ингибирования 21 мм) и умеренно подавляет рост грамположительных бактерий *S. Epidermidis* (зона ингибирования 14 мм). Кроме того, производное (**J19**) обладает высокой противогрибковой активностью в отношении штаммов *Alternaria solani* и *Fusarium solani*, значения зон ингибирования, как и для «Ампициллина», составляют 19 и 17 мм соответственно для каждого штамма грибов. Авторы объясняют высокую противомикробную активность введением антрахинонового фрагмента в молекулу [10].

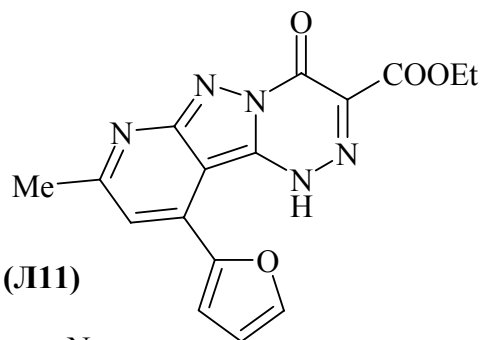
Наконец, еще одними производными пиридо-пирозоло[5,1-с][1,2,4]триазины с противомикробной активностью являются соединения (Л10а-л) и (Л11).



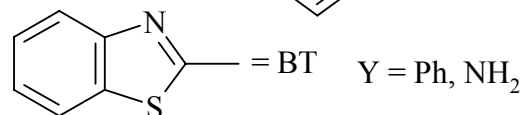
(Л10)

Ar = C₆H₄-*p*-Cl, C₄H₃-O-*α*

X = Br, CN, COOEt, CSNH₂, CONH₂,



(Л11)



Противомикробная активность была оценена в отношении грамположительных (*Bacillus Subtilis*), грамотрицательных (*Staphylococcus Aureas*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*) бактерий, грибов (*Aspergillus Niger*) и дрожжей (*Cundida Albicans*). Данные по активности (Л10а-л) и (Л11) соединений представлены в таблице 3:

Таблица 3

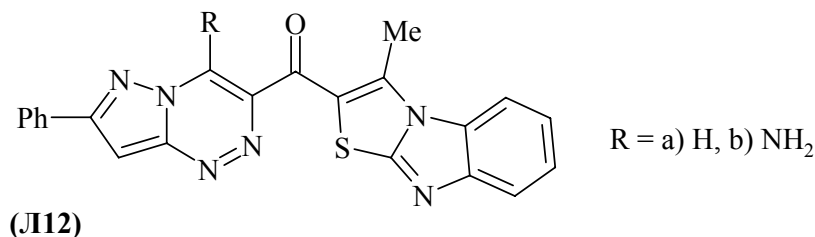
№ соед.	Ar	X	Y	Противомикробная активность					
				<i>A.n.</i>	<i>C.a.</i>	<i>B.s.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.a.</i>
Л10а	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	Br	Ph	-	-	-	+++	+++	-
Л10б	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	CN	NH ₂	+	+	-	+	-	++
Л10с	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	COOEt	NH ₂	+	-	-	+	-	-
Л10д	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	CSNH ₂	NH ₂	+	+	+	+++	+++	-
Л10е	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	CONH ₂	NH ₂	++	-	-	-	-	+
Л10ф	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -Cl	BT	NH ₂	-	-	-	+++	+++	-
Л10г	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	Br	Ph	-	+	+	+++	+++	+
Л10h	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	CN	NH ₂	+	-	-	+	+	-
Л10и	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	COOEt	NH ₂	+	++	++	-	-	-
Л10j	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	CSNH ₂	NH ₂	-	-	-	+++	+++	+
Л10к	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	CONH ₂	NH ₂	++	-	-	-	-	-
Л10л	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	BT	NH ₂	-	-	-	+++	+++	+
Л11	C ₄ H ₃ -O- <i>α</i>	COOEt	-	+	-	-	-	-	-

«+++» - значительно активны, «++» - умеренно активны, «+» - слабо активны, «-» - не активны.

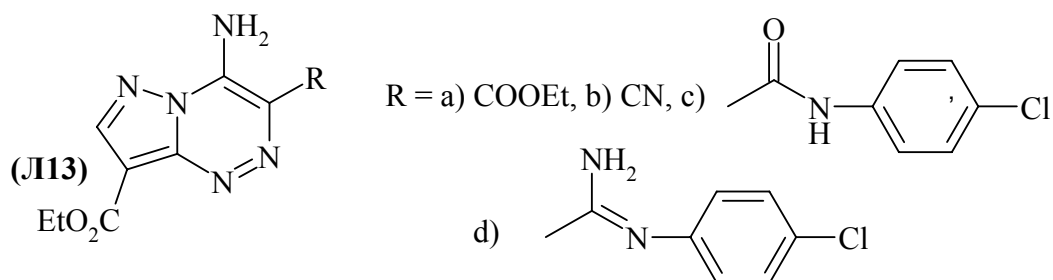
Как видно из таблицы 3, пирозолотриазины (Л10а,д,ф,г,ж,л) демонстрируют высокую активность против *Staphylococcus Aureas* и *Escherichia Coli* [11].

Пирозоло[5,1-с][1,2,4]триазины (Л12,Л13), не содержащие в составе молекулы дополнительного конденсированного пиридинового или пиперазинового кольца, проявляют слабую противомикробную активность.

При концентрации 5 мг/мл соединение (**Л12а**) ингибирует рост *Aspergillus fumigatus*, *Syncephalastrum racemosum* и *Pseudomonas aeruginosa* с зоной ингибирования 0,1-0,5 см. [12].



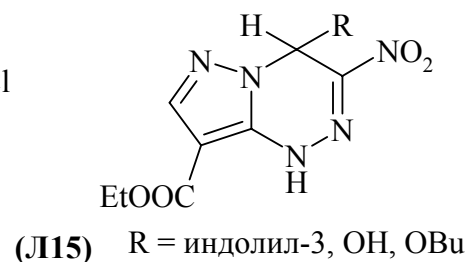
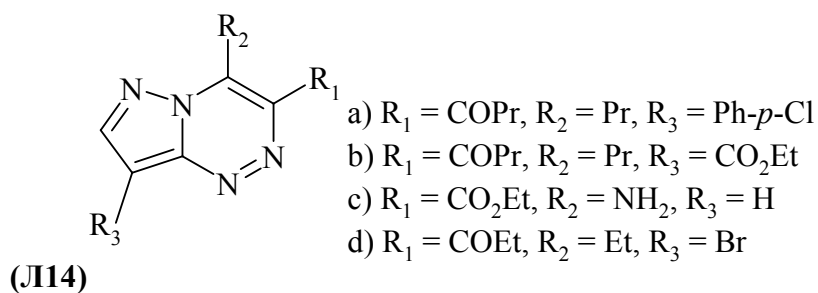
Пиразолотриазин (**Л12b**) проявляет слабую противогрибковую активность в отношении *Syncephalastrum racemosum*, *Candida albicans* (зона ингибирования 0.1-0.5 см) и слабую антибактериальную активность против *Pseudomonas aeruginosa* (зона ингибирования 0.1-0.5 см) [13]. В качестве препаратов для соединений (**Л12а,б**) сравнения использовались фунгицид «Тербинафин» (зона ингибирования *Candida albicans* 0.6-1.0 см, *Syncephalastrum racemosum* и *Aspergillus fumigatus* 1.1-1.5 см) и бактерицид «Хлорамфеникол» (зона ингибирования *Pseudomonas aeruginosa* 1.1-1.5 см), биологическая активность которых значительно превышает действие исследуемых пиразоло-триазинов.



По результатам испытаний, соединения (**Л13а-д**) оказались малоактивны против грибов *Pythium debaryanum*, *Rhizoetonia solani* и *Pyricularia oryzae* при концентрации 100 м.д. (ингибирование роста 28-80%) [14].

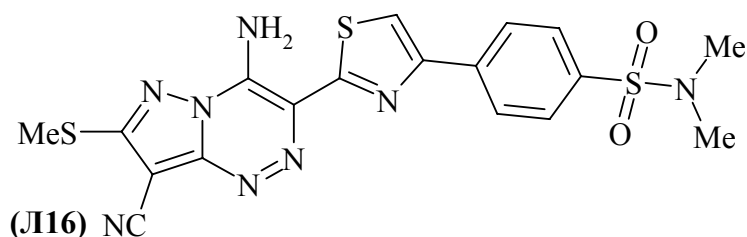
Наличие дополнительного аннелированного гетероциклического фрагмента является необязательным условием для обеспечения пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины эффективной защиты от микробов. Так, соединения (**Л14-Л16**), имеющие довольно простую структуру, тем не менее, обладают значительной противомикробной активностью.

Так, согласно данным испытаний, пиразолотриазины (**Л14а,с**) обладают активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с минимальной ингибирующей концентрацией равной 0.4 и 0.16 $\mu\text{моль/мл}$ соответственно. Соединение (**Л14б**) активно против *Candida albicans* (МИК 0.4 $\mu\text{моль/мл}$), а пиразолотриазин (**Л14д**) ингибирует рост *Trichophyton mentagrophytes* (МИК 0.16 $\mu\text{моль/мл}$) [15].



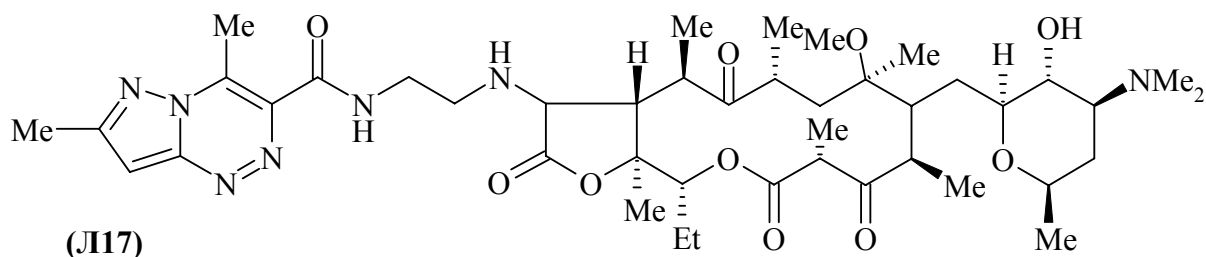
Исследованные соединения (Л15) демонстрируют высокую активность против грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов (*Bacillus cereus*, *Corynebacterium divercatum*) и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* в концентрациях до 50 мкг/мл. Введение индольного радикала в молекулу пиразолопиридина придает соединению антистафилококковую активность [16].

Результаты скрининга противомикробной активности показывают, что соединение (Л16) является весьма активным против грамположительных (*B. subtilis*, *S. aureus*, *S. maxima*), грамотрицательных (*K. pneumonia*, *Salmonella*, *P. aeruginosa*) бактерий, проявляет противогрибковое действие в отношении одноклеточных грибов (*C. albicans*) и мицелиальных грибов (*Rhizopus*, *A. fumigatus*).



Зона ингибирования для соединения (Л16) находится в пределах 20-22 мм, что сопоставимо с противомикробным действием известного антибиотика «Ампициллин» против тех же микроорганизмов (зона ингибирования 24-27 мм) [17].

Одним из приемов создания новых биологически активных субстанций является модификация уже известных биологически-активных природных соединений. Так, для лечения бактериальных инфекций был синтезирован пиразолотриазин на основе известного антибиотика «Эритромицина-А».



Биологическая активность полученного соединения (Л17) превосходит действие используемого в медицинской практике антибиотика: значение МИК в отношении эрит-

ромицин-восприимчивых *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* меньше либо равна 1 мкг/мл [18].

Таким образом, подводя итог подразделу 1.1., можно заключить, что среди пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов наибольшей активностью обладают производные с дополнительными аннелированными пиридазиновыми или пиридиновыми кольцами, а также пиразоло-триазины на основе уже известных природных антибиотиков.

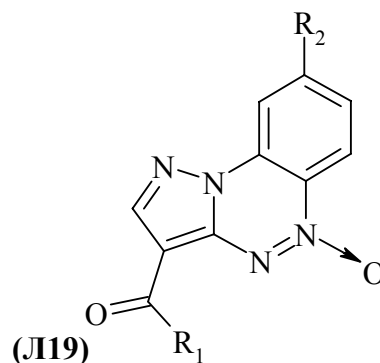
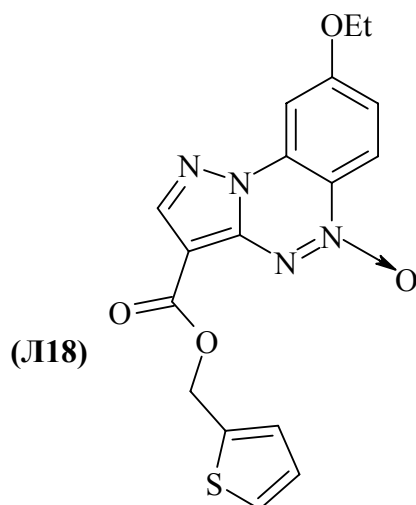
1.2. Лечение заболеваний ЦНС

Другой обширной группой пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов являются соединения, обладающие активностью в отношении заболеваний центральной нервной системы. Шире всех освещены лиганды бензодиазепиновых рецепторов ГАМК. Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является главным ингибирующим нейромедиатором в головном мозге млекопитающих, целевым ионофором рецепторов ГАМК_A и ГАМК_C и метаботропных рецепторов ГАМК_B. Рецепторы семества ГАМК_A наиболее широко изучены, так как являются местом действия ряда клинически важных препаратов, в том числе бензодиазепинов (BZ), барбитуратов и анестетиков. Бензодиазепиновые рецепторы локализованы на постсинаптических мембранах ГАМКергических систем ЦНС. В настоящее время генетический подход и развитие лигандов, наделенных избирательной эффективностью сделали возможным получение данных, что определенный подтип рецептора может быть ответственным за опосредование конкретных фармакологических эффектов производных бензодиазепинов и других соединений (не бензодиазепинов), обладающих бензодиазепиновой активностью. Так, показана важная роль $\alpha 1$ -подтипа рецепторов ГАМК в опосредовании седативного эффекта и части противосудорожной активности и амнезического действия; $\alpha 2$ -и/или $\alpha 3$ - подтипов рецепторов ГАМК – в анксиолитикоподобном действии бензодиазепинов; $\alpha 5$ -подтип рецепторов ГАМК_A является важным для когнитивного эффекта и/или в нейроповеденческом действии алкоголя [19].

Как правило, лигандами бензодиазепиновых рецепторов в рассматриваемом ряду соединений являются пиразоло[5,1-с][1,2,4]-бензотриазин-5(или 4)-оксиды, имеющие заместители в 3 и 8 положении молекулы.

Так, например, соединение (**Л18**) обладает действием обратного агониста и не вызывает у мышей спонтанную двигательную активность (т.е. не обладает седативным действием), не защищает от судорог, индуцированных пентилентатеразолом, и не усиливает действие этанола. С другой стороны, пиразоло-бензотриазин (**Л18**) противодействует седативному действию диазепама и диазепам-индуцированной конвульсии, что указывает на антагонистический эффект на $\alpha 1$ подтип рецептора (к которому имеет очень высокую аф-

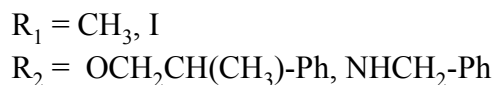
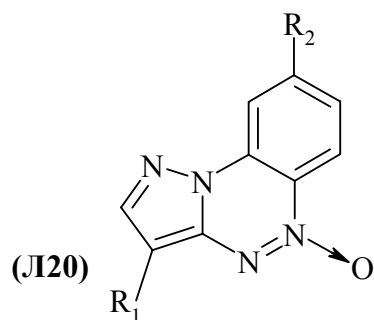
финность 0.85 нМ). Анксиогенный эффект может быть связан с действием соединения (Л18) в качестве обратного агониста подтипа $\alpha 2$ рецептора, к которому также имеет высокую аффинность ($K_i = 10$ нМ) [20].



- a) $R_1 = 2$ -тиенил, $R_2 = OPh$
 b) $R_1 = 2$ -пирролил, $R_2 = Cl$

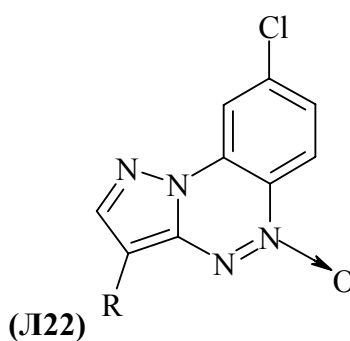
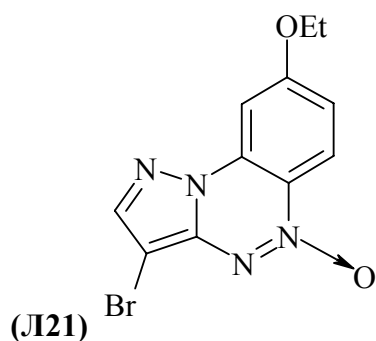
Соединения (Л19a,b) показывают селективную анксиолитическую активность при дозе 10 мг/кг и, в отличие от «Диазепам», без побочных эффектов. Избирательное действие (Л19) позволяет отнести эти соединения к агонистам $\alpha 2$ - подтипа. С другой стороны, лиганды (Л19) не только не показывают ухудшение способности мыши к обучению и повреждению ее памяти, но они в состоянии улучшить мнемонические процессы. Эти данные могут привести к интерпретации, что соединения (Л19) могут иметь профиль антагониста $\alpha 1$ - подтипа рецепторов, как «Флумазенил», на самом деле, соединения (Л19) тогда должны были бы обладать амнестическим эффектом, чего не происходит. Эти фармакологические аспекты позволяют отличить рассмотренные соединения (Л19) от предыдущих бензодиазепиновых лигандов, которые были наделены амнестическими свойствами [19].

Лиганды ГАМК также способны влиять на восприятие боли и, таким образом, могут обладать противогипералгезической активностью. Так, в экспериментах *in vivo* противогипералгезическая активность соединений (Л20) была оценена на модели боли, в которой периферийная моно-невропатия была получена у взрослых крыс размещением констриктивных лигатур вокруг седалищного нерва; а также на животной модели гипералгезии, индуцированной стрептозотоцином, которая воспроизводит боль, вызванную диабетической нейропатией у лабораторных животных.



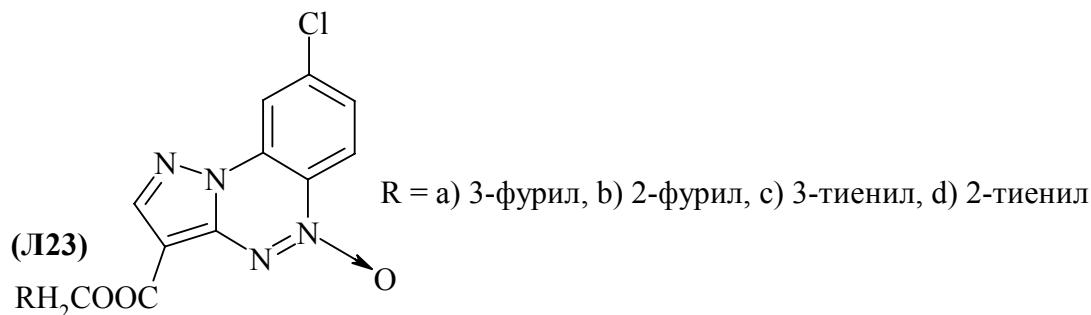
Наиболее высокую эффективность показало соединение (J20) с заместителями $R_1 = \text{I}$, $R_2 = \text{NHCH}_2\text{-Ph}$, поскольку оно оказывало защитное действие, начиная с дозы 3 мг/кг перорального введения, в то время как первичная активная доза для других соединений (J20) с заместителями $R_1 = \text{I}$, $R_2 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-Ph}$ и $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_2\text{-Ph}$ составила 10 мг/кг [21].

Антиконвульсивную активность лиганда (J21) бензодиазепиновых рецепторов авторы обуславливают его профилем частичного агониста с низкой эффективностью. Соединение (J21) обладает высокой аффинностью к бензодиазепиновым рецепторам ($K_i = 36.5 \text{ nM}$) и умеренной антиконвульсивной активностью (36.8 % в сравнении с «Диазепамом») при пероральном введении 300 мг/кг [22].



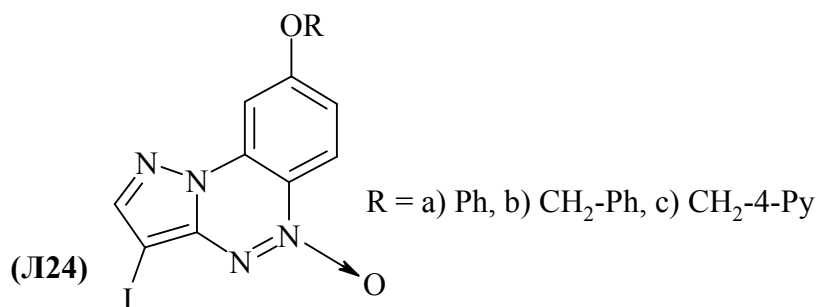
Соединения (J22) также имеют высокую аффинность к бензодиазепиновым рецепторам ($K_i 10.3 \text{ nM}$ и 36.3 nM). Однако 2-тиенил изомер, имеющий лучшее средство (K_i) *in vitro*, показывает очень слабую внутреннюю эффективность в естественных условиях по сравнению с 3-тиенил изомером. Отсутствие активности в организме 2-тиенил изомера по сравнению с 3-тиенил изомером может быть объяснено различными метаболическими путями окисления тиофенового кольца двух изомеров. Соединение (J22b) показывает селективную антиконвульсивную активность *in vivo* (предотвращает судороги, индуцированные пентилентетразолом в дозах 30 и 100 мг / кг перорально на 61.5 и 46.1% соответственно), не влияя на координацию движения животных. Этот эффект присутствует, возможно, из-за того, что соединение (J22b) выполняет функции агониста/антагониста в соответствии с его значением соотношения ГАМК, так что конкретный ГАМК/BZ подтип рецептора может быть выборочно активирован [23].

Сочетание в функции эфира в 3-м положении пиразоло-бензотриазинового фрагмента и электронодонорного гетероарильного кольца дает новую серию соединений (**Л123**) с высоким сродством к бензодиазепиновым рецепторам (K_i = от 6.8 до 24.4 нМ).



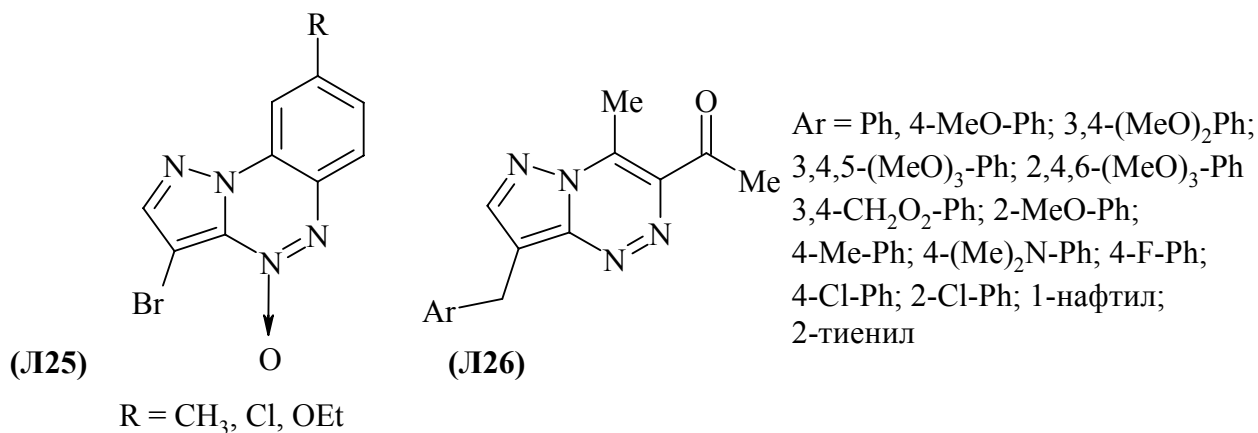
В условиях испытаний *in vivo* соединение (**Л123d**) четко выделяется среди остальных соединений. Дифференциальный профиль соединения (**Л123d**) в условиях *in vivo* может быть связан с его внутренней различной эффективностью для определенного подтипа рецепторов ГАМК. На самом деле, проявляя анксиолитические свойства оно, вероятно, действует как агонист α_2 - и α_3 - подтипов. Отсутствие седативных свойств и амнезии, а также и способность (**Л123d**) предотвращать эффекты диазепама на судороги, индуцированные пентилентетразолом, и на ротород, могут быть связаны с его профилем антагониста α_1 - подтипов. Отсутствие усиления действия этанола можно объяснить тем, что, вероятно, (**Л123d**) действует как антагонист или агонист низкой эффективности α_5 - подтипов [24].

Еще одной разновидностью лигандов бензодиазепиновых рецепторов в ряду пиразоло-бензотриазин-5-оксидов являются соединения (**Л124a-c**).



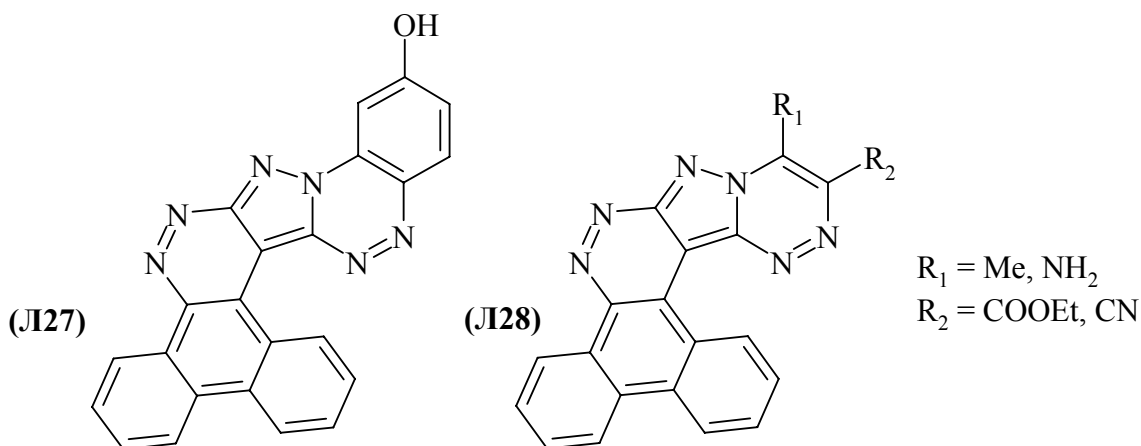
Производные (**Л124a-c**) имеют высокое сродство к бензодиазепиновым рецепторам, однако в зависимости от заместителя R их *in vivo* свойства различны. Так соединение (**Л124c**) (K_i = 1.3 нМ) способно селективно улучшать эффективность памяти у мышей, не обладая при этом анксиолитикоподобным действием и побочными эффектами. Соединение (**Л124b**) является изостером соединения (**Л124c**), обладая практически одинаковой с ним аффинностью (K_i = 1.1 нМ), но демонстрирует анксиолитикоподобные и промнемонические свойства. В то время как, соединение (**Л124a**) (K_i = 8.6 нМ) также проявляет промнемонические и анксиогенные свойства [25].

Помимо рассмотренных выше пиразоло-бензотриазин-5-оксидов, лигандами бензодиазепиновых рецепторов могут выступать и пиразоло-бензотриазины-4-оксиды. Данные соединения, представленные производными (**Л25а-с**) обладают высокой аффинностью к бензодиазепиновым рецепторам ($K_i = 10.5 \div 15.6$ nM). Производные (**25**) обладают свойствами антагонистов/частичных обратных агонистов BZR [26].



Активностью, схожей с действием лигандов BZR, обладают пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины (**Л26**), а именно: противосудорожной, анксиолитической, противоэпилептической, миорелаксантной и седативной активностями. По этой причине данные соединения приведены в текущем подразделе. К сожалению, авторами не приведены ни численные данные по активности, ни механизм действия данных соединений [27].

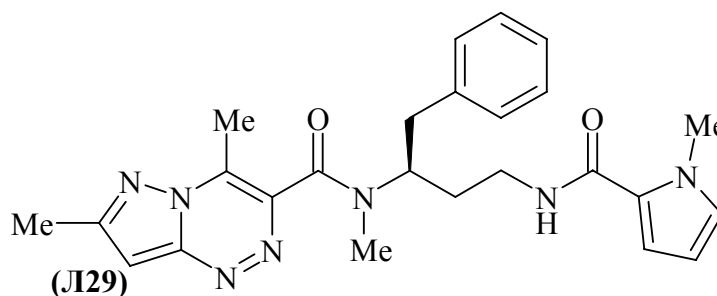
Одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона. В ряду пиразоло-триазинов имеются соединения (**Л27, Л28**), незначительно уступающие по своей активности уже применяемому в медицинской практике антипаркинсонному препарату «Бензатропину» (26% снижения эффекта, индуцированного Оксотреморином).



Биологические испытания показали, что наибольшей активностью из синтезированных соединений проявляет соединение (**Л28**) с заместителями R₁ = CH₃, R₂ = COOEt (активность 0.82 по отношению к «Бензатропину», 21% снижения эффекта, индуцирован-

ного Оксотреморином). Среднюю активность показало соединение (Л127) и (Л128) с заместителями $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{CN}$ (0.61 и 0.43 по отношению к «Бензотропину» соответственно) [28].

Соединение (Л129) как антагонист рецепторов орексина может применяться для лечения широкого ряда расстройств, таких как расстройства сна (нарколепсия, бессоница); расстройства пищевого поведения (вкусовые расстройства); расстройства, связанные с веществами (токсикомания) и с отменой веществ (прекращение приема наркотиков, курения); болезнь Альцгеймера; психологические, неврологические и нейродегенеративные расстройства (депрессия, тревога); сердечнососудистые заболевания, астма, диабеты и др.



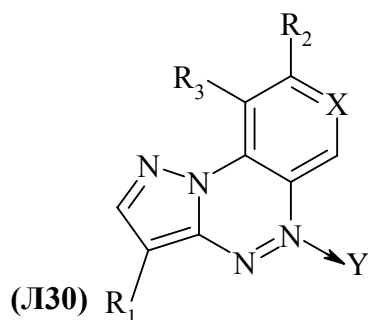
Данные по ингибированию орексина-1 и орексина-2, полученные в ходе биологических испытаний, представлены в виде $K_d = \text{IC}_{50}/(1+(L/\text{EC}_{50}))$, где L – концентрация орексина A , и составляют для соединения (Л129) 0.589 и 0.520 μM соответственно [29].

Описанные в данном подразделе пиразолотриазины могут найти широкое применение для лечения неврологических расстройств. Наиболее широко в литературе по этой теме освещены пиразоло[5,1-с][1,2,4]-бензотриазин-5(или 4)-оксиды, имеющие заместители в 3 и 8 положении молекулы, которые являются лигандами BZR с высокой аффинностью к этим рецепторам. Они обладают свойствами как агонистов/частичных агонистов тех или иных подтипов рецепторов, так и антагонистов BZR, чем и обуславливаются биологические свойства данных производных.

1.3. Противораковая и антиоксидантная активности

Говорить об актуальности поиска противораковых препаратов не имеет смысла, так как только в одной России это заболевание ежегодно уносит жизни более 300 тысяч человек. Пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины также были исследованы на противораковую активность и некоторые производные проявили себя как потенциальные агенты для терапии злокачественных новообразований. Кроме того, некоторые пиразолотриазины обладают умеренной антиоксидантной активностью и также могут найти широкое применение в медицинской практике.

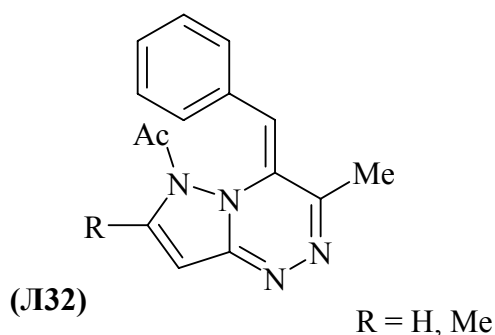
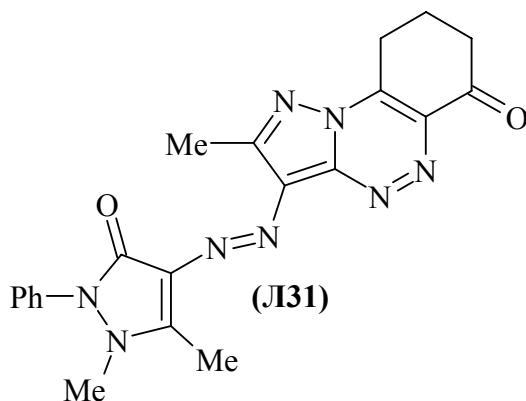
Так, например, противораковая активность соединений (**Л30**), явно имеющих структурное сходство с рассмотренными выше лигандами BZR, была оценена на клетках аденокарциномы человеческого кишечника (HCT-8) в условиях гипоксии и при нормальном содержании кислорода. Наибольшую активность показали соединения с заместителями $R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{N-метилпиперазин}$, $R_3 = \text{H}$, $X = \text{CH}$, $Y = \text{O}$ и $R_1 = R_3 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{N-метилпиперазин}$, $X = \text{CH}$, $Y = -$, их способность ингибировать рост HCT-8 при концентрации 100 μM составляет соответственно $93.22 \pm 0.48 \%$ и $98.68 \pm 0.018\%$.



$R_1 = \text{H, CONH}_2, \text{COOH, COOEt, NO}_2$
 $R_2 = \text{H, N-метилпиперазил, морфолил, O(CH}_2)_2\text{NMe}_2,$
 $\text{O(CH}_2)_4\text{CH}_3, \text{Ph, } p\text{-OMe-PH, 2-тиенил}$
 $R_3 = \text{H, NO}_2$
 $X = \text{N, CH}$
 $Y = \text{O, -}$

Вероятно, что N-оксидная функциональная группа необходима преимущественно для гипоксической цитотоксичности соединений (**Л30**), в то время как N-деоксид динитропроизводное демонстрирует цитотоксичность при нормальном содержании кислорода [30].

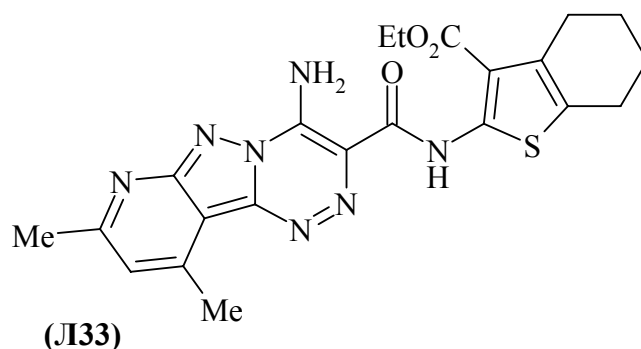
Многообещающую *in vitro* противоопухолевую активность в отношении четырех протестированных опухолевых клеточных линий человека (HepG2, WI 38, VERO, MCF-7) демонстрирует соединение (**Л31**). Значения IC_{50} составили 55.3, 53.0, 61.1, 68.2 $\mu\text{g/ml}$ соответственно для каждого вида клеточных линий. В качестве препарата-сравнения было использовано известное противоопухолевое средство 5-фторурацил ($\text{IC}_{50} = 9.1, 4.0, 6.4, 2.5$ $\mu\text{g/ml}$ соответственно). Кроме того, соединение (**Л31**) проявляет умеренную антиоксидантную активность (ингибирование 52.54%, для сравнения, значение ингибирования для аскорбиновой кислоты - известного антиоксиданта – 92.30%) [31].



Другим соединением, обладающим широким спектром противоопухолевой активности являются соединения (**Л32**). В экспериментах *in vitro* производные (**Л32**) проявили противоопухолевую активность, наибольшую активность показало соединение с $R = \text{Me}$

(среднее значение $GI_{50} = 4.9 \mu\text{M}$ на 60 линиях раковых клеток человека) с признаками селективного действия против рака толстой кишки KM 12 ($GI_{50} = 0.02 \mu\text{M}$) и рака молочной железы MCF-7 ($GI_{50} = 1.35 \mu\text{M}$) [32].

Слабой противораковой и антиоксидантной активностью обладает сложноэфирный аналог (**Л33**) противомикробного соединения (**Л17**). В экспериментах *in vitro* был исследован эффект соединения (**Л33**) на выживаемость клеток асцита Эрлиха. При эффективных дозах (ED) 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ процент смертности опухолевых клеток составил всего 1.8, 3.6, 6.8 % соответственно. При этом смертность при использовании препарата сравнения 5-фторурацила составила 37, 58, 93 %.



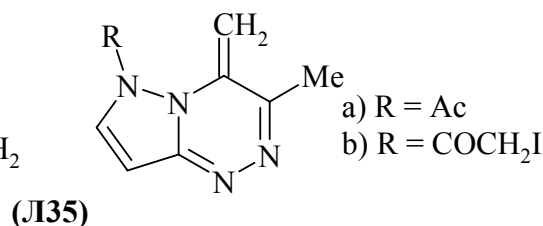
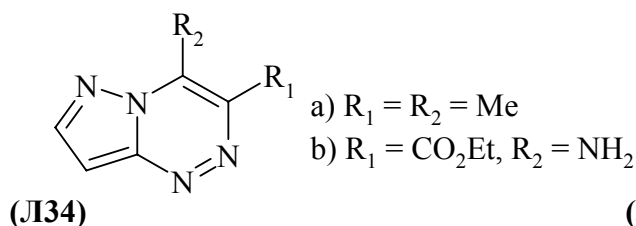
Также была оценена антиоксидантная активность соединения (**Л33**) обесцвечиванием катион-радикалов, полученных из 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолил-6-сульфо кислоты). Значение ингибирования составило всего 29.64 %, что значительно ниже активности аскорбиновой кислоты (83.99 %) [33].

Пиразолотриазины (**Л34**) и (**Л35**), имеющие достаточно простое строение, проявили ингибирующую способность в отношении Саркомы 180 на мышях, превосходящую действие известного в медицинской практике 6-меркаптопурина, выбранного в качестве соединения сравнения. Данные по активности соединений (**Л34**) и (**Л35**) приведены в таблице 4.

Таблица 4

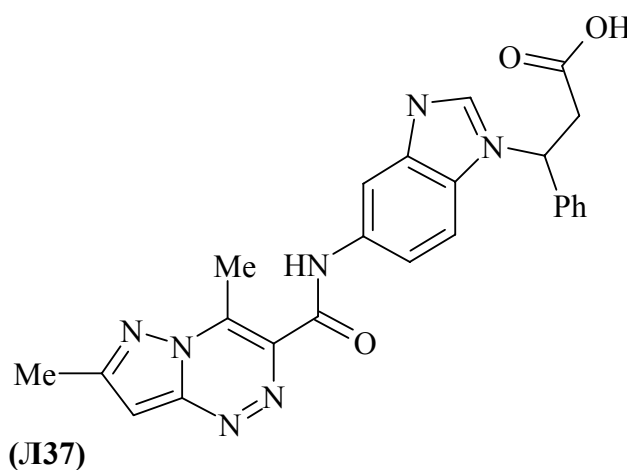
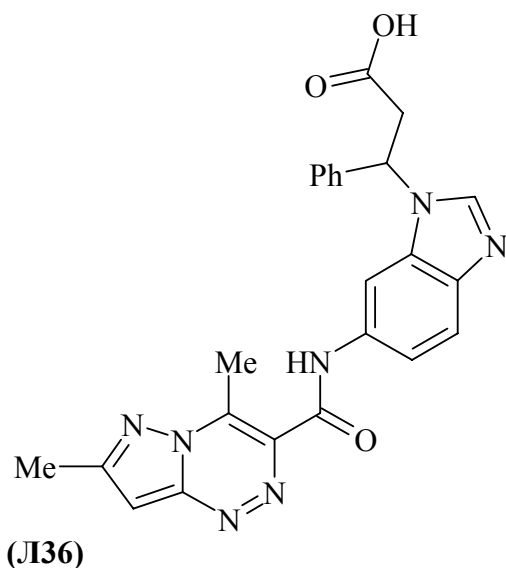
Соединение	Ингибирование*
Л34a	0.74
Л34b	0.48
Л35a	0.56
Л35b	0.35
6-меркаптопурин	0.69

* Вес опухоли, тест/контроль



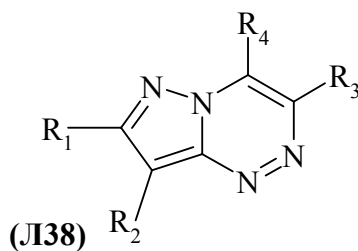
Подобную ингибирующую активность проявляют соединения (Л34а) и (Л35а) и в отношении метилхолантреновой опухоли и опухоли Уолкера. Соединение (Л35b) не ингибирует рост метилхолантреновой опухоли [34,35].

Механизмы действия противораковых соединений не ограничиваются цитотоксическим действием. Некоторые соединения, действуя на рецепторы и ферменты, обладают широким спектром противораковой активности. В частности, соединения (Л36) и (Л37) являются потенциальными ингибиторами семейства интегринов - трансмембранных рецепторов, участвующих в адгезии клеток, и таким образом могут применяться в качестве антиангиогенных агентов (то есть для лечения расстройств, характеризующихся неадекватной васкуляризацией, например, ассоциированного с опухолью ангиогенеза, который является необходимым условием роста опухолевых клеток, пролиферации и метастазирования) у млекопитающих, особенно у людей.



В частности, соединения (Л36) и (Л37) могут быть полезными для профилактики и лечения различных гиперпролиферативных заболеваний человека, таких как злокачественные и доброкачественные опухоли печени, почек, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичников, толстой кишки, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, вульвы, щитовидной железы, головы и шеи, карциномы печени, саркомы, глиобластомы, и других гиперпластических состояний, таких как доброкачественная гиперплазия кожи (например, псориаз) и доброкачественная гиперплазия простаты. Кроме того, ожидается, что соединения (Л36) и (Л37) могут обладать активностью против ряда лейкозий и лимфоидных злокачественных новообразований. Количественные данные по взаимодействию соединений (Л36) и (Л37) с интегринными авторами не приведены [36].

Другим примером опосредованной противоопухолевой активности является библиотека из 30 соединений с общей формулой (Л38).



Где R_1 = 5-7-членный гетероцикл, содержащий 1-3 гетероатома (N, O, S), либо ароматическое кольцо, в котором от 1 до 4 заместителей из ряда: Hal, NO_2 , CN, N_3 , CHO, CF_3 , R_5 , OR_5 , $\text{S(O)}_m\text{R}_5$, NR_5R_5 , COR_5 , C(O)OR_5 , $\text{R}_6\text{OR}_7\text{OR}_5$ и др.

R_2 = ароматическое кольцо, замещенное как минимум одним заместителем OR_8 и до четырех заместителей из ряда: Hal, NO_2 , CN, N_3 , CHO, CF_3 , R_5 , OR_5 , $\text{S(O)}_m\text{R}_5$, NR_5R_5 , COR_5 , C(O)OR_5 , $\text{R}_6\text{OR}_7\text{OR}_5$ и др.

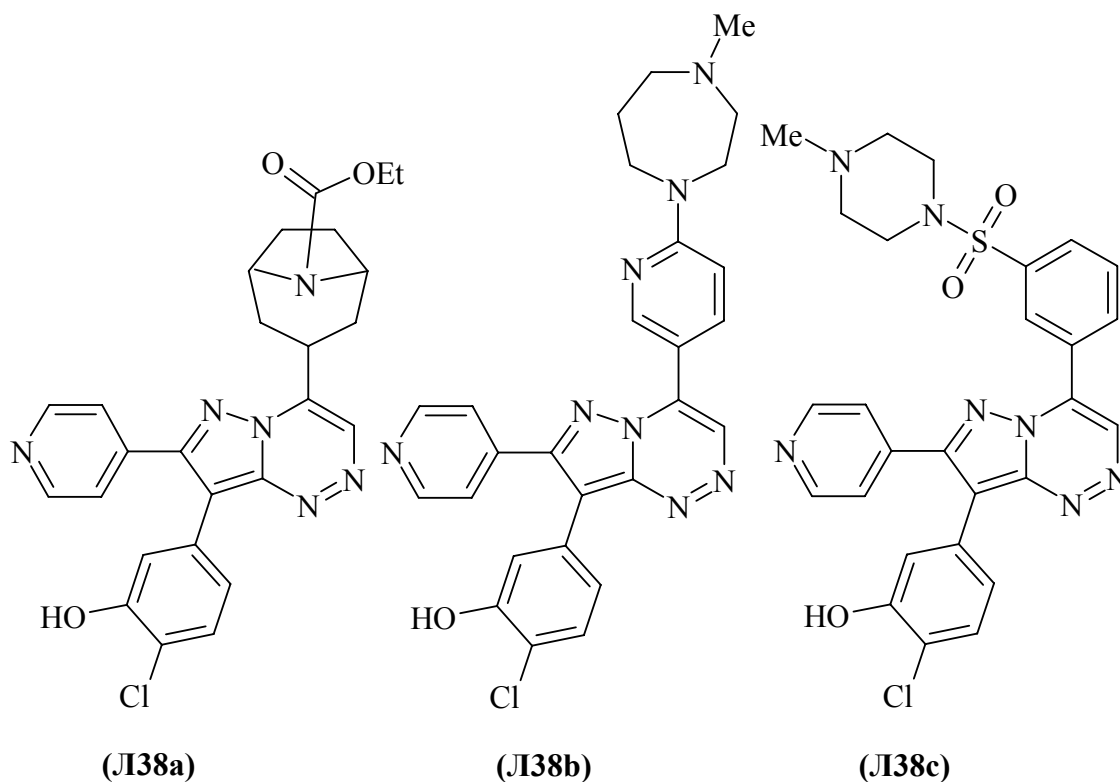
R_3, R_4 = H, циклоалкил (C_{3-10}), алкил (C_{1-6}), алкокси (C_{1-6}), циклоалкокси (C_{3-10}), алкен (C_{1-6}), ароматическое кольцо, либо гетероцикл, содержащий 1-3 гетероатома (N, O, S), в каждом цикле от 1 до 4 заместителей из ряда: Hal, NO_2 , CN, N_3 , CHO, CF_3 , R_8 , OR_8 , $\text{S(O)}_m\text{R}_8$, NR_8R_8 , COR_8 , C(O)OR_8 и др.

R_5, R_6 = H, алкил (C_{1-6}), алкенил (C_{2-6}), алкинил (C_{2-6}), циклоалкил (C_{3-7})

R_7 = алкил (C_{2-6})

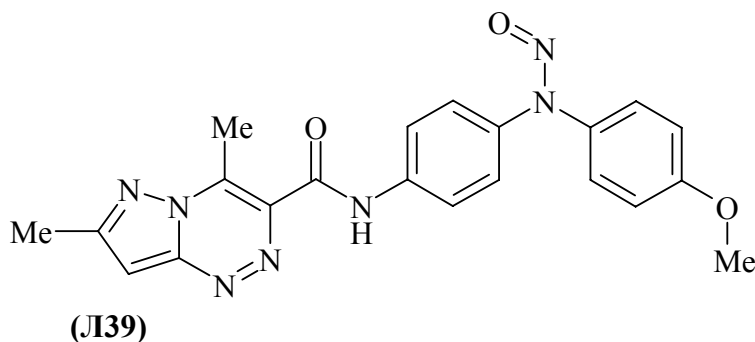
R_8 = H, алкил (C_{1-6}), алкенил (C_{2-6}), алкинил (C_{2-6}), циклоалкил (C_{3-7}), арил (C_{6-12}), гетероарил, содержащий 1-3 гетероатома (N, O, S)

Оценка соединений (Л138) в стандартных фармакологических тестах показала, что замещенные пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины (Л138) обладают значительной противоопухолевой активностью и, в частности, ингибируют V-Raf киназы. На основании активности, показанной в стандартных фармакологических тестах, соединения (Л138) полезны в качестве противоопухолевых агентов. В частности, эти соединения могут быть использованы в лечении, ингибировании роста или ликвидации новообразований молочной железы, почек, мочевого пузыря, полости рта, гортани, пищевода, желудка, толстой кишки, яичников, легких, поджелудочной железы, печени, простаты и кожи.

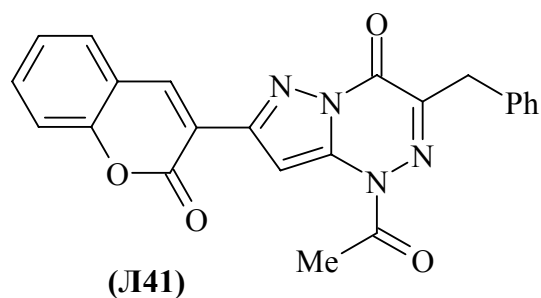
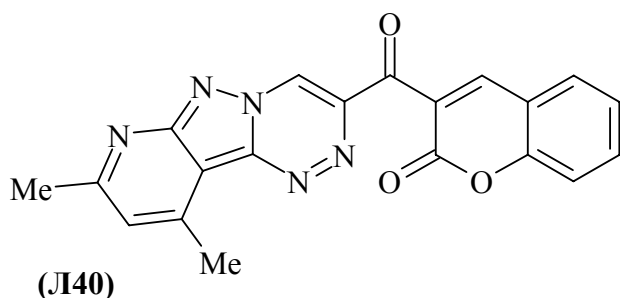


Значения IC_{50} ингибирования V-Raf, определенные для соединений (**Л38**), составили от <0.0003 до $1 \mu\text{M}$. Согласно биологическим испытаниям, наиболее активными соединениями оказались пиразолотриазины (**Л38a,b,c**) [37].

Антиоксидантная активность соединений также является важной характеристикой веществ. Так, соединение (**Л39**) может быть применено для лечения заболеваний, вызванных оксидативным стрессом, таких как атеросклероз-ассоциированной ишемии, рестеноза после ангиопластики, стеноза после сосудистой хирургии, сахарного диабета, резистентности к инсулину, микрососудистых осложнений в почках и сетчатке от сахарного диабета, сердечно-сосудистого риска диабета, гипоксии мозга, эректильной дисфункции у мужчин, хронического отторжения после трансплантации органов, суставных патологий. Количественные данные антиоксидантной активности для соединения (**Л39**) авторами не представлены [38].



Другими соединениями, обладающими, правда, слабой антиоксидантной активностью являются производные кумарина (**Л40**) и (**Л41**).



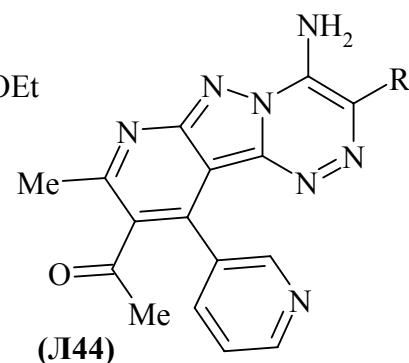
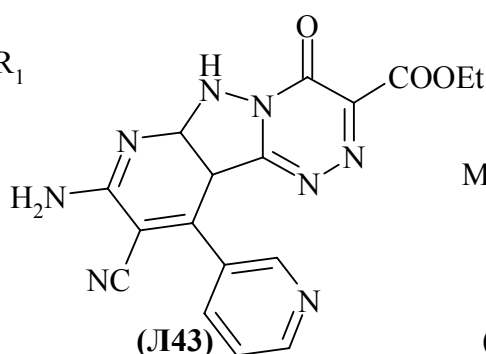
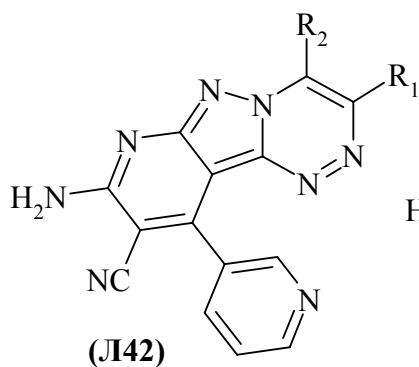
Количественно действие пиразолотриазинов (Л40) и (Л41) было оценено как процент ингибирования перекисного окисления липидов и составляет 46.38% и 35.34% соответственно. В качестве соединения сравнения использовалась L-аскорбиновая кислота, для которой значение ингибирования составило 88.55% [39].

Таким образом, большая часть описанных в данном подразделе соединений проявляет широкий спектр противораковой активности, действуя как на саму опухоль, так и на рецепторы и ферменты, принимающие участие в пролиферации клеток.

1.4. Противовирусная активность

Поиск новых противовирусных препаратов продиктован появлением новых штаммов вирусов, резистентных к уже используемым в медицинской практике препаратам. В ряду пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов имеются примеры противовирусных соединений.

В частности, соединение (Л42) с $R_1 = \text{CN}$, $R_2 = \text{NH}_2$ подавляет вирус простого герпеса-1 на 89 % при дозе 25 мкг. Меньшей активностью обладают соединения (Л42) с $R_1 = \text{COMe}$, $R_2 = \text{Me}$, с $R_1 = \text{COOEt}$, $R_2 = \text{NH}_2$ и с $R_1 = \text{CSNH}_2$, $R_2 = \text{NH}_2$, а также пиразолотриазин (Л43), которые подавляют HSV-1 на 62, 40, 15 и 38 % соответственно. В отношении вируса гепатита А умеренно активно только соединение (Л42) с $R_1 = \text{COMe}$, $R_2 = \text{Me}$, которое при дозе 25 мкг подавляет вирус на 47 %. Исследование цитотоксичности на линии клеток Vero соединений (Л42) и (Л43) показало, что эти пиразолотриазины безопасны до 25 мкг [40].

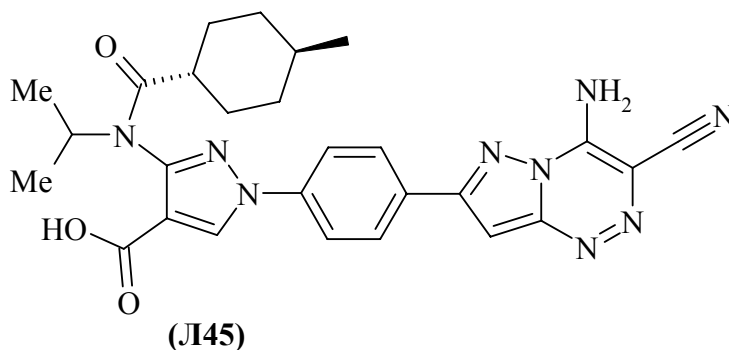


$R_1 = \text{CN}, \text{COOEt}, \text{CSNH}_2, \text{COMe}$
 $R_2 = \text{Me}, \text{NH}_2$

$R = \text{COOEt}, \text{CSNH}_2$

Соединение (**Л144**) с R = COOEt практически нетоксично до 35 $\mu\text{г}$ на линии клеток Vero, однако проявляет слабую активность против вируса простого герпеса-1 (подавление <10% при дозе 25 $\mu\text{г}$). Соединение (**Л144**) с R = CSNH₂ более токсично (безопасно до 15 $\mu\text{г}$) и подавляет HSV-1 на 55 % при дозе 15 $\mu\text{г}$ [41].

К соединениям с известным механизмом действия относится пиразолотриазин (**Л145**). Производное 4-карбоксо-пиразола (**Л145**) ингибирует репликацию РНК вируса гепатита С.



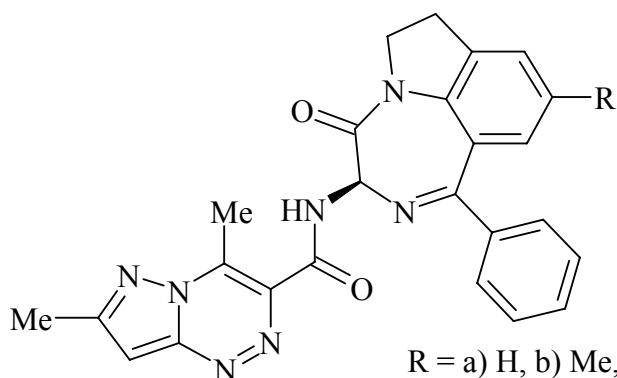
Значение IC₅₀ ингибирования активности РНК-зависимой РНК полимеразы соединением (**Л145**) было определено *in vitro* и составило <10 $\mu\text{М}$ [42].

Хотя противовирусные пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины и не представлены широким рядом соединений, активность данных соединений позволяет их использовать для профилактики и лечения вирусных заболеваний, в т.ч. смертельно опасных.

1.5. Лечение заболеваний дыхательных путей

Пиразолотриазины на основе диазепиноиндолов представляют интерес в качестве ингибиторов фосфодиэстеразы IV. PDE IV относится к семейству фосфодиэстераз. Этот фермент способен инактивировать циклический аденозинмонофосфат и циклический гуанозинмонофосфат и встречается в клетках, вовлеченных в воспалительные заболевания дыхательных путей.

Как показано в статье [43], авторами были использованы методы 2D и 3D QSAR для обнаружения фармакофоров, связывающихся с активным центром PDE IV и был предложен ряд диазепиноиндолов, в том числе содержащих пиразолотриазинный фрагмент (**Л146b,d**). Полученные расчетные данные удачно согласуются с обнаруженными активностями. Также была исследована селективность ингибирования PDE IV относительно других ферментов семейства фосфодиэстераз (PDE III и PDE I/V), наибольшую селективность показало соединение (**Л146b**).

**(J146)**

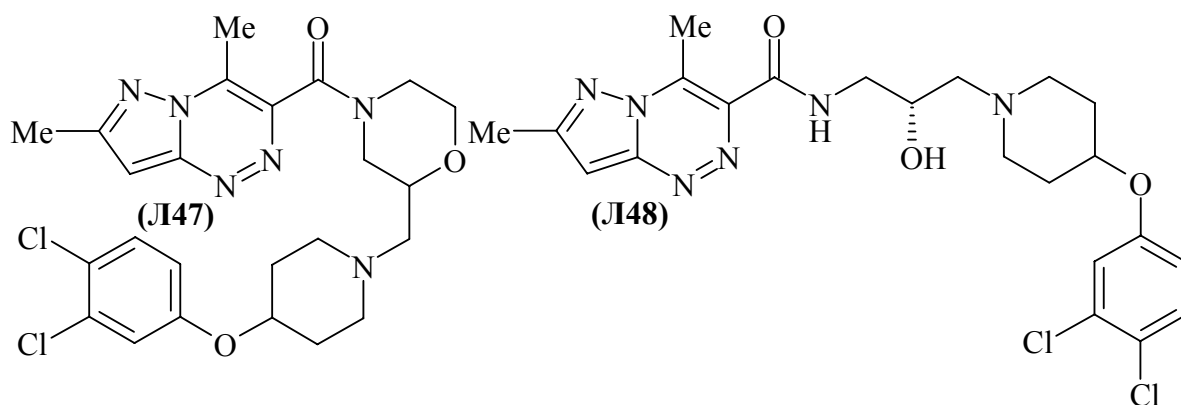
Значения IC_{50} , полученные в экспериментах *in vitro* для соединений (J146), находятся в диапазоне 0.2 до 2.7 μM , что сопоставимо с активностью соединения сравнения «Ролипрам» ($IC_{50} = 0.94 \mu M$), которое успешно используется в медицинской практике. Так, значение отношения IC_{50} («Ролипрам») / IC_{50} (соединений (J146a-c)) находится в диапазоне от 1,0 (R = CH₃), 1,4 (R = H) и 2,2 (CH₃O), то есть соединения (J146a-c) являются более эффективными, чем «Ролипрам» [44]. Соединение (J146) с заместителями R = NH₂ и пирролидинил также были исследованы на активность в качестве ингибиторов PDE IV. Как показали испытания *in vitro*, отношение IC_{50} («Ролипрам») к IC_{50} (соединений (J146d,e)) равно 1.1 и 4.0 для соединений (J146) с R = NH₂ и R = пирролидин соответственно, то есть соединения (J146d,e) также являются более эффективными ингибиторами фосфодиэстеразы IV, чем «Ролипрам» [45].

Соединение (J146d) *in vivo* показало активность как ингибитор антиген-индуцированной эозинофилии легких у серых крыс ($ED_{50} = 1.8$ мг/кг перорально), что превышает активность известных лекарственных средств «Ролипрама» ($ED_{50} = 4.66$ мг/кг перорально) и «Арифло» (не показал активность в данном эксперименте) [46]. В качестве потенциального ингибитора PDE IV авторы патента [47] предлагают использовать соединения (J146d,e) для лечения хронического обструктивного заболевания легких. Эффекты *in vivo* соединений (J146d,e) были также исследованы на морских свинках в модели эозинофильной инфильтрации, индуцированной антигенной стимуляцией или воздействием аэрозоля PAF. Введение соединений (J146d,e) (1-30 мг/кг перорально) значительно снижает количество эозинофилов в бронхо-альвеолярной промывочной жидкости, а также уменьшает воспалительные реакции, вызванные введением в трахею интерлейкина-5 у морских свинок [45].

Кроме того, исследования, проведенные на разных типах PDE показали, что значения IC_{50} , измеренные для PDE I, III и V, значительно превышают значение IC_{50} для PDE IV, что говорит о селективности ингибиторной активности соединения (J146) по отношению к PDE IV [44,45].

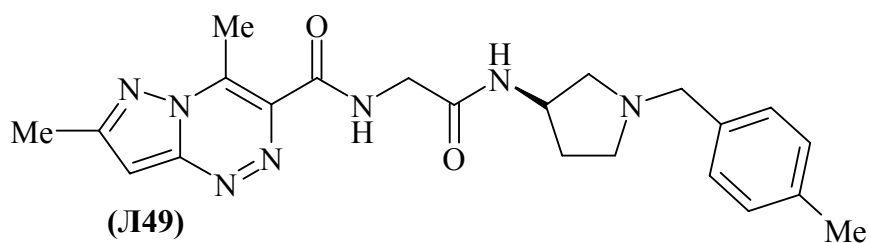
Описанные в текущем подразделе селективные ингибиторы PDE IV могут быть особенно полезны для лечения или профилактики: хронического обструктивного заболевания легких, аллергических патологий и, в частности, астмы и атопического дерматита; воспалительных патологий, в частности, бронхиальной патологии, ревматоидного артрита, а также воспалительных кишечных болей (геморрагический проктоколит и болезнь Крона); включая случаи, в которых присутствует аутоиммунная компонента.

Другой мишенью для препаратов, используемых в терапии заболеваний дыхательных путей, являются рецепторы CCR3. Модуляторы хемокиновой активности рецепторов CCR3 могут быть использованы для лечения астмы, ринитов и других иммунологических и воспалительных процессов.



Биологические испытания показали, что соединения (L147, L148) являются антагонистами CCR3, и антагонистами гистаминового рецептора H1. Количественные данные биологической активности для пиразоло-триазинов (L147, L148) авторами не представлены [48,49].

Ингибирующая способность соединения (L149) против повышения внутриклеточной концентрации кальция, а также против связывания человеческого эотоксина с мембранной фракцией CCR3, проанализированные с использованием клеток K562, стабильно экспрессирующих рецептор CCR3, составили 20-50 % [50].



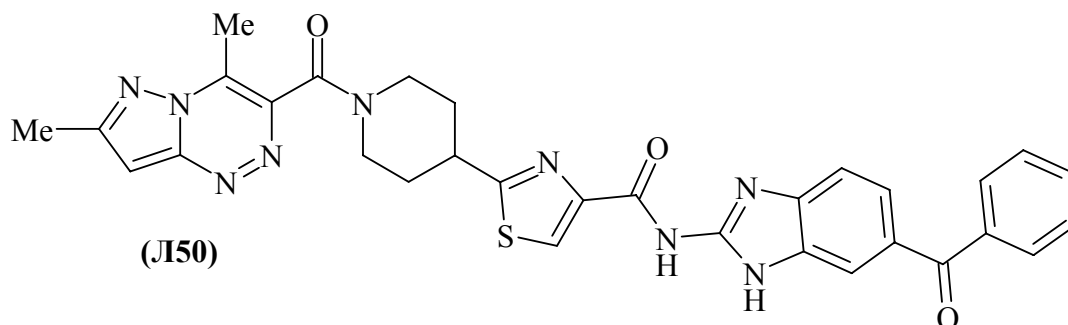
Антагонисты CCR3 также используются для лечения заболеваний, вызываемых увеличением количества и тканевой инфильтрацией эозинофилов, базофилов, активированных Т-клеток, таких как аллергические, воспалительные заболевания кишечника, СПИД.

Таким образом, для терапии легочных заболеваний в ряду пиразолотриазинов могут быть использованы производные, являющиеся ингибиторами PDE IV, либо антагонистами рецепторов CCR3.

1.6. Пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины с прочей активностью

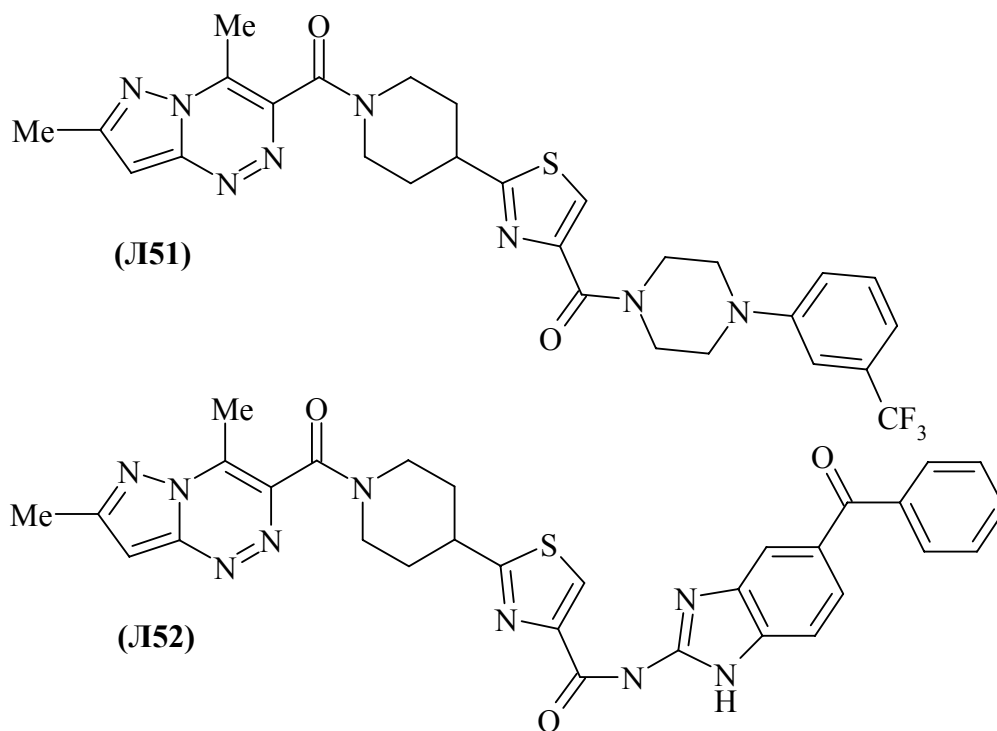
Многие производные пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов способны ингибировать ферменты или являться антагонистами определенных рецепторов, участвующих в развитии широкого ряда заболеваний. Отнести эти пиразолотриазины в один из выше описанных разделов невозможно, так как они обладают активностями, имеющими, казалось бы, различную природу. По этой причине данные соединения объединены в отдельный подраздел.

Так, соединение (**Л150**) – как одно из производных бензимидазолов-ингибиторов NF-κB может быть использовано для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с выбросом цитокинов, в том числе вирусных инфекций, воспалений, опухолей. Было выяснено, что NF-κB участвуют в транскрипции ДНК и распространении некоторых вирусов, в частности вируса гриппа (включая штамм H5N1-«птичий грипп»), ВИЧ, вируса гепатита С, таким образом, соединение (**Л150**), являющееся ингибитором ядерного фактора κB, может быть использовано в качестве противовирусного препарата.



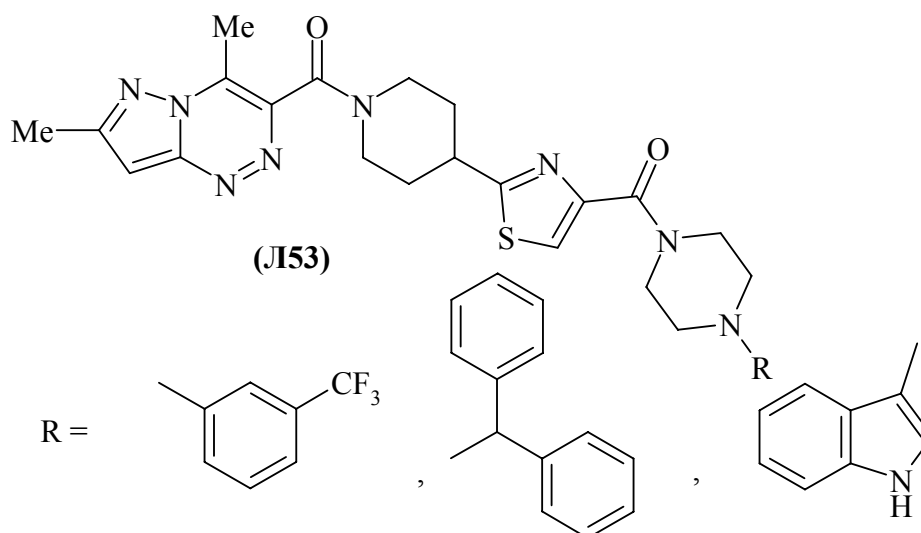
Кроме того, NF-κB считается ранним медиатором иммунных и воспалительных реакций и вовлечен в контроль пролиферации клеток. Была определена противовоспалительная, противовирусная и противораковая активность. Численные значения для оценки противовирусной и противораковой активности соединения (**Л150**) авторами не приведены. Значение EC₅₀, полученное при оценке противовоспалительной активности, индуцированной NF-κB, для соединения (**Л150**) составило <10 μM [51].

Другими представителями ингибиторов сигнального пути ядерного фактора-κB являются соединения (**Л151**) и (**Л152**). Они также представляют интерес как потенциальные противораковые, противовоспалительные соединения, а также могут использоваться в противовирусной терапии.



Значение EC_{50} , полученное при оценке ингибирования NF- κ B для соединения (J151) и (J152) составило $> 20 \mu\text{M}$ и $0,9 \mu\text{M}$ соответственно [52].

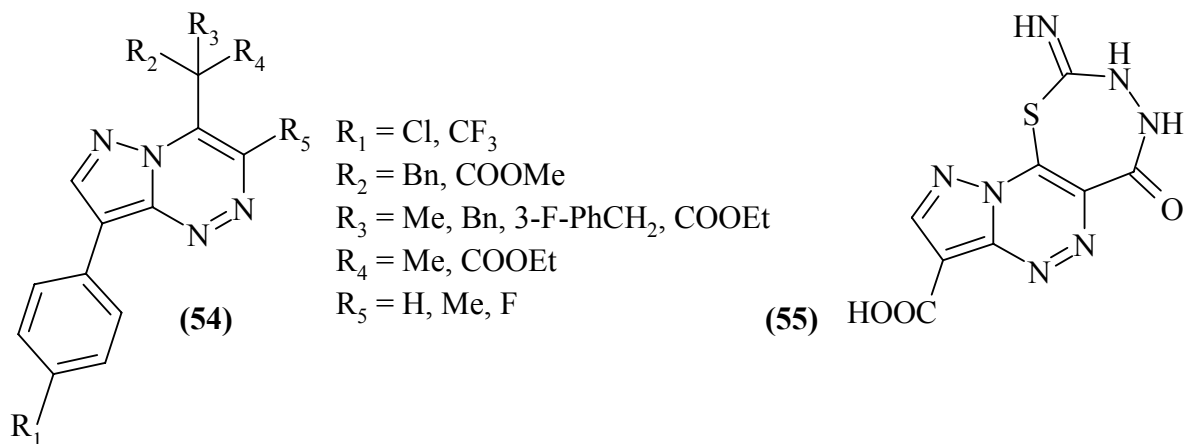
Также ингибиторами NF- κ B с явно выраженной способностью подавлять пролиферацию Т-клеток являются соединения (J153). Поэтому данные производные пиразоло-триазинов могут быть использованы для лечения заболевания, вызванных гиперпролиферацией Т-клеток, в том числе лечение воспалительных процессов, иммунологических расстройств и др.



Согласно данным биологических испытаний, среднее значение EC_{50} варьируется в диапазоне $3-40 \mu\text{M}$. Ингибирование пролиферации Т-клеток соединениями (J153) составляет $>50 \%$ в сравнении с контрольным экспериментом [53-55].

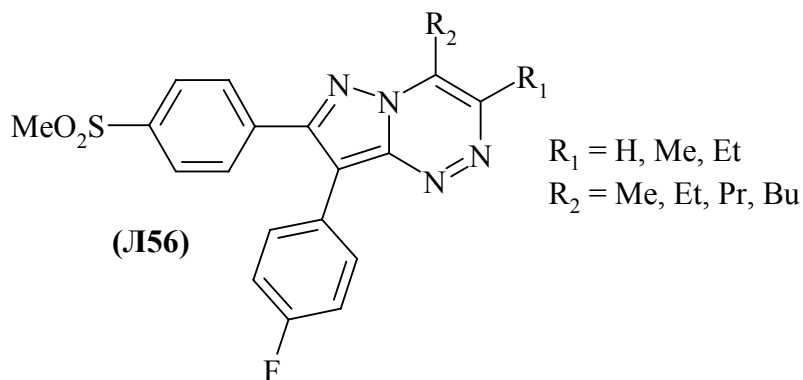
Соединения (**Л154**) модулируют активность рецептора, связанного с G-белком (GPR119), который влияет на уровень внутриклеточной сАМР и, следовательно, являются полезными в лечении GPR119-ассоциированных заболеваний или расстройств, таких как сахарный диабет, ожирение и сопутствующие расстройства обмена веществ.

Согласно биологическим испытаниям, соединения (**Л154**) вызывают зависимое от концентрации увеличение внутримолекулярного уровня сАМР и демонстрируют уровень EC_{50} в диапазоне от 16 до 51 нМ, самым активным оказалось соединение с $R_1 = CF_3$, $R_2 = R_5 = Me$, $R_3 = Bn$, $R_4 = CO_2Me$ [56].



Другим соединением, способным применяться в терапии диабета второго типа, является пиразолотриазин (**Л155**). Он действует как ингибитор DPP IV. Согласно данным биологических испытаний, процент ингибирования дипептидил пептидазы IV *in vitro* при концентрации 10 μM соединения (**Л155**) составляет 35.6 % [57].

Для определения противовоспалительной активности соединения (**Л156**) были исследованы как потенциальные ингибиторы циклооксигеназы – одного из ключевых ферментов в каскаде арахидоновой кислота как *in vitro* (COX-1 и COX-2 в цельной крови человека), так и *in vivo*.



Именно селективные ингибиторы COX-2 (который находится в широком диапазоне воспалительных клеток) способны проявлять противовоспалительную активность. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

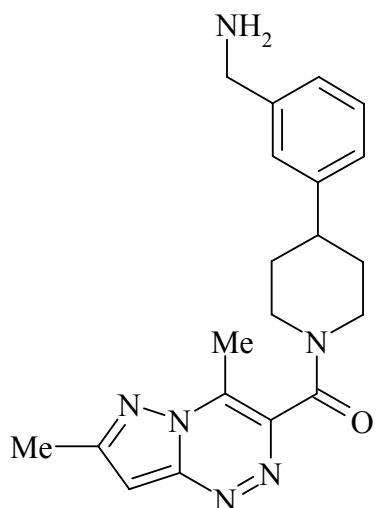
Соединение	R ₁	R ₂	% ингибирования		
			COX-1		COX-2
			10 μM	10 μM	1 μM
Л56a	Me	Me	1.2	100	40.5
Л56b	H	Pr	29.3	100	43.9
Л56c	Et	Me	61.9	100	74.9
Л56d	Me	Pr	18.7	95.0	17.9
Л56e	H	Bu	69.8	89.7	0.9
Л56f	Et	Et	88.7	100	50.9

Как видно из таблицы 5 удлинение цепи R₁ приводит к увеличению активности. Среди этих соединений активность *in vivo* проявляют только соединения (**Л56a,b**) [58].

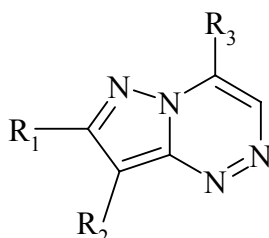
Соединение (**Л49**), описанное в разделе 1.5 как антагонист рецепторов CCR3 также проявляет активность как антагонист рецепторов CCR5 и может быть использовано для лечения заболеваний, вызываемых инфильтрацией и активацией моноцитов/макрофагов, Т-клеток в тканях, что играет роль в развитии болезней, таких как ревматоидный артрит, нефриты, хронические обструктивные заболевания легких, фиброзы и др.

Также соединение (**Л49**) может быть полезно как лекарственное или профилактическое средство для заболеваний, вызванных ВИЧ, таких как СПИД, оказывая ингибирующее действие на инфицирование клеток-хозяев ВИЧ-1, основанное на антагонистической активности CCR5. Численные данные по биологической активности соединения (**Л49**) авторами не приведены [59].

Результаты тестов *in vitro* показали, что соединение (**Л57**) обладает активностью ингибирования триптазы и может быть использовано для лечения воспалительных заболеваний, различных дерматологических состояний, инфаркта миокарда, инсульта, стенокардии и другие последствий разрыва атеросклеротической бляшки, а также пародонтоза, диабетической ретинопатии, роста опухоли, анафилаксии, рассеянного склероза, пептической язвы, и вирусной синцитиальной инфекции. К сожалению, численных данных K_i триптазы для соединения (**Л57**) не приведены [60].



(J157)

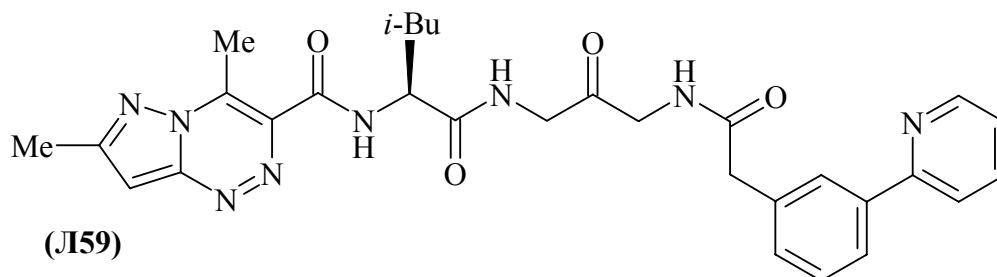


(J158)

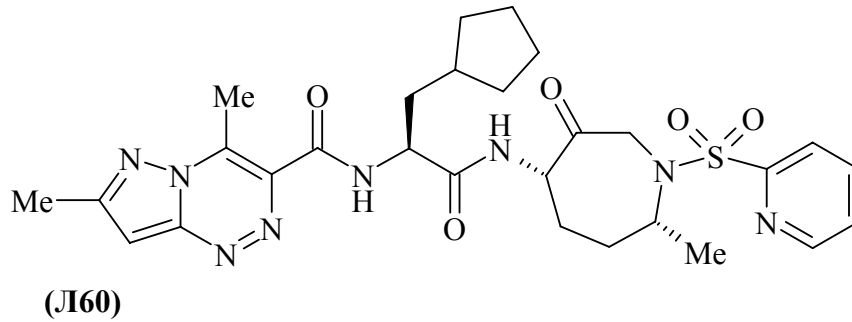
$R_1 = \text{Et, OMe}$
 $R_2 = 3\text{-Pentyl; NHCH(CH}_2\text{OMe)}_2$;
 $\text{NHCH(Et)CH}_2\text{OMe}$;
 NH-2-Bu, COCH_3 ; CH(OMe)CH_3 ;
 $\text{CO-2-pentyl; C(OH)Ph-3-pyridyl}$;
 $\text{cycloalkyl(C}_{3-5}\text{)}$;
 $\text{CH(OMe)cycloalkyl(C}_{3-4}\text{)}$;
 $\text{CH(Et)cycloalkyl (C}_{3-4}\text{)}$
 $R_3 = 2,4\text{-Cl}_2\text{-Ph, 2,4,6-Me}_3\text{-Ph}$

Антагонисты CRF (кортикотропин-релизинг фактор) могут быть использованы в терапии психиатрических, неврологических, иммунологических и сердечнососудистых заболеваний. В частности, группа соединений с общей формулой (J158) продемонстрировали высокую аффинность к CRH_1 рецепторам крыс ($K_i \leq 1000$ нМ). Эксперименты на грызунах показали, что при пероральном введении соединений (J158) в дозах 0.01-10 мг/кг веса от одного до четырех раз в день достаточно для достижения фармакологического эффекта [61].

Пиразолотриазин (J159) является ингибитором протеазы, в частности, ингибитором катепсина К и является полезным для лечения заболеваний, непосредственно связанных с цистеиновыми протеазами, в том числе пневмоцистных инфекций, а также шистосомоза, малярии, метастазирования опухолей, метахроматической лейкоцистоза, мышечной дистрофии, и особенно полезно соединение (J159) для лечения заболеваний, в которых участвует катепсин К, в особенности заболеваний чрезмерной потери костной массы или хряща, в том числе остеопороза, заболевания десен, включая гингивит и периодонтит; артрита, а конкретнее, остеоартрита и ревматоидного артрита, болезни Педжета; гиперкальциемии при злокачественных новообразованиях и нарушения метаболизма костной ткани. Значение константы ингибирования катепсина К для соединения (J159) не было приведено авторами [62].



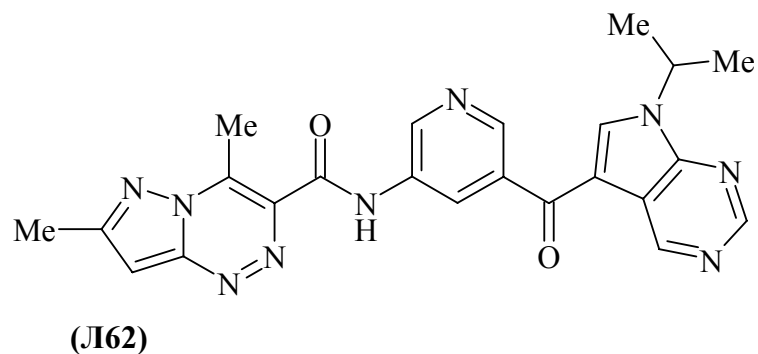
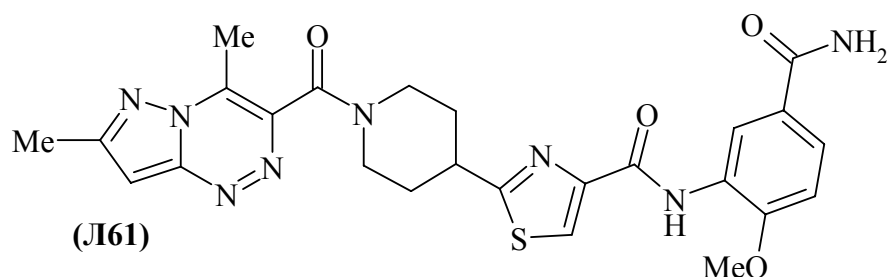
(J159)



Соединение (**Л60**) также является ингибитором протеазы, но обладает другой активностью, так как подавляет катепсин S и может быть полезным для лечения заболеваний, вызванных патологическим уровнем катепсина S, в частности для лечения и/или профилактики аутоиммунных патологических состояний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, ювенильный диабет, системная красная волчанка, болезнь Грейвса, миастения, тиреодит Хашимото, болезнь Аддисона, злокачественная анемия, тиреотоксикоз, аутоиммунный атрофический гастрит, синдром Гудпасчера, аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, идиопатическая лейкопения, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит, криптогенный цирроз, язвенный колит, синдром Шегрена и др., а также профилактика болезненного состояния, вызванного образованием и/или осложнением атеросклеротического поражения. Значение константы ингибирования катепсина S для соединения (**Л60**) не приведено [63].

Соединение, представленное формулой (**Л61**) может быть использовано для лечения расстройств, опосредованных сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), таких как эндометриоз, различных злокачественных и доброкачественных новообразований, псориаза и других кожных заболеваний, атеросклеротической болезни, ревматоидного артрита, макулодистрофию и осложнения диабета, включая ретинопатию, нефропатию и нейропатию. Процент ингибирования VEGF составляет 88 %, $IC_{50} = 5.0 \mu M$. Кроме того, были проведены исследования по ингибированию пролиферации человеческих эндотелиальных клеток пупочной вены (HUVEC) *in vitro*, $IC_{50} = 31.0 \mu M$ [64].

Этими же авторами показано, что соединение (**Л61**) также способно воздействовать на рецептор EP3, связываясь с ним для изменения сосудистого тонуса миометрия и эндометрия и может применяться для лечения нарушений менструального цикла, сердечнососудистых заболеваний и гипертонии. Численное значение EC_{50} связывания соединения (**Л61**) с рецептором EP3 авторами не приведено [65].



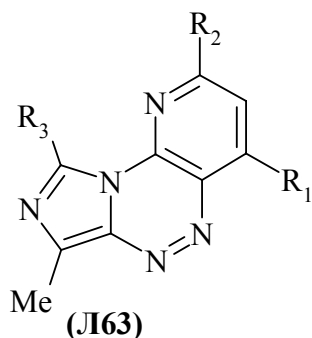
Как ингибитор тропомиозин-зависимых киназ пиразолотриазин (**L62**) может применяться для лечения различных видов боли (воспалительной боли, ноцицептивной боли, невропатической боли, острой боли, хронической боли, боли опорно-двигательного аппарата, головная боли и др. видов боли). Кроме того, тропомиозин-зависимые киназы связаны с различными видами рака человека, и открытие ингибиторов Trk и их клиническое тестирование может обеспечить дальнейшее понимание в биологических и медицинских гипотезах лечения рака с направленной терапией. Численное значение степени ингибирования тропомиозин-зависимых киназ было выражено в IC_{50} и составило для соединения (**L62**) 2340 нМ [66].

Подытоживая раздел 1, стоит отметить, что пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины обладают разнообразной биологической активностью. Большая часть соединений представляют собой 4,7-диметил-пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины с различными заместителями, то есть данная структура является ключевым фармакофором.

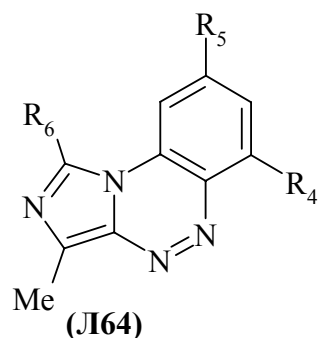
2. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ИМИДАЗО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНЫ

Этот раздел включает ряд соединений, содержащих в составе молекулы имидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин и обладающих, в основном, активностью как ингибиторы фосфодиэстераз 2 и 10А.

Так как PDE 10А влияет на срединные шипиковые нейроны, то в качестве терапевтической стратегии лечения дисфункция кортикально-стриальной нейротрансмиссии, вовлеченной в патофизиологию шизофрении и болезни Хантингтона, может быть предложено ингибирование PDE10А. Значение IC_{50} было определено для соединений (**L63**) и (**L64**) и находится в диапазоне от 1.48 до 2430 нМ.



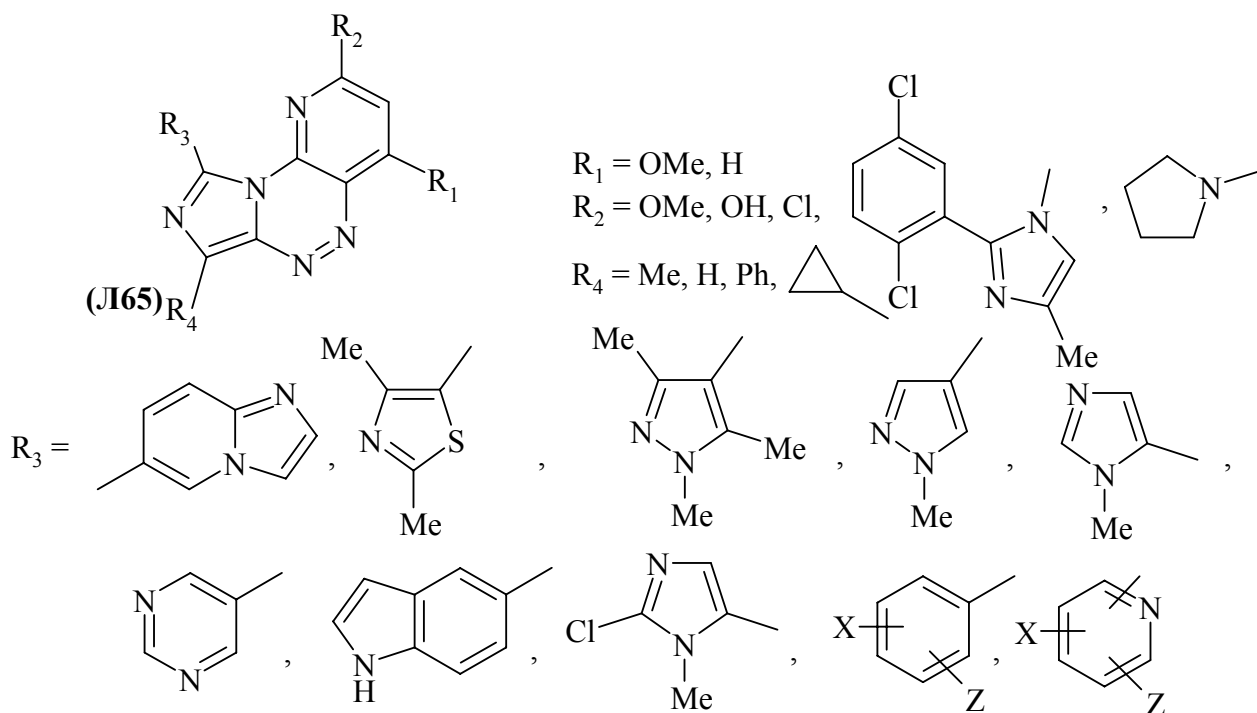
$R_1, R_2 = \text{H, OMe}$
 $R_3 = 2\text{-Me-Ph; 4-F, 2-Me-Ph; 2-Cl-Ph; 2,4-Cl, Cl-Ph; 2-Cl, 4-F-Ph; 2-F, 5-OMe-Ph; 4-Me-3-пиридил; 3-Me-4-пиридил; 2-Me-3-пиридил}$



$R_4 = \text{F, OMe}$
 $R_5 = \text{H, OMe, F, CF}_3, \text{OCF}_2, \text{морфолин}$
 $R_6 = 2\text{-Me-Ph; 2-Cl-Ph; 2-Me-Ph; 2-CF}_3\text{-Ph; 4-Me-3-пиридил; 3-Me-4-пиридил; 2-Me-3-пиридил; 2-OMe-Ph; 3-OMe-Ph; 3-F, 2-Me-Ph; 3,5-Me, Me-N-Me-пириазол; 3-Me-2-тиенил; 2,4-Me, Me-тиазол, 3-F}$

Соединение (**Л64**) с $R_4 = \text{OMe}$, $R_5 = \text{CF}_3$, $R_6 = 3\text{-Me-4-пиридил}$ проявило себя как эффективный ингибитор PDE10A ($\text{IC}_{50} = 1.4 \text{ нМ}$) и продемонстрировало высокую селективность (>200) ингибирования PDE10A по сравнению с другими фосфодиэстеразами. Кроме того, это соединение оказалось эффективным в животных моделях психозов (купирование гиперактивности, индуцированной дизоцилпин малеатом с минимальной эффективной дозой 0.1 мг/кг , условная реакция избегания ($\text{ID}_{50} = 0.2 \text{ мг/кг}$)) [67].

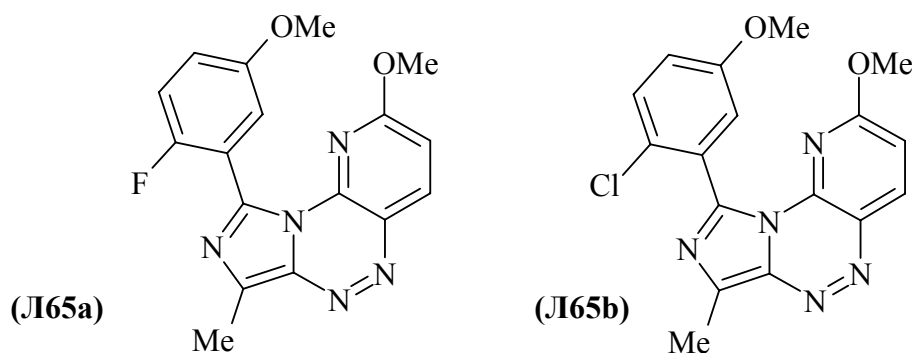
Другими имидазотриазинами, проявляющими ингибирующую активность в отношении фосфодиэстеразы 10, а также фосфодиэстеразы 2, является обширная группа соединений с общей формулой (**Л65**). Данные производные могут применяться для лечения неврологических заболеваний (таких как, например, депрессия, болезнь Альцгеймера), психических расстройств (в т.ч. шизофрении), а также ожирения, диабета 2-го типа, метаболического синдрома, нарушения толерантности к глюкозе, а также более различного происхождения и других расстройств, вызванных гиперактивностью фосфодиэстераз типа 2 или 10.



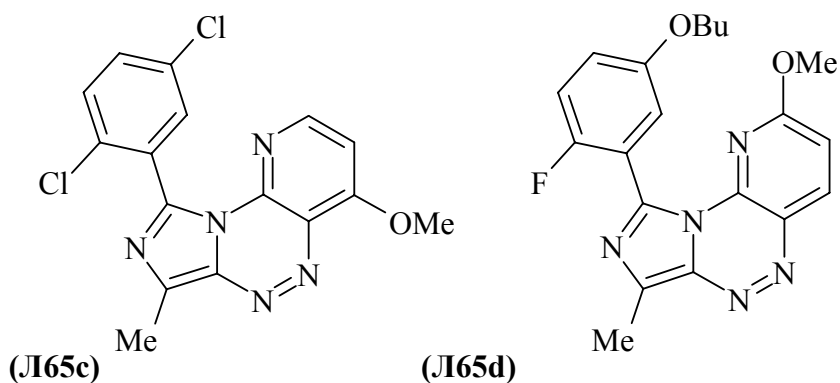
$X = \text{H, Hal, Alk, Alk(Ph)O, NO}_2, \text{NH}_2\text{CO}^-, \text{CN}$

$Z = \text{H, Hal, CF}_3$

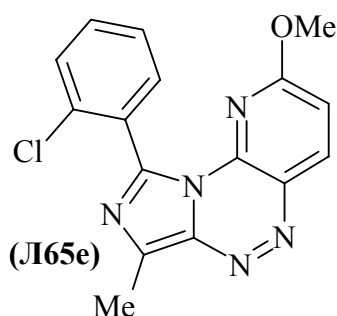
В некоторых примерах соединения (**L165**) могут быть селективными ингибиторами либо PDE 10, либо PDE 2, то есть, эти соединения способны ингибировать активность PDE 10 (или 2) в 10, а то и 100 раз эффективнее, чем другие фосфодиэстеразы. Наибольшую активность показали соединения (**L165a**) ($IC_{50}10A = 9.83 \text{ нМ}$, $IC_{50}2A = 2.99 \text{ нМ}$) и (**L165b**) ($IC_{50}10A = 40.9 \text{ нМ}$, $IC_{50}2A = 2.2 \text{ нМ}$).



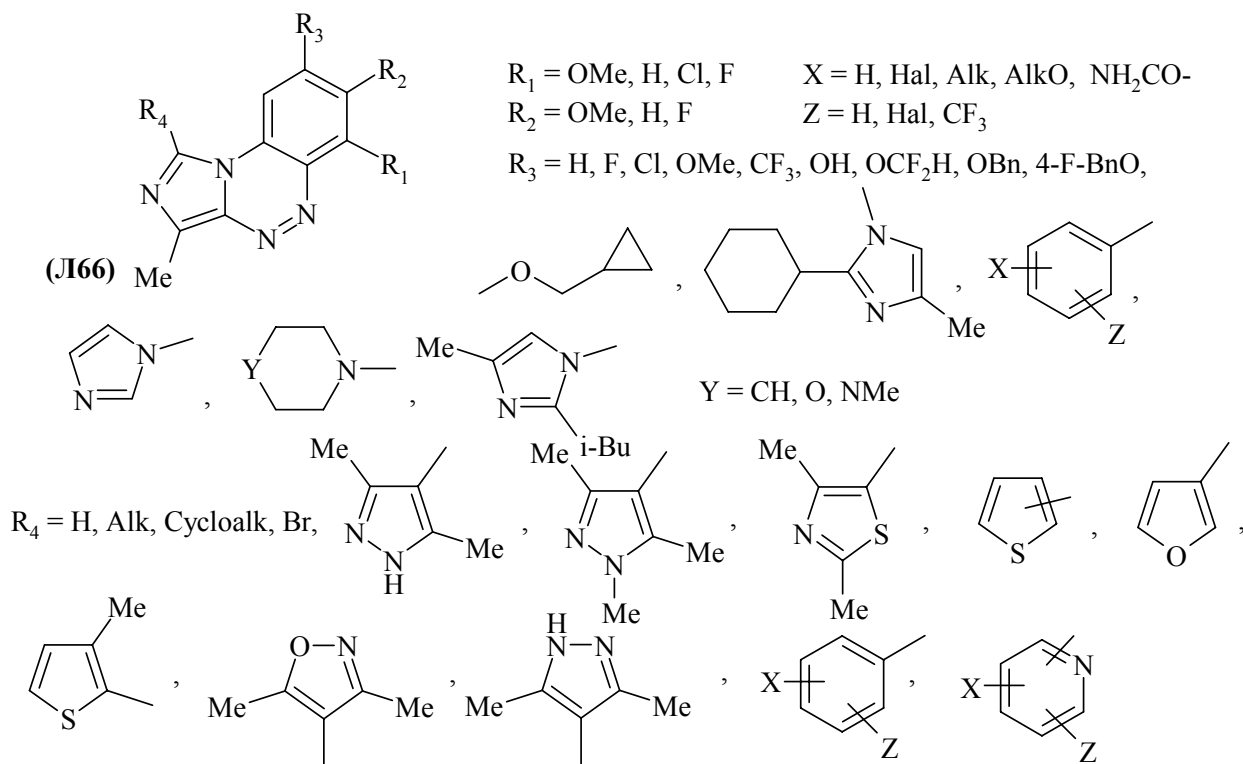
Селективными ингибиторами фосфодиэстеразы 10A и 2A можно считать соединения (**L165c**) ($IC_{50}10A = 3.01 \text{ нМ}$, $IC_{50}2A = 171 \text{ нМ}$) и (**L165d**) ($IC_{50}10A > 500 \text{ нМ}$, $IC_{50}2A = 4.12 \text{ нМ}$) соответственно.



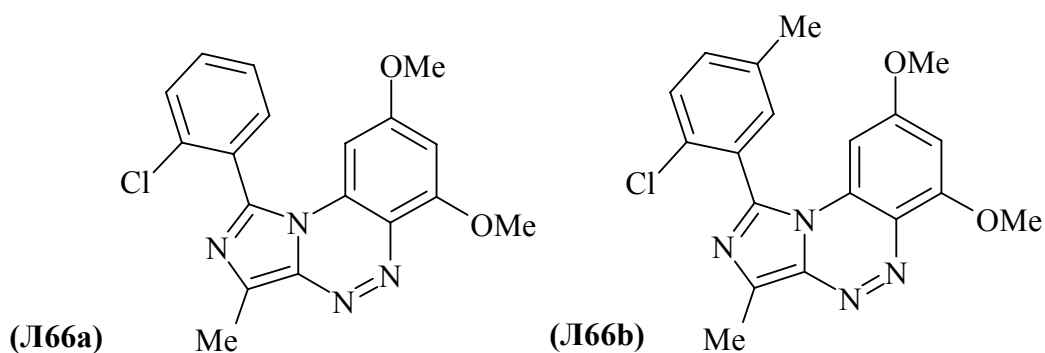
Соединения (**Л165**) показывают значительную антидепрессантную, анксиолитическую активности, а также проявляют эффект улучшения умственных способностей *in vivo*. Наилучшие результаты в тестах *in vivo* продемонстрировало соединение (**Л165е**) [68].



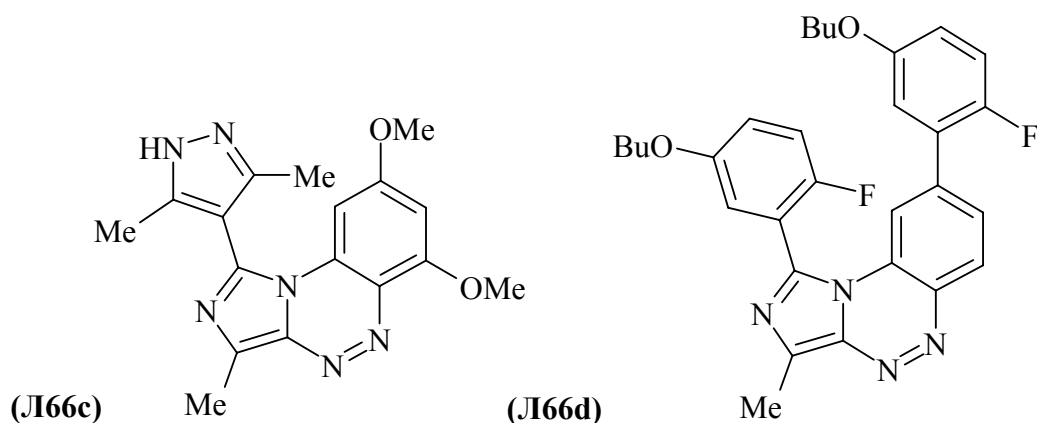
Обширная группа имидазобензотриазинов с общей формулой (**Л166**) проявляет активность, подобную действию своих структурных аналогов (**Л165**), то есть является ингибиторами PDE типа 2 или 10. Они также могут быть селективными ингибиторами либо PDE 10, либо PDE 2.



Наибольшую активность показали соединения (**Л66а**) ($IC_{50}10A = 0.28$ нМ, $IC_{50}2A = 30.3$ нМ) и (**Л66б**) ($IC_{50}10A = 0.73$ нМ, $IC_{50}2A = 47.1$ нМ).

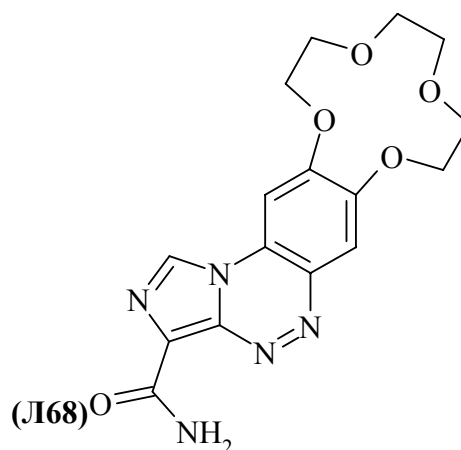
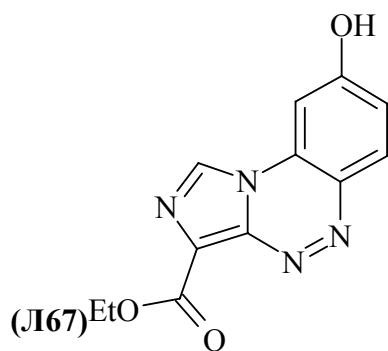


Селективными ингибиторами фосфодиэстеразы 10А и 2А можно считать соединения (**Л66с**) ($IC_{50}10A = 0.7$ нМ, $IC_{50}2A = 210$ нМ) и (**Л66д**) ($IC_{50}10A > 21.6$ нМ, $IC_{50}2A = 0.77$ нМ) соответственно.



Соединения (**Л66**), также как и их структурные аналоги с имидазо-пиридо[2,3-*e*][1,2,4]триазином (**Л65**), демонстрируют значительную антидепрессантную, анксиолитическую активности, а также проявляют эффект улучшения умственных способностей *in vivo* [69].

Другой мишенью для воздействия на нервную систему являются киназы. Так, соединение (**Л67**) является ингибитором киназы 1δ и может применяться для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Количественные данные по ингибирующей активности для соединения (**Л67**) авторами не приведены [70].



Единственным соединением в ряду имидазо[5,1-с][1,2,4] триазинов, проявляющим противомикробную активность, является производное (Л168). Активность определяли по минимальной ингибирующей концентрации подавления роста микроорганизмов на шести культурах: *Bacillus subtilis*, *Planococcus citreus*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* P-209, *Sarcina flora* и *Esherichia coli* M-17. Соединение проявляет противомикробную активность в отношении всех протестированных микроорганизмов, за исключением *Esherichia coli* M-17. Численные значения МИК для соединения (Л168) авторами не приведены [71].

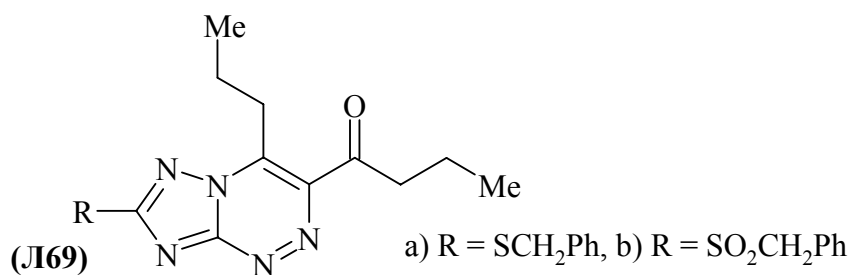
Таким образом, в ряду имидазотриазинов преобладают соединения с ингибирующей активностью в отношении фосфодиэстераз 10 и/или 2, которые могут быть применены в терапии нейродегенеративных заболеваний, включая распространенные болезни Хантингтона и Альцгеймера.

3. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ 1,2,4-ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНЫ

Этот раздел посвящен 1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинам, проявляющим, главным образом, противомикробную и противовирусную активности.

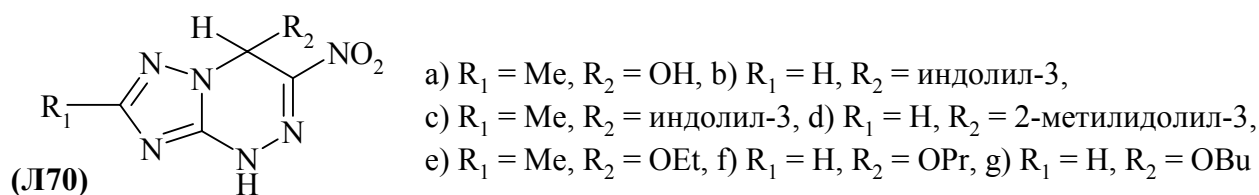
3.1. Антибактериальная и противогрибковая активности

Методом серийных разведений была количественно определена антибактериальная активность *in vitro* для соединений (Л169) в отношении кишечной палочки (*Escherichia coli*), синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*,) и золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), а также противогрибковая активность против *Candida albicans* и *Trichophyton mentagrophytes*. Минимальная ингибирующая концентрация была определена как наибольшее разбавление, при котором соединение прекращает видимый рост микроорганизмов.



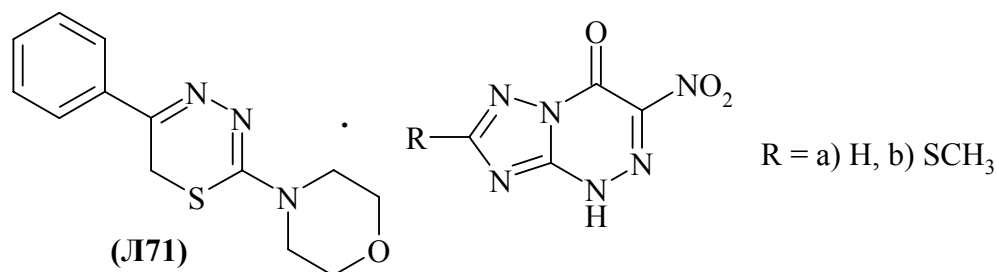
Среди 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (Л69) активность в отношении золотистого стафилококка (МИК = 0.4 μ моль/мл) наблюдается только при R = SCH₂Ph (Л69а). Эта активность теряется при окислении до 7-бензилсульфона (Л69б). Ингибирующее действие в отношении кишечной палочки и синегнойной палочки, а также противогрибковую активность соединения (Л69) не проявляют [15].

Противомикробную активность соединений (Л70) также определяли методом серийных разведений в отношении грамположительных, грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов, дрожжеподобных и фитопатогенных грибов, а также дерматофитов.



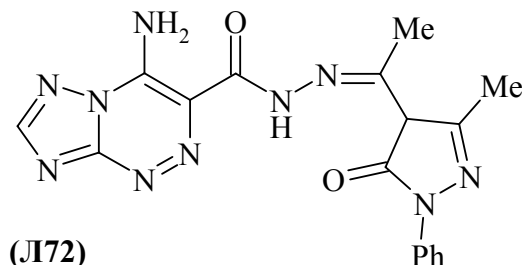
Установлено, что противомикробная активность соединений (Л70) в незначительной степени зависит от заместителя в азольном фрагменте молекулы, а связана, как правило, с заместителем в положении 7. Соединения (Л70) подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Введение остатка индола или спирта увеличивает противостафилококковую активность до 20-50 μ г/мл (Л70с,ф,г) [16].

Бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении возбудителя микоплазма обладают соединения (Л71а,б) в дозах 7.8 мкг/мл и 15.6 мкг/мл соответственно.



В практическом плане соединения (Л71) могут представлять интерес с целью деконтаминации вакцинного сырья для профилактики микоплазма [72].

Другим представителем 1,2,4-триазолотриазинов с противомикробной активностью является соединение (Л172). В качестве сравнения использовался ципрофлоксацин (концентрация 30 мкг/мл). Противомикробную активность (рабочая концентрация 1000 мкг/мл) определяли в отношении грамположительных бактерий: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; и грибов: *Candida albicans*, *Asperigillus nlger*.



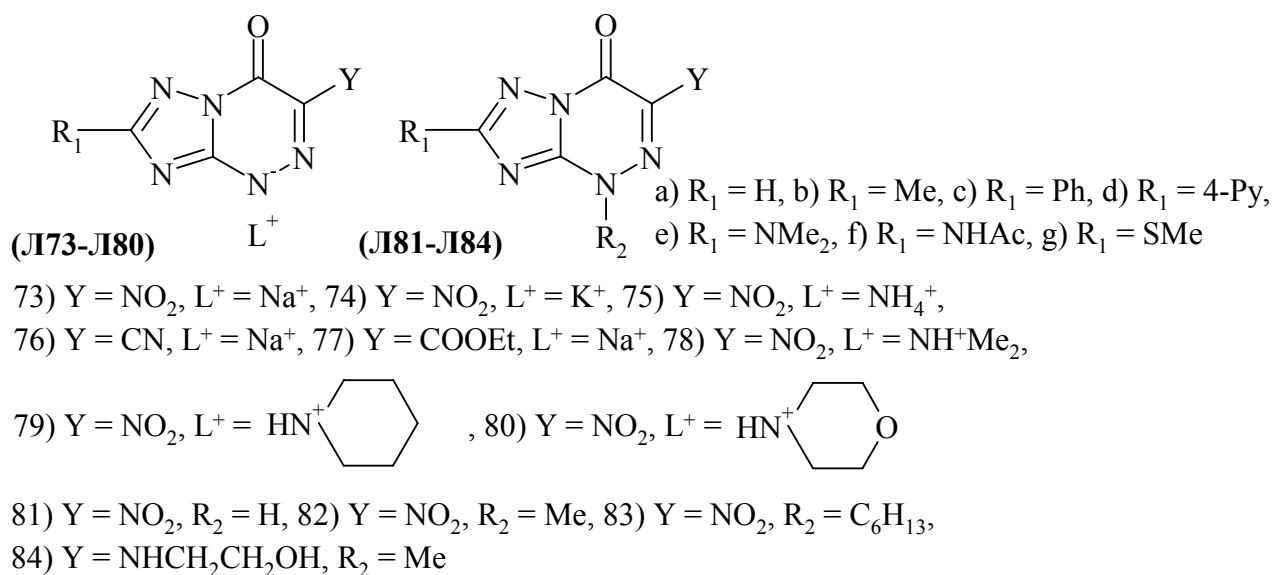
В отношении бактерий для соединения (Л172) наблюдается умеренная активность (зона ингибирования 10-15 мм), для сравнения у ципрофлоксацина зона ингибирования 15-20 мм и >20 мм в отношении грамположительных и грамотрицательных соответственно. В отношении грибов: соединение проявляет слабую активность к *Candida albicans* (зона ингибирования 5-10 мм) и не активно к *Asperigillus nlger*. Соединение сравнения не проявляет противогрибковой активности по отношению к исследуемым штаммам [73].

Наибольшей противомикробной активностью из описанных в данном подразделе производных, обладают соединения, содержащие нитрогруппу в положении 6 молекулы.

3.2. Противовирусная активность

Противовирусной активностью в ряду 1,2,4-триазоло-триазинов обладают соли этих конденсированных гетероциклов, а также ациклические нуклеозиды на их основе. Спектр действия производных весьма обширен, правда, до сих пор не доказан механизм их противовирусного действия.

Действие азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (Л173-Л184) на вирус болезни Ауески было исследовано на культуре клеток куриных фибропластов. Активность соединений оценивали по подавлению репродукции вируса, а также по величине ХТИ. Установлено, что наибольшую активность проявляет натриевая соль триазолотриазина (Л178а), степень ингибирования которой составила 2,00 lg ТЦД₅₀.



Более полная информация, полученная по данным биологических испытаний представлена в таблице 6.

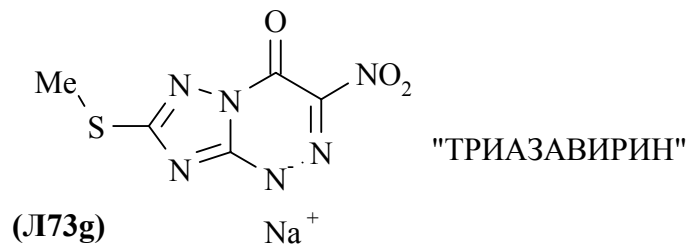
Таблица 6

№ соединения	МПК, $\mu\text{г/мл}$	Степень ингибирования ре-продукции ВБА, $\lg \text{ТЦД}_{50}$	МЭД, $\mu\text{г/мл}$	ХТИ
Л73a	1000	1.25	250	4
Л73b	1000	1.75	250	4
Л73c	100	1.00	100	1
Л73d	125	1.50	25	5
Л73e	1000	1.00	250	4
Л73f	1000	1.00	250	4
Л74a	500	1.00	100	4
Л74b	1000	1.00	500	5
Л75a	1000	1.25	500	2
Л75b	1000	1.00	500	2
Л75e	250	1.50	250	1
Л76a	1000	1.50	250	4
Л77a	1000	1.50	250	4
Л78a	1000	2.00	250	4
Л79a	50	0.75	25	2
Л79b	30	1.00	25	1
Л79g	500	1.00	250	2
Л80a	50	1.00	50	1
Л80b	200	1.00	200	1
Л81a	250	1.00	125	2
Л81b	62	1.00	25	2
Л82a	16	1.00	16	1
Л82b	16	1.25	16	1
Л82g	16	1.00	16	1
Л83a	5	1.75	5	1
Л84b	125	1.25	25	5
Л84g	125	1.25	25	5

Из таблицы 6 видно, что натриевые соли (Л173) являются более активными, чем соответствующие калиевые или аммонийные (Л174, Л175, Л179, Л180). Исключением является диметиламмонийная соль триазолотриазина (Л178). Гетероциклические NH-кислоты (Л181) не обладают значительной активностью в отношении ВБА. Алкилирование по положению N(4) триазолотриазина (Л182-Л184), как и введение других функциональных заместителей вместо нитрогруппы (Л176, Л177) не приводит к значительному увеличению вирусингибирующей способности полученных соединений [74].

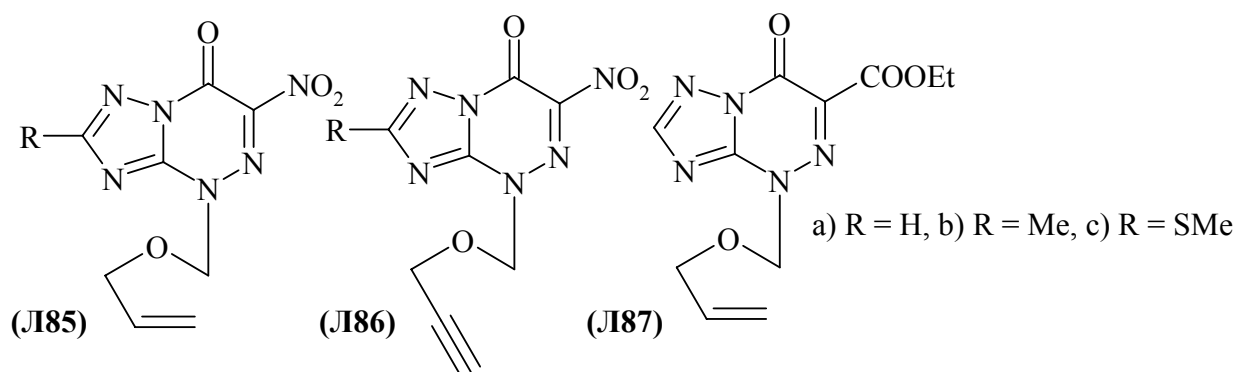
Более того, согласно источнику [75], соединение (Л175g) тормозит репродукцию лихорадки долины Рифта (штамм Энтеббе сем. Буньявириде) в инфицированных культурах клеток почек обезьян Vero на 2 lg БОЕ/0,1 мл (для сравнения Ремантадин-0.2 lg БОЕ/0,1 мл) и защищает 80 % белых мышей от развития этой болезни, вызывающей 100 % гибель животных в контроле *in vivo*. Средняя продолжительность жизни увеличивается с 8.2 дней в контроле до 18.4 дней в опыте. Соединение (Л175g) малотоксично (ЛД₅₀ = 1500 мг/кг и 1000 мг/кг при подкожном и внутримышечном введении соответственно).

Антивирусную активность соединения (Л173g) – противовирусного препарата «Триазавирин» изучали по снижению инфекционного титра вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей штамм 230 (ВЭЛ) и вируса Синдбис в культуре клеток Vero.



«Триазавирин» в концентрации 200, 12.5 мкг/мл снижал инфекционный титр вируса ВЭЛ-230 на 4.0 и 1.9 lg БОЕ/мл соответственно, а инфекционный титр вируса Синдбис (штамм EgA2-339) на 3.9 и 1.8 lg БОЕ/мл соответственно. «Ремантадин» в концентрации 50, 25 мкг/мл снижал инфекционный титр вируса ВЭЛ-230 на 2.0, 1.4 lg БОЕ/мл соответственно. В экспериментах *in vivo* определено значение ЭД₅₀, который как для ВЭЛ-230, так и для Синдбис составил 10 мг/кг для «Триазавирина» и 25 мг/кг для «Ремантадина». ХТИ (химиотерапевтический индекс) «Триазавирина» составил 20, а соединения-сравнения «Ремантадина» - 2. Кроме того, «Триазавирин» защищает от инфекций, вызываемых вирусами лихорадки долины Рифт, активно в отношении вируса западного энцефаломиелита лошадей, парагриппа, респираторно-синцитиального вируса, инфекционного ларинготрахеита птиц, вируса гриппа птиц, всего более 10 РНК и ДНК содержащих вирусов, при этом обладая низкой токсичностью (ЛД₅₀ = 1400 мг/кг) [2].

Изучение противовирусного действия нуклеозидных аналогов на основе 1,2,4-триазоло-триазины в отношении вирусов гриппа типов А (H3N2), А (H5N1), и А (H0N1) (Ремантадин-резистентных штаммов), а также типа В, показало, что соединения (**85a-c**) и (**Л86a-c**) обладают активностью сравнимой с активностью Ремантадина против гриппа А и превышает его в действие в отношении вируса гриппа В. Что касается модифицированных нуклеозидов (**Л85a,b**) (особенно, (**Л85b**)), дальнейшее изучение показало, что они активны против Ремантадин-резистентного штамма гриппа А (H0N1) и значительно снижают репродукцию вируса гриппа типа В, в отношении которого Ремантадин является неактивным.



Определение противовирусного действия соединений (**Л85**) и (**Л86**) по отношению к респираторно-синцитиальному вирусу продемонстрировало ингибирующее действие 4-аллилоксиметил-6-этоксикарбонил- (**Л87**) и 6-нитро-4-пропаргилоксиметил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4] триазинов (**Л86a-c**). Эти препараты снижают инфекционную активность вируса не менее чем на 1.85 logID₅₀ (67%) (соединение (**Л87**)), 1.7 logID₅₀ (56%) (соединение (**Л86a**)), 1.1 logID₅₀ (34%) (соединение (**Л86b**)), и 1.0 logID₅₀ (22%) (соединение (**Л86c**)). Ремантадин не проявляет противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса *in vitro*. Данные по противовирусно активности соединений (**Л85**) и (**Л86**) сведены в таблицу 7 [76].

Таблица 7

Соед.	Конц. С, мг/мл	Снижение титра вируса, Δ, log ID ₅₀					
		В/ /Samara/ 253/99	А/Н3N2 А/Hong Kong /1/68	А/Н3N2 А/St.- Petersburg/ 22/99	А/Н5N1 А/Duck/ Singapore R/F 119- 3/97	А/Н5N1 А/Mongolia/ 56/87	А/Н5N1 А/PR/8/34
Л85a	20	2.5**	0.5*	ND	1.5**	2.5*	2.5*
	40	2.5**	2.0**	ND	3.0***	3.0***	4.0***
Л85b	20	1.0*	0.5*	ND	1.5*	2.5**	2.5**
	40	2.5**	2.0**	ND	3.0***	3.0***	4.0***
Л85c	20	2.5**	2.0**	ND	2.5**	4.0***	2.5**
	40	3.0***	2.5**	ND	3.0***	4.0***	4.0***
Л86a	20	ND	ND	3.0	ND	ND	ND
	40	ND	ND	4.0	ND	ND	ND

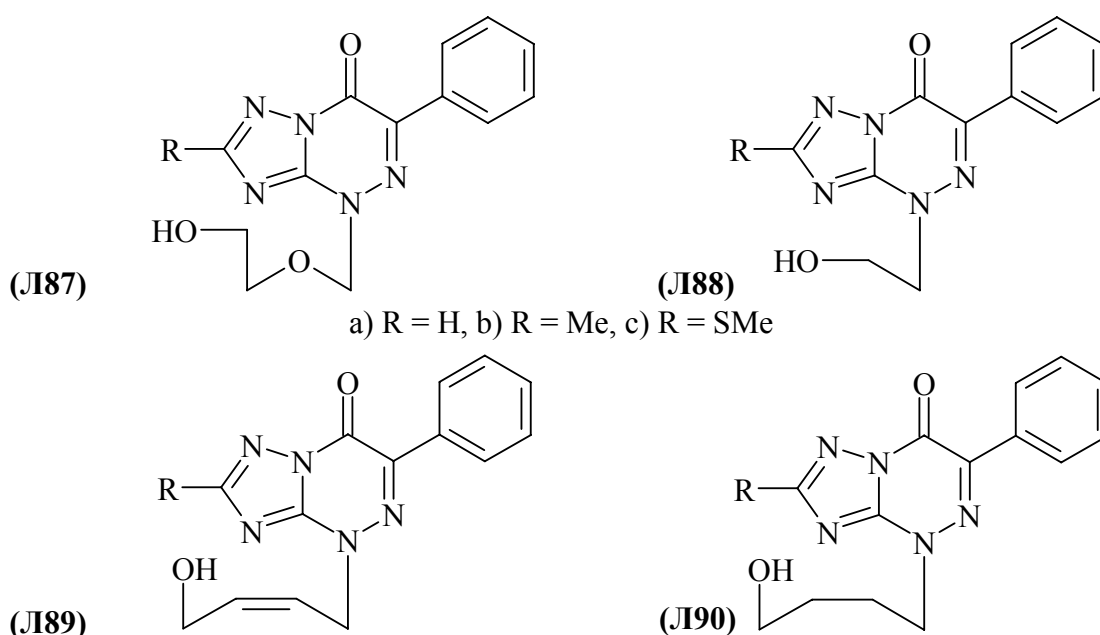
Проложение таблицы 7

Л86b	20	ND	ND	2.9	ND	ND	ND
	40	ND	ND	4.0 ^{***}	ND	ND	ND
Л86с	20	ND	ND	2.6 ^{**}	ND	ND	ND
	40	ND	ND	4.0 ^{***}	ND	ND	ND
Реманта- дин	20	0	2.5 ^{**}	2.9 ^{**}	3.0 ^{***}	0	1.0 [*]
	40	0.5 [*]	2.5 ^{**}	3.3 ^{***}	3.0 ^{***}	1.5 [*]	1.5 [*]
Исх. титр вируса		4.5	3.5	5.1	4.01	5.01	5.5

ND-не определено

*-слабая активность, ** -умеренная активность, *** -высокая активность

Противогерпетические свойства нуклеозидных аналогов на основе 6-фенил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (**Л87-Л90**) были изучены в культуре клеток Vero, инфицированных вирусом простого герпеса типа 1 (HSV-1). Как видно из таблицы 7, структура соединений влияет на их активность. Соединения (**Л87**), содержащие 2-гидроксиэтоксиметильную группу, ингибируют репликацию вируса на 50% в концентрациях, превышающих 250 μM . В то же время для соединений (**Л89**), несущих фрагмент гидроксIBUTЕНА, 50%-ное ингибирование наблюдали при концентрации 15-30 μM и эти соединения продемонстрировали высокий индекс селективности в двух тестируемых значениях БОЕ/клетка.



Следует отметить, что все соединения (**Л87-Л90**) показали низкую токсичность *in vitro*. Их токсичность была сопоставима с токсичностью противовирусных препаратов «Ацикловир» или «Ганцикловир», хотя индекс селективности был ниже, чем у «Ацикловира» или «Ганцикловира» в связи с меньшей противовирусной активностью. Данные по противовирусной активности соединений (**Л87-Л90**) сведены в таблицу 8.

Таблица 8

Соед.	Цитотокс. до- за, CD ₅₀ (мМ)	Множественность инфекции			
		0.1 БОЕ/клетка		0.01 БОЕ/клетка	
		ID ₅₀ (мМ)	Индекс селек- тивности	ID ₅₀ (мМ)	Индекс селек- тивности
Л87а	0.5	0.25	2	ND	ND
Л87б	>0.5	0.5	>1	ND	ND
Л87с	>0.5	0.25	>2	ND	ND
Л88а	>0.5	0.25	>2	ND	ND
Л88б	>1	0.12	>8.3	0.06	≥16.7
Л88с	>0.5	0.12	>4	0.03	≥16.7
Л89а	>0.5	0.25	>2	ND	ND
Л89б	0.95	0.03	32	0.015	63
Л89с	0.53	0.015	35	≥0.007	≤76
Л90а	1.13	0.12	9.3	0.07	16
Л90б	≥0.98	0.06	16.3	0.03	≥32
Л90с	≥0.5	0.06	>8	0.03	≥16

ND-не определено

Предположительным механизмом действия показанных выше нуклеозидов является ингибирование синтеза вирусной ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой - ключевого фермента вирусной репликации. Поэтому были синтезированы трифосфаты (**Л91а,с**) и (**Л92б**), которые были исследованы в бесклеточном эксперименте как ингибиторы ДНК полимеразы простого вируса герпеса.

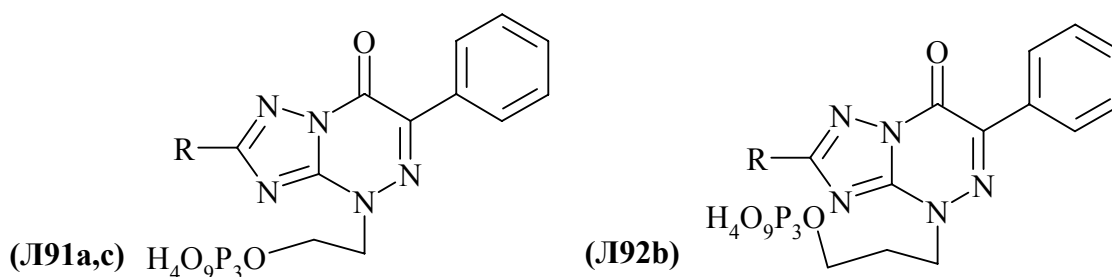


Таблица 9*

Соединение	Концентрация (μМ.)
Л91а	160±28
Л91с	100±18
Л92б	150±25
Трифосфат ацикловира	30±6
Фоскарнет	10±2

*50% ингибирование включения $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dAMP}$, катализируемого ДНК-полимеразой HSV в праймер-матричный комплекс в присутствии (**Л91а,с**), (**Л92б**), «Фоскарнета» и трифосфата «Ацикловира». (Данные трех независимых экспериментов)

Как видно из таблицы 9, соединение (**Л91с**), несущее метилтиогруппу, более эффективно ингибирует включение $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dAMP}$ в 3'-сайт праймер-матричного комплекса, чем (**Л91а**). Эти данные коррелируют с результатами ингибирования репликации вируса *in vitro* (табл. 9). Трифосфат антигерпетического препарата «Ацикловир», как хорошо из-

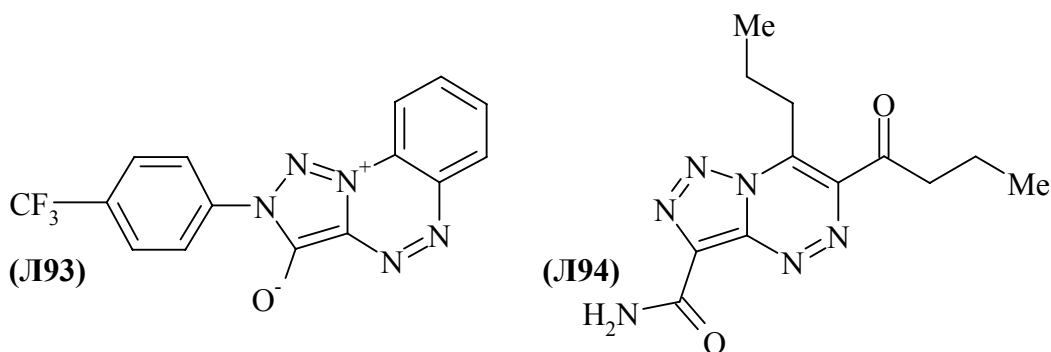
вестный ингибитор ДНК-полимеразы HSV и «Фоскарнет» были использованы в качестве контроля и подавляли активность полимеразы более эффективно по сравнению с синтезированными соединениями (**Л91a,c**) и (**Л92b**). Следует отметить, что соединения, лишенные трифосфата или N-ациклического фрагмента с концевой гидроксильной группой не ингибируют вирусную ДНК-полимеразу. 50% ингибирование фермента не было достигнуто в концентрациях, превышающих 800 μM [77].

Противовирусные 1,2,4-триазоло[5,1-*c*]триазины обладают широким спектром активности и, как и противомикробные, наибольшей активностью обладают соли и нуклеозиды на основе молекул, содержащих в положении 6 нитрогруппу, играющую, очевидно, ключевую роль в метаболизме этих соединений.

4. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ 1,2,3-ТРИАЗОЛО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНЫ

Этот раздел посвящен 1,2,3-триазоло-[5,1-*c*][1,2,4]триазинам. Данные соединения не так широко представлены, как описанные выше другие азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины, поэтому данный раздел представлен всего двумя примерами.

1,2,3-триазоло-триазин (**Л93**) обладает противовоспалительной и противоаллергической активностями и может применяться для лечения астмы, бронхитов, ринитов, хронических аллергических расстройств, а также может использоваться для профилактики данных заболеваний. Биологические испытания показали, что соединение (**Л93**) проявляет активность в тестах на хроническую реакцию «трансплантат против хозяина» и на ингибирование эозинофилии с ED_{50} в диапазоне 0.1-10 мг/кг [78].



Другое производное 1,2,3-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина (**Л94**) обладает активностью в отношении *Staphylococcus aureus* с минимальной ингибирующей концентрацией 0.4 $\mu\text{mol/ml}$ [15].

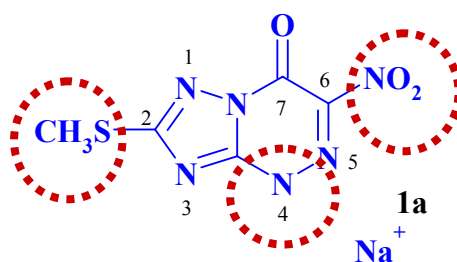
В заключение хотелось бы отметить, что хотя установление взаимосвязи между строением и активностью азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов на основании данного обзора не определить, но, тем не менее, прослеживаются общие тенденции в разных классах этих соединений, на основании которых можно создавать производные с заранее ожидаемой активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ «ТРИАЗАВИРИНА»

Данная глава посвящена исследованию влияния функциональных групп в молекуле «Триазавирина» на его противовирусную активность. Для выявления структурных фрагментов лекарственного препарата, существенных для его биологического действия, необходимы соединения - аналоги, в которых одна или несколько функциональных групп исходной структуры заменены другими или модифицированы. Исследования активности соединений в исследуемом ряду позволяют определить молекулярные фрагменты, определяющие действие базового соединения.

Молекула «Триазавирина» содержит 7 атомов обода гетероциклической структуры, мостиковый атом N(7a) и три функциональные группы: C(2)-SMe, C(6)-NO₂ и C(7)=O. В работе рассмотрены структурные модификации, затрагивающие положения C(2), C(6) и N(4) в молекуле 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина.



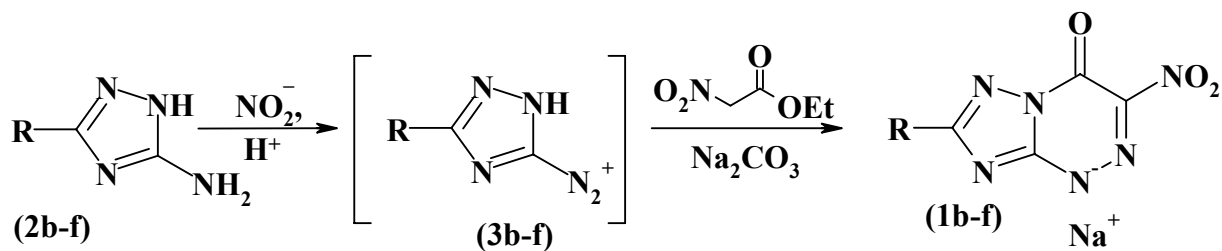
Исследование взаимосвязи «структура-активность» играет важную роль не только в процессе установления механизма действия препарата – определение биологической мишени, но и может быть полезным для дальнейшего направленного поиска соединений с заданной активностью.

1.1.1. Модификации по второму положению молекулы «Триазавирина»

Исследование влияния метилсульфанильной группы на противовирусное действие «Триазавирина» в первом аспекте предполагает установление роли метильной группы. Два других варианта предполагают установление роли атома S⁻² и собственно алкилтио-группы (см. ниже).

Первым этапом исследования стала разработка методов синтеза 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов. Метод синтеза, разработанный для «Триазавирина» [2], оказался применим и для ближайших гомологов. Так, взаимодействие (5-амино-1,2,4-триазол-3-ил)диазония (3) с этилнитроацетатом в присутствии карбоната

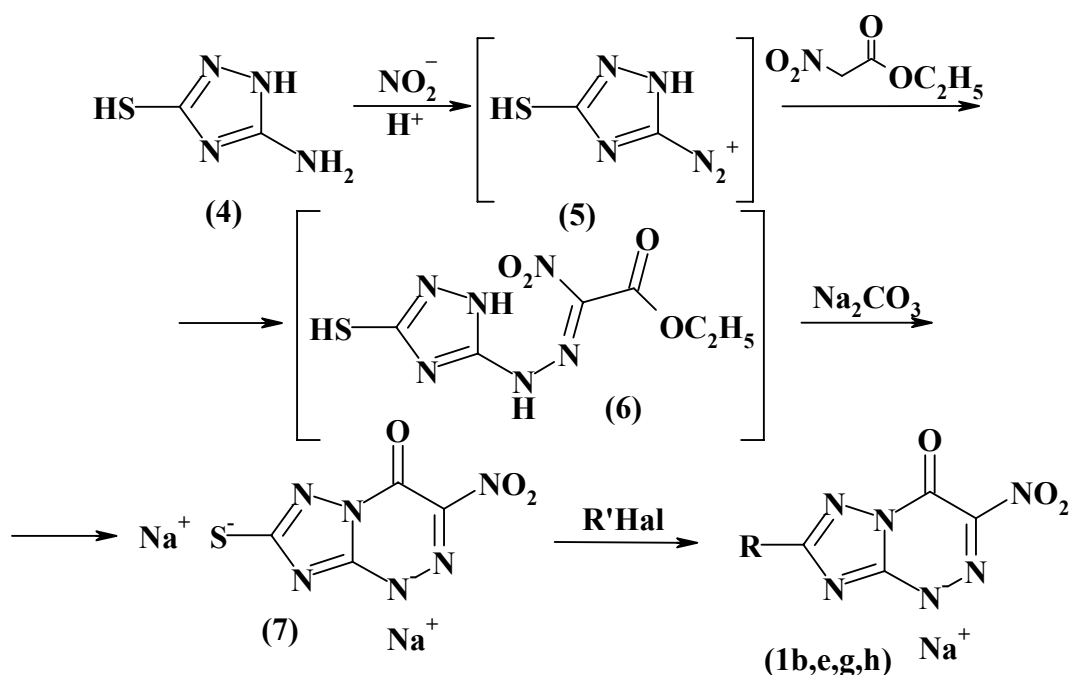
натрия приводит к образованию 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (**1b-f**) с выходами 49-69 %.



R = b) EtS, c) PrS, d) *i*-PrS, e) BuS, f) EtCO₂CH₂S

Однако применимость такого способа синтеза ограничивается низшими членами ряда (C₂-C₄, **1b-f**), для более высоких гомологов выходы продуктов не превышают 10 %, что обусловлено чрезвычайно низкой растворимостью исходных 3-алкилтио-5-амино-1,2,4-триазолов и солей 3-алкилтио-1,2,4-триазол-5-ил-дизония (**3**) в реакционной среде. Результатом этого явилось протекание диазотирования лишь в незначительной степени с выделением из реакционной массы непрореагировавших 3-алкилтио-5-амино-1,2,4-триазолов (**2**).

В качестве альтернативного пути синтеза 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов был разработан метод с использованием иминотиоуразола в качестве исходного соединения. Синтетическая схема включает три стадии: диазотирование иминотиоуразола, азосочетание и циклизацию с образованием динатриевой соли 2-меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она, и последующее ее алкилирование с образованием целевых продуктов (**1**).



R = b) C₂H₅S, e) C₄H₉S, g) C₇H₁₅S, h) C₁₂H₂₅S

Оказалось, что образующаяся соль (**7**) чрезвычайно легко растворима в воде, поэтому проведение реакции азосочетания с использованием раствора карбоната натрия не

приводит к выделению целевого продукта (7) со сколько-нибудь значительным выходом. Поэтому нами был разработан метод, заключающийся в добавлении этилнитроацетата к соли диазония с последующим доведением реакционной массы до pH 9-10 насыщенным раствором гидроксида натрия, который предварительно охлаждают до 0°C во избежание гидролиза этилнитроацетата. Динатриевую соль триазолотриазина (7) получают в виде стабильного тригидрата. Алкилирование синтезированной соли (7) галоидными алкилами с образованием 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (**1b,e,g,h**) успешно протекает при комнатной температуре в метаноле или ДМФА в течение часа.

В ¹H ЯМР спектрах натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (1) присутствуют сигналы протонов S-алкильного фрагмента. По сравнению с исходными триазолами (2) протоны фрагмента S-C-H незначительно смещены в слабое поле.

В ИК спектрах натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (1) видны сильные полосы поглощения в области 1660-1680 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы, а также парные полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям нитрогруппы (1320-1360 см⁻¹, симметричные колебания и 1520-1560 см⁻¹, асимметричные колебания).

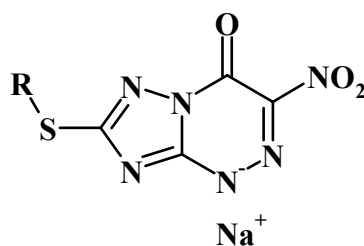
Данные элементного анализа показывают, что все натриевые соли (1) существуют в форме стабильных дигидратов.

1.1.2. Биологическая активность гомологов «Триазавирина» in vitro. Сравнение противовирусной активности «Триазавирина» и его гомологов*

Данные биологической активности некоторых гомологов «Триазавирина» представлены в таблице 10. Постановка эксперимента по определению минимальной токсической дозы и противовирусной активности описана в экспериментальной части.

* Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Таблица 10. Данные противовирусной активности гомологов «Триазавирина» *in vitro*.



№	R	МТД, мкг/мл	Противовирусная активность
7	Na ⁺	1000	Вирус А/Виктория/35/72 А(Н3N2) 250 мкг/мл снижение титра вируса 1.0 lg
1b	C ₂ H ₅	1000	Вирус А/Виктория/35/72 А(Н3N2) 250 мкг/мл снижение титра вируса 1.0 lg
1c	C ₃ H ₇	1000	Вирус А/Виктория/35/72 А(Н3N2) 100 мкг/мл снижение титра вируса 1.0 lg А/PR/8/34 1.0 lg
1e	C ₄ H ₉	1000	Вирус А/Виктория/35/72 А(Н3N2), А/PR/8/34 100мкг/мл снижение титра вируса 0 lg
1g	C ₇ H ₁₅	токсичен до 40 мкг/мл	не активен
1h	C ₁₂ H ₂₅	токсичен до 40 мкг/мл	не активен

Как видно из таблицы 10, низшие алкилтриазолотриазины, как и «Триазавирин», обладают невысокой противовирусной активностью, а при переходе к высшим представителям ряда активность исчезает, что можно объяснить их гидрофобностью, а также резко возрастает цитотоксичность соединений.

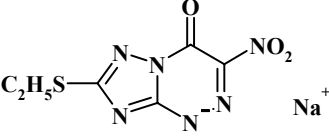
Стоит также отметить, что при увеличении длины углеводородной цепи при атоме серы (C₂-C₄) противовирусное действие гомологов «Триазавирина» в отношении некоторых вирусов возрастает (таблицы 11 и 12) по сравнению с активностью препарата.

Изучение противовирусной эффективности соединения (1b) в отношении вируса Западного Нила проводили на культуре клеток GMK-АН-1(Д). Для изучения противовирусной эффективности препарат вводили в поддерживающую среду через 1 час после инфицирования. На каждую дозу препарата использовали не менее 4 пробирок с монослоем культуры клеток двухсуточного возраста. Инфицирующая доза вируса составила 0.01 БОЕ/кл. После адсорбции вируса в течение 60 мин при температуре 36.5÷37.5°C монослой трижды промывали питательной средой ПС-4 на растворе Хенкса, содержащей 2% сыворотки КРС и по 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, затем вносили свежую среду, содержащую исследуемые дозы препарата, и инкубировали в течение 2 суток при температуре 36.5÷37.5°C. По окончании инкубации клетки разрушали криодеструкцией. Уровень накопления возбудителя в пробах определяли титрованием проб методом получения

негативных колоний вируса в монослое клеток ОМК-АН-1(Д) под твердым агаровым покрытием. Результаты испытаний приведены в таблице 11. «Триазавирин» не проявляет ингибирующего действия в отношении вируса Западного Нила.

Оценку противовирусной эффективности заявляемого соединения в отношении возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) осуществляли с использованием культуры клеток ГМК-АН-1(Д) при инфицирующей дозе вируса 0,01 БОЕ/кл. Результаты испытаний также приведены в таблице 11.

Таблица 11. Сравнение противовирусной активности «Триазавирина» и 2-этилтиотриазолотриазина (**1b**) по отношению к вирусу Западного Нила и ТОРС *in vitro*

Соединение	Доза, мкг/мл	Вирус Западного Нила		Вирус ТОРС		Вируса гриппа H5N1	
		Δ lg	КИ, %	Δ lg	КИ, %	Δ lg	КИ, %
Триазавирин	100	0	0	0.1	18.8	1.5	90
 (1b)	100	0.5	68.8	0.8	84.4	2.7	99.8

Изучение противовирусной эффективности соединений (**1a**) и (**1b**) в отношении вируса гриппа подтипа H5N1 проводили в культуре клеток MDCK. В качестве инфицирующего препарата использовали аллантоисную жидкость инфицированных развивающихся куриных эмбрионов с биологической активностью 6.5 lg ЦПД₅₀/мл. Для изучения противовирусной эффективности препарат вводили в поддерживающую среду через 1 час после инфицирования. На каждую дозу препарата использовали не менее 10 пробирок с монослоем культуры клеток двухсуточного возраста. Инфицирующая доза вируса составила 0.1 ЦПД₅₀/кл. После адсорбции вируса в течение 60 мин при температуре (37.0±5)°C монослой трижды промывали питательной средой ПС-4 на растворе Хенкса, содержащей 2% сыворотки КРС и по 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, затем вносили свежую среду, содержащую исследуемые дозы препарата, и инкубировали в течение 3 суток при температуре 36.5÷37.5°C. По окончании инкубации оценивали цитопатический эффект, вызванный вирусом, титрованием проб по гибели развивающихся куриных эмбрионов. При уровне накопления вируса 4,3 lg ЭЛД₅₀/мл уровень подавления репродукции вируса составил 2,7 Δ lg (КИ 99.8%).

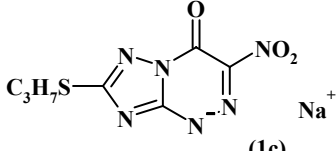
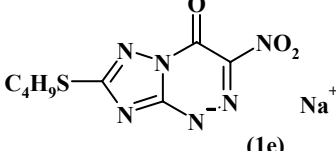
Для определения противовирусной активности соединений (**1c,e**) в отношении вируса простого герпеса использовали монослойные 24-часовые культуры перевиваемых клеток почек зеленой мартышки Vero. В работе использовали вирус простого герпеса (ВПГ-1), штамм ЕС. Максимальные переносимые концентрации соединений определяли с помощью МТТ-теста в культуре клеток Vero.

Исследование максимальной переносимой концентрации для соединений (**1c,e**) и «Триазавирина» показали, что цитотоксичность одинакова и составляет 1000 мкг/мл, что позволяет квалифицировать их как малотоксичные соединения.

Изучение противовирусной активности соединений в отношении вируса простого герпеса проводили на 96-луночных полистирольных микропланшетах на клеточных линиях Vero. Результаты оценивали через 72 часа культивирования зараженных клеток по степени цитопатического действия, вызываемого вирусом:

В таблице 12 приведены данные по противовирусной активности соединений (**1c,e**) и «Триазавирина» в отношении вируса простого герпеса (ВПГ-1).

Таблица 12. Сравнение противовирусной активности «Триазавирина» и его 2-пропилтио- и 2-бутилтио-гомологов (**1c,e**) по отношению к ВПГ-1

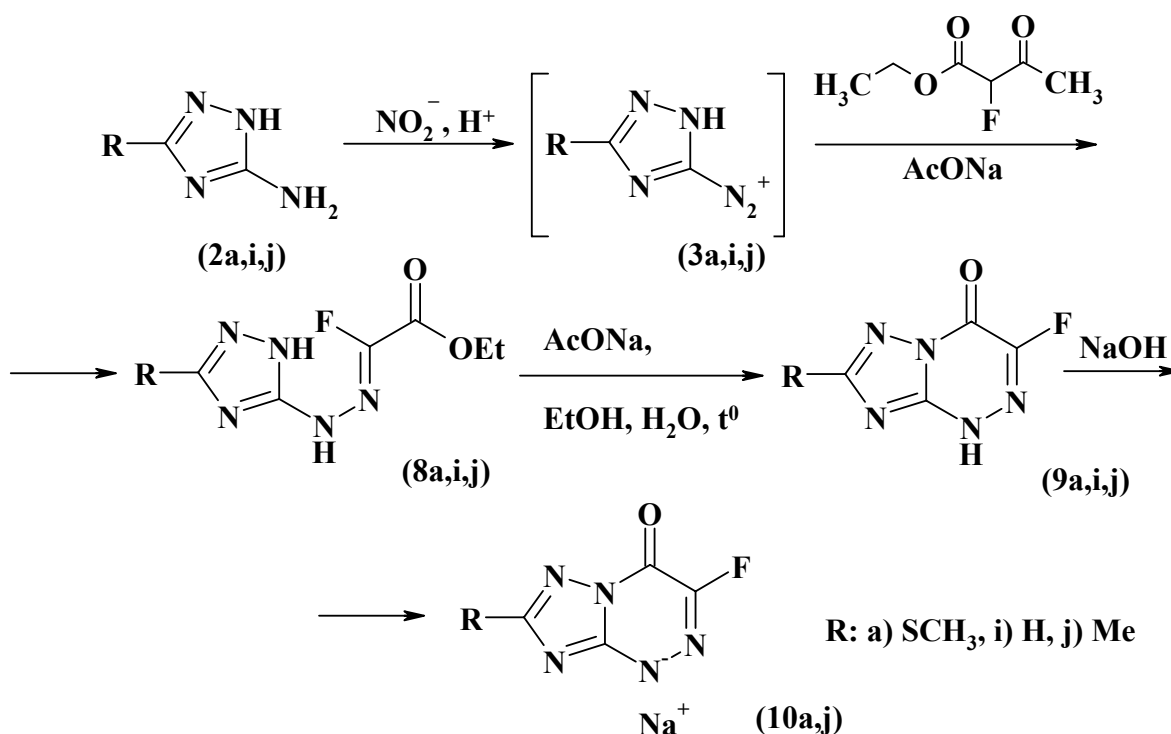
Соединение	Доза, мкг/мл	Концентрация ВПГ-1 Ig (ТЦД50)/мл
Триазавирин	1000	60 %
 (1c)	500	0 %
 (1e)	500	0 %

Из данных, приведенных в таблице 12, видно, что «Триазавирин» практически не активен в отношении вируса простого герпеса (ВПГ-1) при концентрации вируса 3 Ig (ТЦД50)/мл даже в максимально переносимой концентрации (1000 мкг/мл). В то же время, соединения (**1c,e**) в меньшей концентрации (500 мкг/мл) полностью подавляют цитопатическое действие вируса простого герпеса (ВПГ-1), то есть являются более активными противовирусными соединениями по сравнению с «Триазавирином».

1.2.1. Модификации по шестому положению молекулы «Триазавирин»

Второй функциональной группой, которая может определять биологические свойства препарата «Триазавирин», является нитрогруппа в шестом положении молекулы. Для определения влияния этой функциональной группы на противовирусную активность нами были получены 6-фтор-триазолотриазины, отличающиеся от «Триазавирин» наличием атомом фтора вместо нитрогруппы.

Синтез 6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов (**9**) был осуществлен с использованием реакции Яппа-Клингеманна [79] - азосочетанием солей 1,2,4-триазолил-3-дiazония (**3a,i,j**) с этил 2-фторацетоацетатом, с последующими дезацетилированием и циклизацией. Собственно алкилфторацетаты не вступают в реакции азосочетания из-за пониженной СН-кислотности, поэтому нами был использован метод активации фторсодержащего синтона ацетильной группой, легко уходящей в условиях азосочетания.

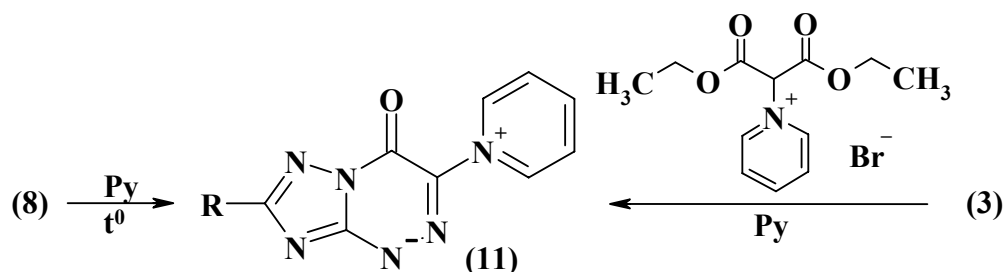


Стадия азосочетания протекает с образованием 1,2,4-триазолилгидразонов этилового эфира фторглиоксалевоы кислоты (**8**) в присутствии ацетата натрия. В спектрах ^1H ЯМР синтезированных соединений (**8**) присутствуют сигналы протонов, принадлежащих фрагменту R, а также уширенные сигналы протонов NH групп (δ 10,8÷11,3 и 13,2÷13,3 м.д.) и мультиплеты протонов этоксикарбонильной группы (δ 4,26÷4,30, 2H, кв. и 1,35÷1,37 м.д., 3H, т.).

Для циклизации гидразонов (**8**) оказалось недостаточно выдержки в растворе карбоната натрия – условий, характерных для превращений тригидразонов, полученных с участием ацетоуксусного и малонового эфиров [80]. Гидразоны (**8**) остаются практически

неизменными и в более жестких условиях, например, при нагревании в спиртовом растворе едкого натра, уксусной кислоте, ДМФА и ДМСО. Удобным методом превращения фторсодержащих гидразонов (8) в 6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оны (9) оказалось кипячение в водно-спиртовом растворе ацетата натрия. Спектры ^1H ЯМР фтор-триазолотриазинов (9) представлены лишь резонансными сигналами протонов группы R. В спектре ^{19}F ЯМР соединений (9) присутствует сигнал в области $-114,3 \div -115,6$ м.д., свидетельствующий о присутствии в молекуле синтезированных соединений атома фтора. Натриевые соли некоторых 6-фтортриазолотриазинов (10) были получены обработкой соответствующей NH-кислоты (9) гидроксидом натрия.

Попытка получить соединения (9) кипячением в пиридине [80] привело к получению продукта двух процессов – нуклеофильного замещения фтора и циклизации с образованием 2-R-6-пиридиний-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оната (11).



Кроме того, цвиттер-ион (11) был получен встречным синтезом, состоящим во взаимодействии соли триазолилдиазония (3) с бромидом диэтил пиридиниймалоната в присутствии пиридина. В спектре ^1H ЯМР соединений (11) присутствуют сигналы, принадлежащие протонам группы R, а также мультиплетные сигналы протонов пиридиниевого фрагмента.

1.2.2. Данные биологической *in vitro* активности 6-фтор-триазолотриазинов, сравнение с «Триазавирином»[†]

Исследования проводились на первичной культуре клеток почек собаки (MDCK). Для оценки противовирусной активности препаратов использовали референс-вирус А(Н1N1) А/Брисбен/59/07. Данный штамм обладает достаточной гемагглютинирующей (1:128) и инфекционной активностью (6.5 lg ИД 50/20 мкл).

Изучение токсичности препаратов. Клетки MDCK сеяли в 96-луночные планшеты и культивировали при 37°C в среде MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота до состояния монослоя. Из исследуемых препаратов готовили маточные растворы концентрации 10 мг/мл в диметилсульфоксиде, после чего готовили серию двукратных разведений препаратов в среде MEM от 500 до 1,92 мкг/мл. Растворенные препараты вно-

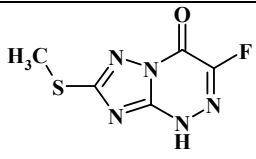
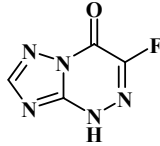
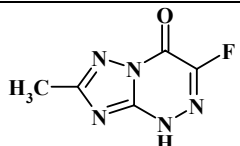
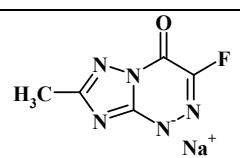
[†] Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

сили в лунки планшетов и инкубировали 48 часов при 37°C. Степень повреждения клеточного монослоя оценивали визуально.

На основании полученных данных определяли минимальную токсическую (1000 мкг/мл) и рабочую дозу исследуемых соединений.

Определение противовирусной активности «Триазавирина» и 6-фторпроизводных (**9a,i,j** и **10j**) в отношении вируса гриппа А(Н1N1) А/Брисбен/59/07 проводили на клетках MDCK в 96-луночных планшетах для клеточных культур. Из исходной вирусосодержащей аллантаоисной жидкости готовили серию десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-7} и вносили в соответствующие лунки с клеточным монослоем. После часового контакта при 36-37°C в лунки добавляли препарат в рабочей концентрации. Результаты учитывали через 48 часов по реакции гемагглютинации (ГА) со взвесью 0,5% куриных эритроцитов. Вирусингибирующее действие препарата оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем. Результаты исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13. Данные противовирусной активности 6-фтортриазолотриазинов (**9a,i,j** и **10j**) и «Триазавирина» в отношении вируса гриппа А(Н1N1) А/Брисбен/59/07

№	Соединение	МТД, мкг/мл	Данные по активности
1a	Триазавирин	1000	А Брисбен/59/07(Н1N1) 50 мкг/мл – 0.5 lg
9a		1000	А Брисбен/59/07(Н1N1) 50 мкг/мл – 0.1 lg
9i		1000	А Брисбен/59/07(Н1N1) 50 мкг/мл – 0.1 lg
9j		1000	А Брисбен/59/07(Н1N1) 50 мкг/мл – 0.5 lg
10j		1000	А Брисбен/59/07(Н1N1) 50 мкг/мл – 1.5 lg

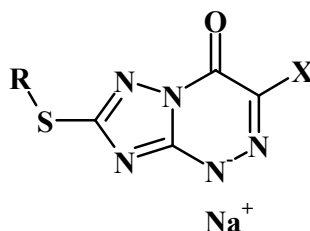
Из данных, приведенных в таблице 13 видно, что «Триазавирин» практически не активен в отношении вируса гриппа А(Н1N1) А/Брисбен/59/07, как и 6-фторпроизводные в кислотной форме (**9a,i,j**). В то же время, натриевая соль 2-метил-6-

фтортриазолотриазина (**10j**) обладает умеренной противовирусной активностью при токсичности, соизмеримой с «Триазавирином».

1.3. Сравнение *in vivo* противовирусной активности «Триазавирина» и его аналогов

Сравнительный анализ противовирусных свойств «Триазавирина» и его новых и уже известных аналогов [81, 82] в экспериментах *in vivo* позволяет оценить роль фармакофорных групп на биологическую активность исследуемых триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов. Методика проведения испытаний *in vivo* описана в экспериментальной части.

Таблица 14. Данные противовирусной активности «Триазавирина» и его аналогов *in vivo*



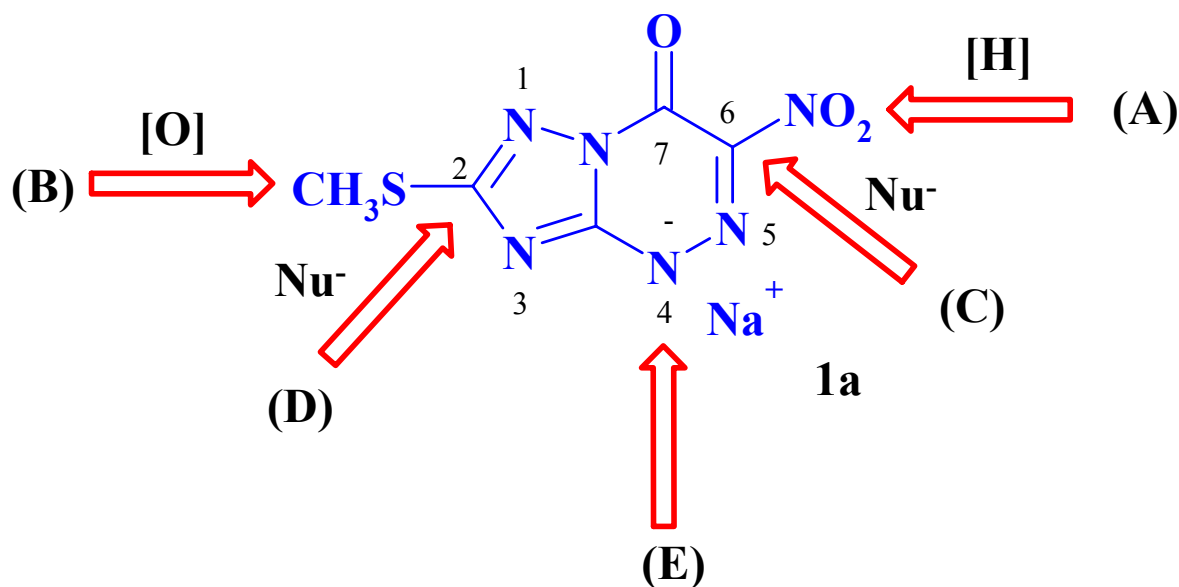
№	R	X	Противовирусное действие (эффективность, %) Грипп A/California/07/09 (H1N1)
1a	SMe	NO ₂	80
12	H	NO ₂	17
13	Me	NO ₂	47
10a	SMe	F	н/а
14	SMe	Cl	22.2
Тамифлю			55.6

Полученные данные однозначно показывают, что для достижения наибольшей биологической эффективности в отношении вируса гриппа необходимо одновременное присутствие как нитро-, так и метилсульфанильной группы. То есть обе функциональные группы существенно влияют на активность препарата и участвуют в его метаболических превращениях.

Таким образом, впервые были получены аналоги «Триазавирина», содержащие в шестом положении атом фтора, был синтезирован ряд гомологов препарата с различной длиной алкильного фрагмента при атоме серы для определения влияния метилтио- и нитрогрупп на противовирусную активность. На основании исследования взаимосвязи «структура-активность» в «Триазавирине» можно утверждать, что наличие метилтиогруппы и нитрогруппы является существенным для активности «Триазавирина» в отношении вируса гриппа, особенно важное влияние оказывает нитрогруппа.

2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПРЕПАРАТА «ТРИАЗАВИРИН»

Как было показано выше, «Триазавирин» обладает большей активностью в экспериментах *in vivo*, чем в экспериментах на клеточных культурах, то есть предварительно можно предположить, что противовирусным действием обладает метаболит препарата. Исходя из молекулярной структуры «Триазавирина» (**1a**) и изучения химических свойств 6-нитроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов [1] можно предположить различные варианты их превращений в организме. Так, редокс-превращения включают восстановление нитрогруппы под действием редуктаз (направление **A**); окисление алкилсульфанильного фрагмента под действием оксидаз (направление **B**) и их дальнейшие превращения. Участие трансфераз при действии биогенных N- и S-нуклеофилов, как, например, лизин, аргинин, цистеин, способно приводить к замещению алкилтио- или нитрогрупп (направления **C, D**).



Возможно и алкилирование по атому азота (направление **E**). Известно, например, что при взаимодействии 6-нитро-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов с алкилгалогенидами или диметилсульфатом образуются N-алкилпроизводные [83].

2.1. Окисление алкилсульфанильной группы «триазавирина» и его гомологов (направление **B**)

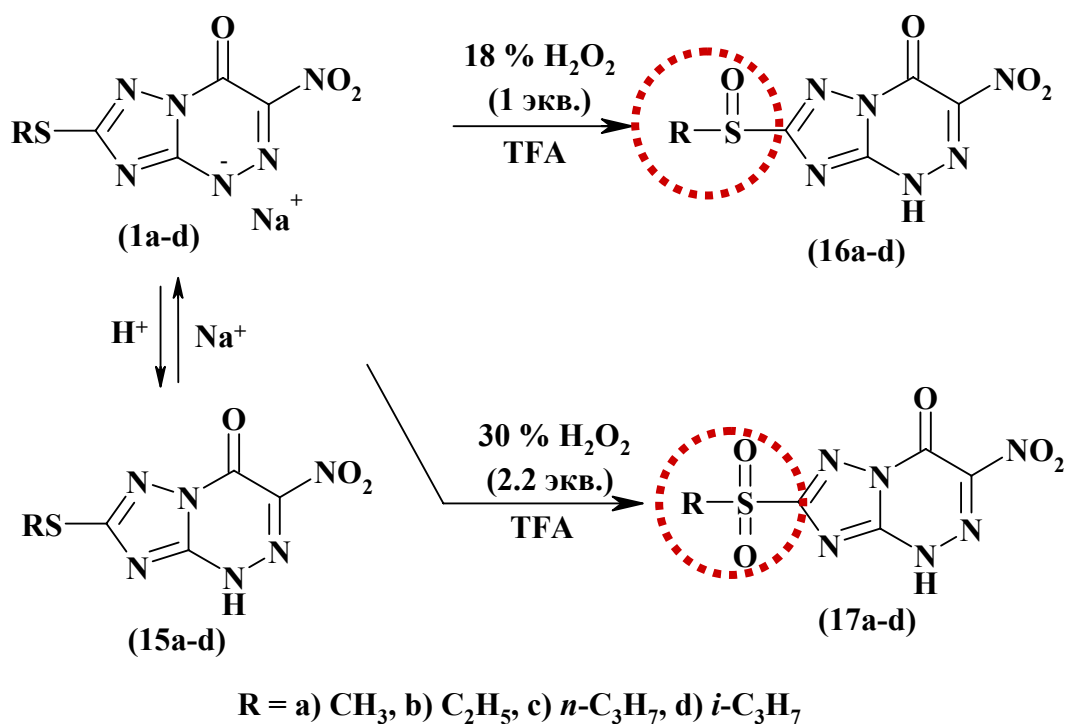
2.1.1. Химическое моделирование окисления под действием оксидаз

Возможность окисления «Триазавирина» и его гомологов (**1**) обусловлена присутствием в составе молекулы атома S(2), способного к превращениям типа $S^{-2} \rightarrow S^{-0} \rightarrow S^{+2}$. Необходимо отметить, что при большинстве вирусных инфекций уже на ранней стадии процесса происходит усиление генерирования активных форм кислорода [84, 85]. В част-

ности, это относится к синглетному кислороду и другим производным (O^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2 , $ONOO^{\cdot}$, HO^{\cdot}). Следует обратить особое внимание на нитропероксидный радикал $ONOO^{\cdot}$, особенно активное генерирование которого наблюдается при вирусных инфекциях. Вирус гриппа (и другие патогенные вирусы) вызывают индукцию синтеза iNOS – индуцируемой NO-синтетазы, что приводит к избытку NO в тканях и периферической крови. Естественно, в условиях активной продукции радикалов кислорода основная масса NO переходит в состояние нитропероксидного аниона. Эти процессы сопровождаются нитрозильным стрессом, активным нитропероксидным нитрозилированием белков, их инактивацией и нарушением клеточных функций [86]. Известно также негативное действие пероксинитрита на токсичность известных и широко используемых лекарственных препаратов [84, 85]. Исходя из изложенного, естественно предположить, что в этих условиях при участии оксидаз могут происходить реакции окисления S-метильной группы «Триазавирин» с образованием сульфоксидов (S^{-0}) и сульфонов (S^{-2}), свойственные, например, для SH-содержащей аминокислоты метионина при окислительном стрессе. Кроме того, может происходить активация нитрогруппы в 6-положении молекулы препарата с превращением ее в нестабильный нитрозильный радикал.

В настоящей работе приводятся данные о постановке модельных экспериментов с препаратом «Триазавирин» - изучение окисления метилтиогруппы и поведения продуктов S-окисления под действием S- и N-нуклеофилов. Такой подход позволяет, с одной стороны, предсказать течение химических реакций, сопутствующих поведению препарата в организме, а с другой стороны, путем синтеза соответствующих соединений смоделировать процесс образования ковалентных связей азоло[5,1-*c*][1,2,4]-триазинов с S и N-фрагментами ключевых белков как клетки, так и вируса. Помимо этого такие синтезы могут представлять самостоятельный интерес в получении новых производных «Триазавирин» для биологического тестирования.

Первым аспектом работы стал синтез модельных соединений - окисление сульфгидрильной группы в молекулах натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]-триазин-7-онов (**1a-d**) или сопряженных с ними NH-кислот (**15a-d**), включающее образование гетероциклических сульфоксидов (**16a-d**) и сульфонов (**17a-d**). При обработке соединений (**1a-d**) или (**15a-d**) эквимольным количеством 18% пероксида водорода в трифторуксусной кислоте получены сульфоксиды (**16a-d**).



Строение соединений (**16a-d**) установлено на основании данных ЯМР, ИК-спектроскопии и элементного анализа. Так, в спектрах ^1H ЯМР алкилсульфоксидов (**25a-d**) присутствуют сигналы алкильных групп R, а также уширенный однопротонный сигнал NH-группы в области 7,46÷11,15 м.д. В сравнении со спектрами исходных соединений (**1a-d**) [2], в спектрах сульфоксидов (**16a-d**) наблюдается сдвиг сигналов протонов фрагментов S-CH в область слабого поля ($\Delta\delta = 0,3\div 0,4$ м.д.). Спектры ^{13}C ЯМР триазоло-1,2,4-триазинов (**16a-d**) представлены сигналами алкильных групп в области 6-54 м.д. и резонансными пиками гетероциклических C-атомов. В ИК-спектрах полученных соединений присутствуют характерные полосы, соответствующие валентным колебаниям сульфоксидной группы ($\nu \text{ S=O } 992\div 1036 \text{ см}^{-1}$).

Дальнейшее окисление до соответствующих сульфонов (**17a-d**) с выходами 62-71% осуществлено постепенным прибавлением избытка 2,2 эквивалента 30% H_2O_2 к суспензии 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]триазинов (**1a-d**) в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре.

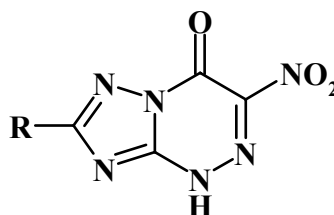
В спектрах ^1H ЯМР соединений (**17a-d**) наблюдается еще большее, чем в случае сульфоксидов (**16a-d**), смещение сигналов протонов групп S-алкильных групп в слабое поле ($\Delta\delta = 0,5\div 0,7$ м.д.) в сравнении с исходными соединениями (**1**). В ИК-спектрах полученных веществ присутствуют характерные полосы поглощения групп, соответствующие валентным колебаниям сульфонильной группы ($\nu_{\text{as}} \text{ SO}_2 1293\div 1347 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_{\text{s}} \text{ SO}_2 1135\div 1140 \text{ см}^{-1}$).

Представленные реакции моделируют возможные метаболические превращения «Триазавирина» и его производных под действием активных форм кислорода, включая H_2O_2 .

2.1.2. Биологическая активность продуктов S-окисления «Триазавирина»[‡]

Данные биологической активности продуктов S-окисления представлены в таблице 17. Постановка эксперимента по определению минимальной токсической дозы и противовирусной активности описана в экспериментальной части.

Таблица 15. Данные противовирусной активности продуктов S-окисления «Триазавирина» *in vitro*.



№	R	МТД, мкг/мл	Концентрация, мкг/мл	Противовирусная активность (кратность снижения репродукции, lg)	
				A(H1N1) A/Puerto Rico/8/34	A(H3N2) A/Victoria /35/72
16a	$H_3C-S(O)$	>200	100	1.0	1.0
16b	$H_5C_2-S(O)$	>200	100	0.5	0.5
16c	$n-C_3H_7-S(O)$	>200	100	1.0	1.0
16d	$i-C_3H_7-S(O)$	>200	100	1.0	1.0
17a	$H_3C-S(O_2)$	>200	100	0.0	0.0
17b	$H_5C_2-S(O_2)$	>200	100	0.5	0.5
17c	$n-C_3H_7-S(O_2)$	>200	100	0.0	0.0
17d	$i-C_3H_7-S(O_2)$	>200	100	1.0	1.0

Как видно из данных, приведенных в таблице 15, S-окисление молекулы «Триазавирина» не вызывает существенных изменений его противовирусной активности в опытах *in vitro*. Но такие метаболические модификации могут явиться проявлением частичных антиоксидантных свойств.

[‡] Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

2.2. Компьютерное моделирование взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и нейраминидазой вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)[§]

Для определения возможности протекания реакции замещения нитро- или метилсульфанильной групп N- и S-нуклеофильными остатками вирусных белков, а также с целью обнаружения других биологических мишеней было проведено компьютерное моделирование взаимодействия «Триазавирина» с нейраминидазой и гемагглютинином вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1).

Для виртуального моделирования взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и нейраминидазой использовали структуры белков из базы данных PDB (3LZG(H1) и 3T16 (N1) соответственно) и структуру «Триазавирина», оптимизированную в программе HyperChem 8.0 (Trial Version). Из координатных файлов были удалены гетероатомы и молекулы воды. В файле 3T16 были также удалены молекулы ингибитора нейраминидазы. В качестве исходных данных для моделирования использовались координаты мономеров белков.

Для проведения докинга использовали серверную версию программы Hex (<http://hexserver.loria.fr/>) со стандартными параметрами. Моделирование проводили с учётом электростатических взаимодействий, рассматривали 500 наилучших положений лиганда.

Для анализа контактов белков с молекулами лиганда использовали программу RasMol. В качестве критерия для отбора аминокислотных остатков, находящихся в контакте с лигандом, использовали расстояние от молекулы лиганда до аминокислотных остатков рецептора. Если расстояние от атомов аминокислотного остатка до атомов лиганда составляло менее 5 ангстрем, считали, что данный аминокислотный остаток находится в контакте с лигандом. Величина 5 ангстрем была выбрана опытным путём, исходя из предыдущих экспериментов по моделированию взаимодействия фермент-ингибитор.

Моделирование взаимодействие «Триазавирином» с нейраминидазой вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1) показало, что все сайты связывания с «Триазавирином» находятся на поверхности молекулы белка вдали от аминокислотных остатков, образующих ферментативный центр нейраминидазы (рис. 1).

[§] Компьютерное моделирование взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и нейраминидазой было проведено совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, автор выражает благодарность за помощь В.В. Егорову и А.В. Васину.

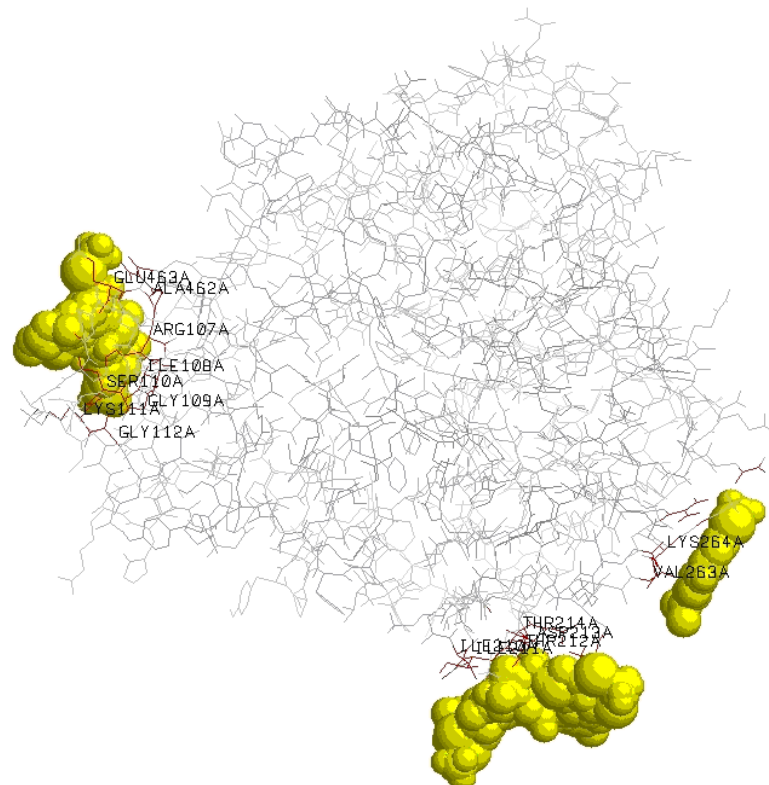


Рисунок 1. Расположение потенциальных сайтов связывания с «Триазавирином», расположенных на поверхности нейраминидазы вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)

Таким образом, на основании докинга «Триазавирина» с нейраминидазой возможно исключить ингибирование этого белка препаратом как один вариантов его метаболизма.

По результатам проведенного моделирования в молекуле гемагглютинина было обнаружено 5 потенциальных сайтов взаимодействия с «Триазавирином». Первичная последовательность гемагглютинина вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1), в которой отмечены аминокислотные остатки, потенциально участвующие в координации «Триазавирина», представлена на рисунке 2.

Influenza A virus A/California/04/2009 (H1N1) (Gen Bank [ac.no. ACP41105](#))

```

1  MKAILVLLLYTFATANADTLICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGL C K
61  L RGVAPL HLGKCNIAGWILGNP ECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELRE
21  QLS SVSSSFERFEIFPKTSSWPNHDSM KGVTAACPHAGAKS FYKNLIWLVKKGNSYPKLSK
81  SYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADTYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQ
41  EGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERN AGSGIIISDTPVHD CNTTCQTFK
01  GAINTSLPFQNIHPIT IGKCPKYV__KSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTG
61  MVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNHLEKR
21  IENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNG
81  CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASS
41  LVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

```

Рисунок 2. Расположение 5 потенциальных сайтов связывания с «Триазавирином» в отношении с первичной структурой гемагглютинаина вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1) (ACP41105). Аминокислотные остатки, потенциально участвующие в связывании, обозначены красным (сайт 1), желтым (сайт 2), зеленым (сайт 3), голубым (сайт 4) и фиолетовым (сайт 5) цветами.

Пространственная структура гемагглютинаина вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1), в которой отмечены аминокислотные остатки, потенциально участвующие в координации «Триазавирина», представлена на рисунках 3 и 4.

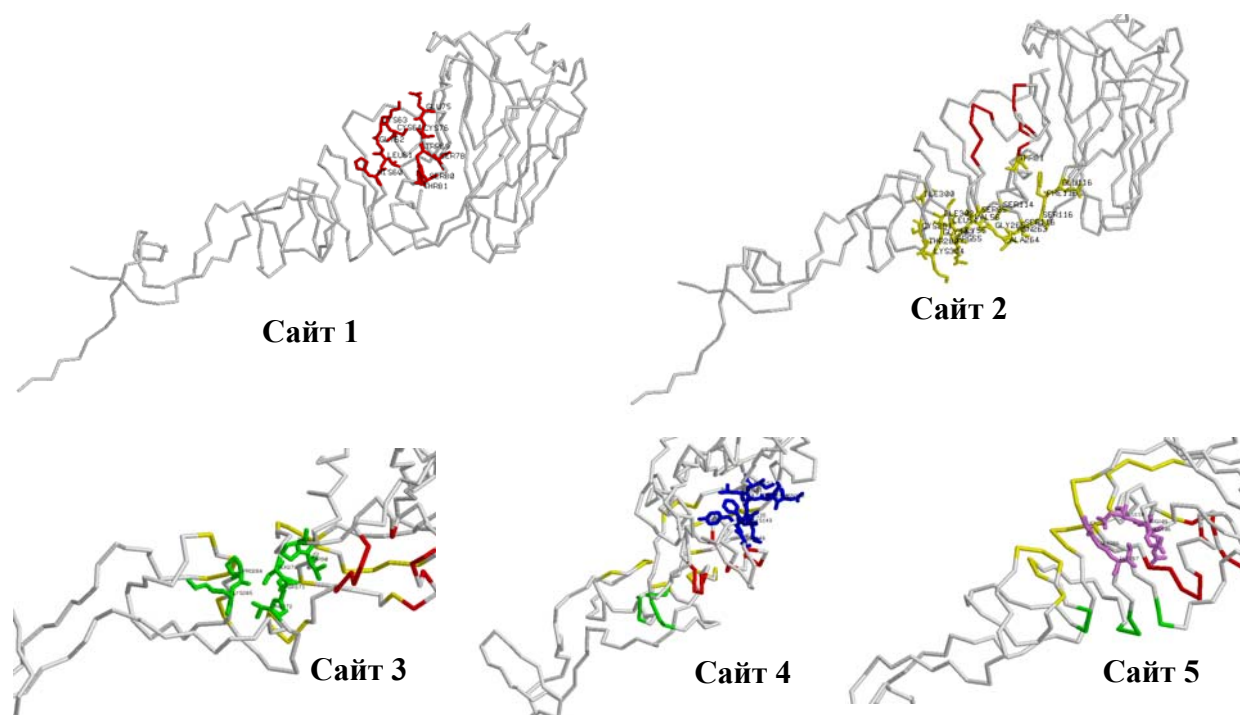


Рисунок 3. Пространственная структура потенциальных сайтов связывания гемагглютинаина вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1) с «Триазавирином», полученная методами компьютерного моделирования

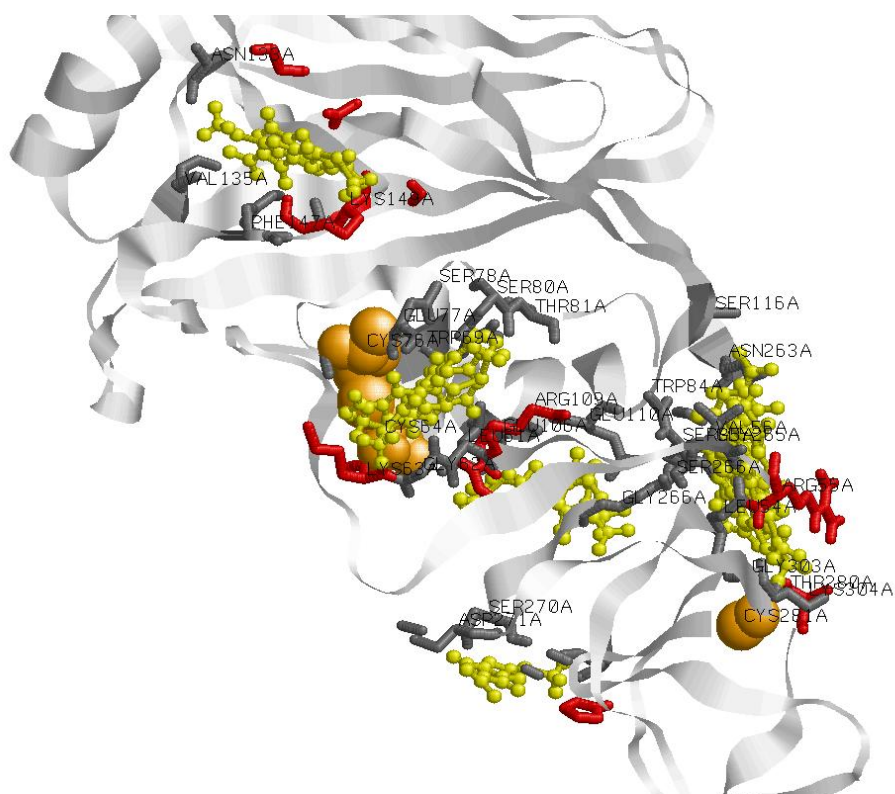


Рисунок 4. Результаты множественного докинга «Триазавирина» и гемагглютинаина Н1 вируса гриппа. Показаны 100 наилучших по энергии взаимодействия взаимных расположений молекул. Разница между энергиями взаимодействия в обозначенных сайтах меньше средней энергии теплового движения при комнатной температуре. Красным цветом обозначены основные аминокислотные остатки вблизи (менее 4 ангстрем) молекулы «Триазавирина», оранжевым - остатки цистеина. Молекулы «Триазавирина» обозначены жёлтым цветом.

Первичное взаимодействие с белками-мишенями для «Триазавирина» осуществляется, главным образом, за счет отрицательного заряда основной части молекулы «Триазавирина», в силу чего при докинге на молекуле гемагглютинаина вируса гриппа в качестве сайтов «посадки» идентифицированы короткие последовательности: CKLRGV (Цис-Лиз-Лей-Арг-Гли-Вал), LGK (Лей-Гли-Лиз), FYKLIW (Фен-Тир-Лиз-Асн-Лей-Изо-Трп) (рис.2).

В пользу первичного кислотно-основного связывания «Триазавирина» и гемагглютинаина свидетельствует обнаруженное методом поверхностного плазмонного резонанса ** наличие для «Триазавирина» нековалентного и динамического взаимодействия с гемагглютинином, вероятно, ионной природы, так как концентрации были подобраны таким образом, чтобы в белке оставались свободные аминокислотные группы. На рисунке 5 представлена сенсограмма данного взаимодействия (методика исследования взаимодействия «Триазавирина» и гемагглютинаина описана в экспериментальной части).

** Исследование связывания «Триазавирина» с гемагглютинином методом поверхностного плазмонного резонанса было проведено совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, автор выражает благодарность за помощь В.В. Егорову и А.В. Васину.

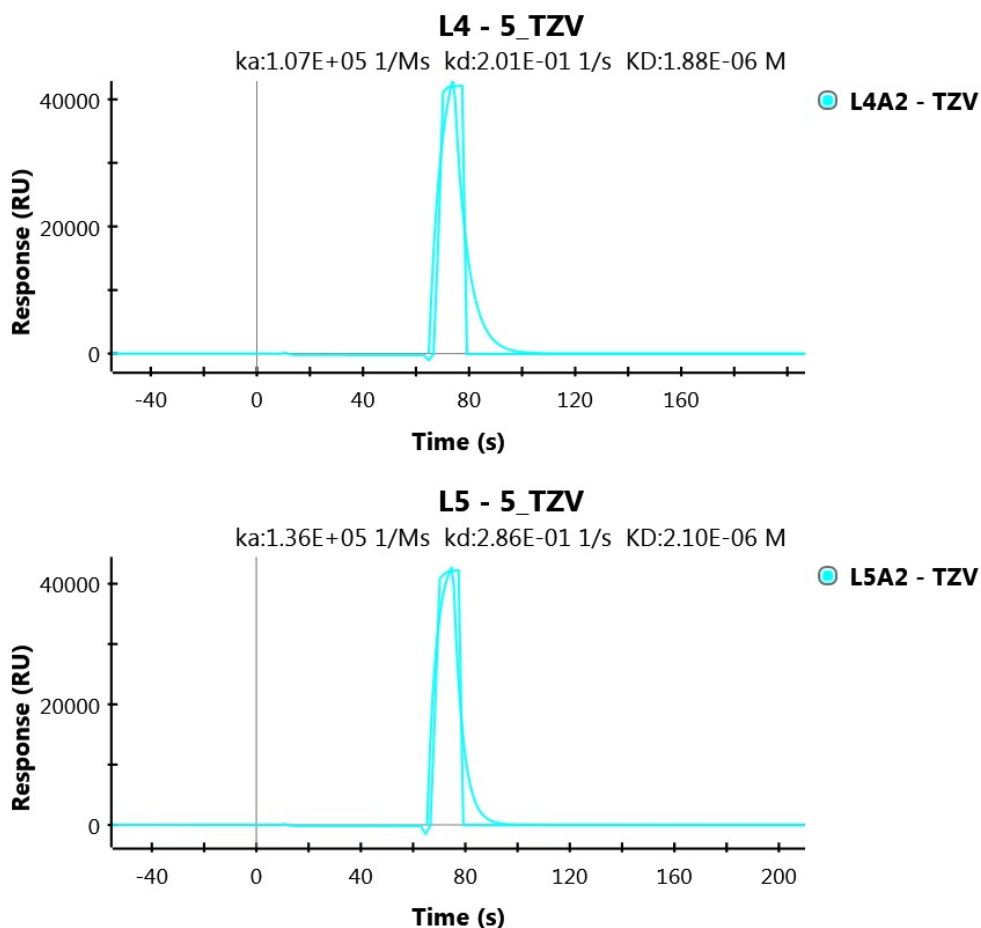


Рисунок 5. Детектирование взаимодействия иммобилизованного гемагглютинина подтипа H3N2 (320 нМ и 640 нМ) и «Триазавирин» (100 нМ) методом поверхностного плазмонного резонанса, а также результаты анализа кривых с использованием кинетической модели. Приведены вычисленные значения констант ассоциации и диссоциации, а также Кд.

Вместе с тем, с точки зрения реализации ингибирующей активности на гемагглютинин как лекарственной мишени особый интерес представляет домен, более обогащенный остатками цистеина. Это относится к последовательности $^{290}\text{HDCNTTCSNPKGAINSLPQNIHPITIGKCPKY}^{323}$. Данный домен содержит остатки цистеинов: $\text{CX}_3\text{CX}_{22}\text{C}$, разобценных коротким трипептидом с N-конца и 22-членным пептидом в области C-конца полипептидной цепи. Одним из видов такого возможного взаимодействия является ковалентное взаимодействие за счет нуклеофильного замещения нитрогруппы или метилсульфонильного фрагмента.

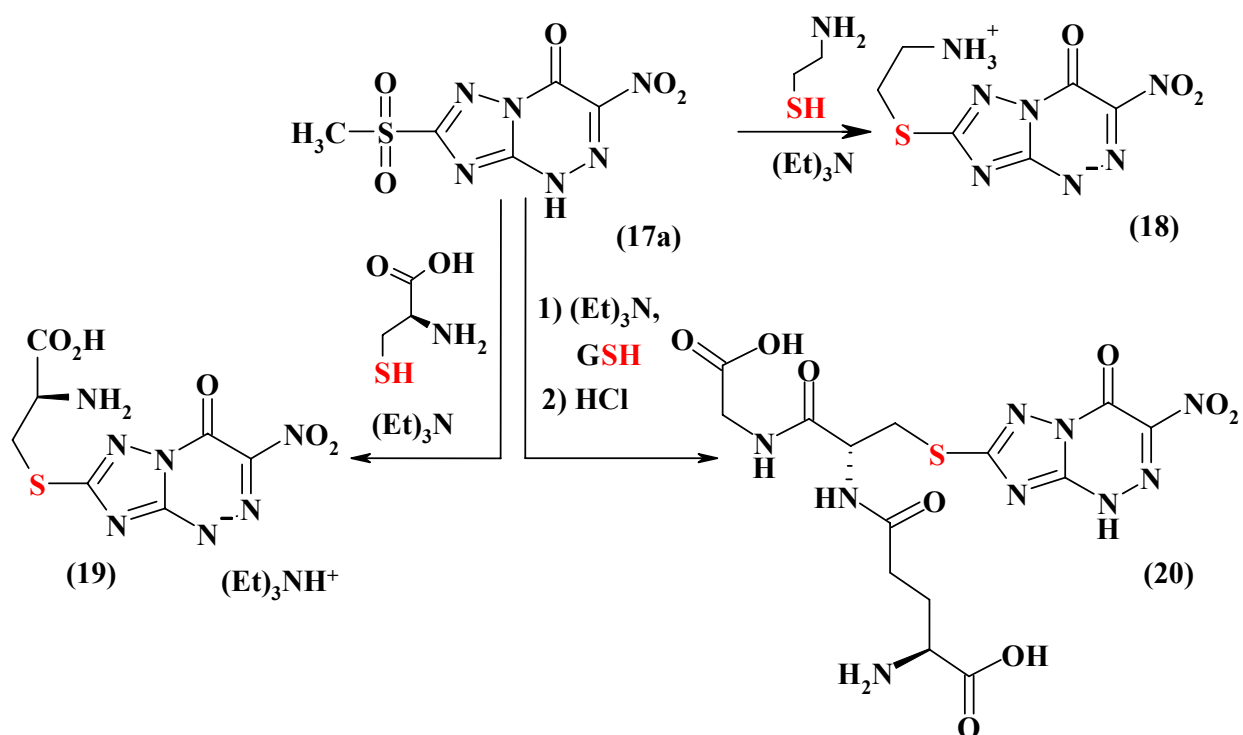
2.3. Нуклеофильное замещение в 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах (направление D)

2.3.1. Постановка модельной реакции замещения метилсульфонильной группы S-нуклеофилами

При рассмотрении молекулярной структуры соединения (1) можно предположить его взаимодействие с вирусными белками за счет замещения нитро- или метилсульфонильной групп с N- и S-нуклеофильными остатками, таких, как аминокислоты лизин, аргинин, цистеин в составе различных вирусных белков, например, в нейраминидазе или гемагглютинине.

Известно, что алкилсульфонильные фрагменты восприимчивы к реакциям замещения при взаимодействии с нуклеофилами [87-89]. Что касается поведения нитрогруппы в «Триазавирине», то хорошо известна склонность NO₂-группы, связанной с ароматическим (гетероароматическим) циклом, к замещению под действием нуклеофилов. Наши данные по химическим свойствам нитро-азоло-1,2,4-триазинов [82] подтверждают эту особенность. Таким образом, в структуре 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов (17a-d) присутствуют две группировки, склонные к нуклеофильному вытеснению. Эта ситуация представляет интерес для исследования сравнительной реакционной способности легко уходящих групп - CH₃SO₂- в 1,2,4-триазольном и NO₂- в 1,2,4-триазиновом циклах в соединениях (17a-d), а также как модель поведения «Триазавирин» в организме. В качестве нуклеофильных реагентов в реакции с 2-метилсульфонил-триазолотриазинном были использованы S-нуклеофилы (цистеамин, цистеин и глутатион), которые можно рассматривать с одной стороны как модели фрагментов белков, содержащих цистеиновый фрагмент, с другой как биогенные фрагменты, которые могут быть введены в молекулу 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина.

Замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазине (17a) под действием, как цистеина, так и цистеамина, происходит при кипячении в сухом метаноле в присутствии триэтиламина в течение нескольких дней с образованием веществ (18-20) – продуктов замещения метилсульфонильной группы с выходами 41-46%.



Данные ЯМР, ИК-спектроскопии и элементного анализа для соединений (18-20) соответствуют приписываемым структурам.. В спектре 1H ЯМР спектре соединения (18) присутствуют только триплеты цистеаминового фрагмента, что обусловлено образованием цвиттер-иона. В 1H ЯМР спектре триэтиламмониевой соли 2'-амино-2'-карбоксиэтилтиотриазолотриазина (19) также наблюдаются сигналы протонов цистеинового фрагмента, при этом видно расщепление протонов группы SCH_2 , каждый из которых представлен дублетом дублетов ($\delta = 3,65$ м.д., $^nJ = 15,2, 7,5$; $\delta = 3,98$ м.д., $^nJ = 15,2, 3,8$), а также сигналы трех этильных групп катиона триэтиламмония. В 1H ЯМР спектре триазолотриазина (20) присутствуют только сигналы протонов, принадлежащие глутатионовому пептидному фрагменту. В спектре, как и для соединения (19) наблюдается расщепление сигналов протонов группы SCH_2 , представленных дублетом дублетов ($\delta = 3,51$ м.д., $^nJ = 14,5, 8,8$; $\delta = 3,90$ м.д., $^nJ = 14,5, 4,4$). Отсутствие в 1H ЯМР спектрах всех трех продуктов замещения трехпротонного синглета метильной группы в области 3,27 м.д., а также исчезновение в ИК-спектрах характерных полос поглощения сульфонильной группы и наличие характеристических частот нитрогруппы (νNO_2 1504÷1505 cm^{-1} и 1361÷1375 cm^{-1}) свидетельствует о замещении именно метилсульфонильного фрагмента.

Заместить $RS(O)$ -фрагмент в сульфоксидах (16a-d), в описанных выше условиях не удалось.

Описанное замещение алкилсульфонильной группы в соединении (17a), является аргументом в пользу предположения о возможном участии этого фрагмента в метаболических превращениях «Триазавирина».

2.3.2. Данные биологической активности продуктов замещения метилсульфонильной группы S-нуклеофилами^{††}

Данные биологической активности некоторых продуктов замещения метилсульфонильной группы S-нуклеофилами представлены в таблице 16. Постановка эксперимента по определению минимальной токсической дозы и противовирусной активности описана в экспериментальной части.

Таблица 16. Данные противовирусной активности *in vitro* продуктов замещения метилсульфонильной группы S-нуклеофилами.

№	МТД, мкг/мл	Концентрация, мкг/мл	Противовирусная активность (кратность снижения репродукции, lg)	
			A(H1N1) A/Puerto Rico/8/34	A(H3N2) A/Victoria /35/72
18	200	100	0.0	0.5
19	200	100	0.0	0.5

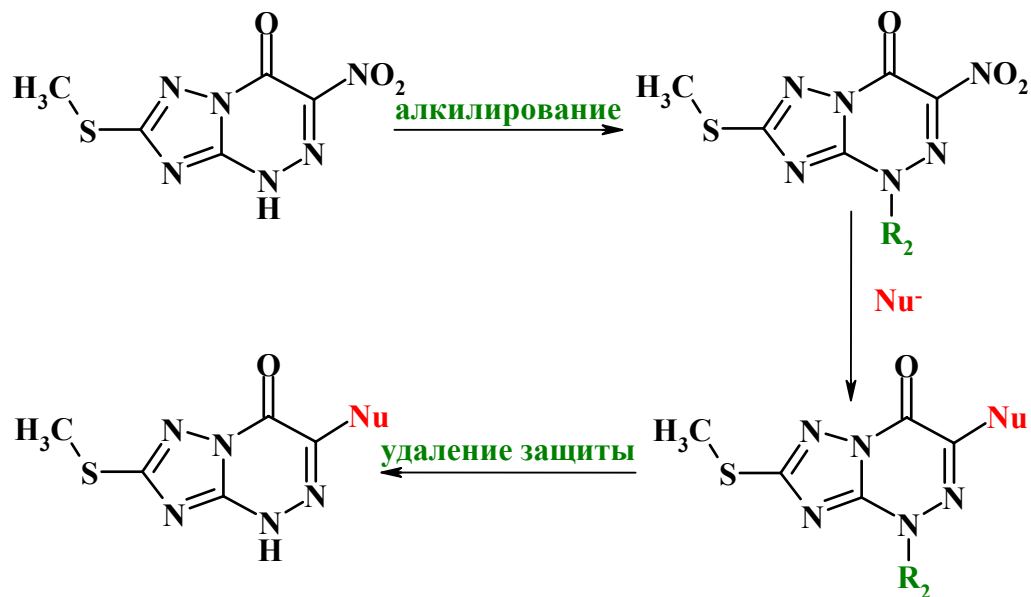
Как видно из данных, приведенных в таблице 16, 2-цистеамин- и 2-цистеин-триазолотриазины (**18,19**) проявляют слабую противовирусную активность в отношении вируса A(H3N2) A/Victoria /35/72.

2.4. Получение алкилированных аналогов «Триазавирина» (Направление E)

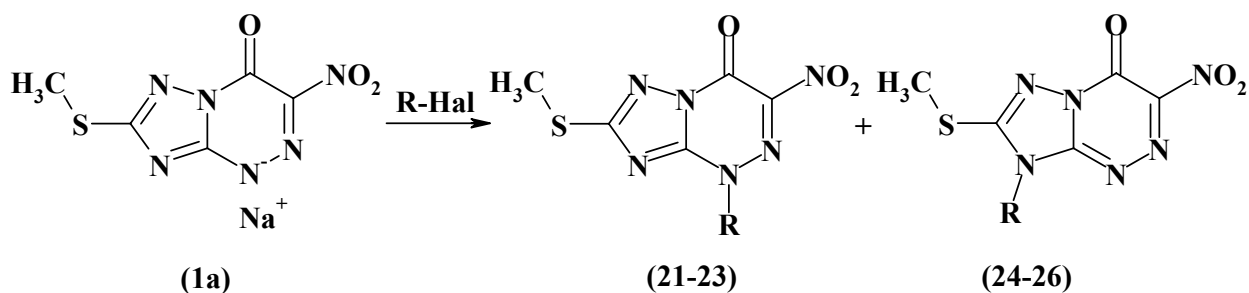
Целесообразность рассмотрения модификаций молекулы «Триазавирина» по N-атомам триазолотриазинового строения обусловлена двумя основными причинами. Прежде всего, известно, что конденсированные азолазины способны вступать в реакции рибозилирования с образованием неприродных нуклеозидов с последующим ингибированием синтеза ДНК, чем обусловлена их биологическая активность [76]. Таким образом, исследование модификаций «Триазавирина» по направлению F представляется важным с точки зрения получения аналогов неприродных нуклеозидов. С другой стороны, N-алкилирование «Триазавирина» и его аналогов позволяет реализовать замещение нитрогруппы N-нуклеофилами (направление C), невозможное в самих NH-гетероциклах из-за образования солей аммония [82]. Следует отметить, что подобные превращения – алкилирование или гликозилирование по атому азота – теоретически, могут протекать и в физиологических условиях. Таким образом, направление F представляет интерес и в качестве способа модификации «Триазавирина», и в качестве синтетического приема.

^{††} Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Кроме того, введение в N(4)-положение защитных групп, которые можно удалить после замещения нитрогруппы, делает возможным получение продуктов взаимодействия самого «Триазавирина» с нуклеофилами, а не только его алкилированных аналогов.



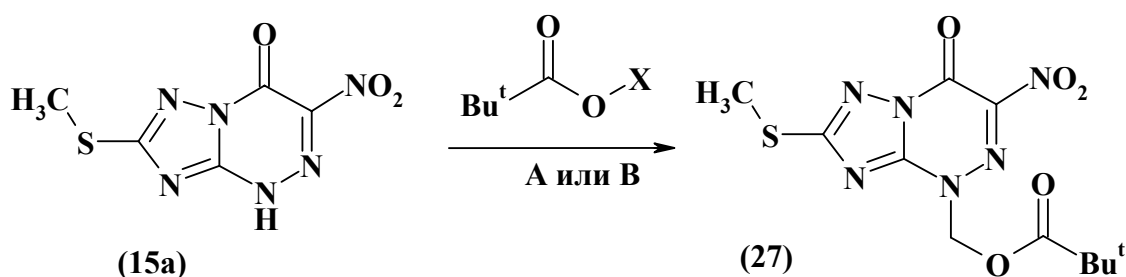
Ранее было установлено, что алкилирование «Триазавирина» (**1a**) галоидными алкилами проходит неселективно и приводит к образованию двух изомеров типа (**21-23**) и (**24-26**):



R: **21,24**) CH₃, **22,25**) C₂H₅, **23,26**) Bn

Соотношение продуктов реакции алкилирования зависит от природы растворителя, а также от размеров вводимого алкильного заместителя. Так, проведение реакции в ДМСО или ДМФА приводит к образованию преимущественно N(4)-алкилированного изомера (**24-26**) (70-80 %), тогда как при использовании метанола наблюдается увеличение выхода азолзамещенного изомера (**21-23**) (30-40 %) [83].

При увеличении объема группы R наблюдается снижение образования продукта алкилирования по триазольному циклу. Так, при алкилировании хлометилпивалатом образуется только один изомерный продукт по атому N(4) – соединение (**27**). Причиной такой селективности, вероятно, являются пространственные затруднения, возникающие около атома N(3) и препятствующие образованию изомеров по азольному циклу.



A: X = CH₂Cl, Bu₄NI, Na₂CO₃, DMF (35%)

B: (CH₃)₃CO, ZnCl₂, (H₂CO)_n, t = 140 °C (82%)

Введение в положение 4 триазолотриазинового цикла пивалоилоксиметильного остатка обусловлено возможностью его применения в качестве защитной группы, удаляемой в основных условиях [90], а также структурной аналогией с фрагментом рибозы, что придает алкилированному продукту сходство с неприродными нуклеозидами. Поэтому для увеличения выхода соединения (27) нами предложен более эффективный метод его получения, который заключается во взаимодействии NH-кислоты (15a) с пивалевым ангидридом и параформом при 140°C в присутствии каталитических количеств хлорида цинка. Данный способ позволяет получить 4-пивалоилоксиметил-триазолотрин (27) с выходом 82 %.

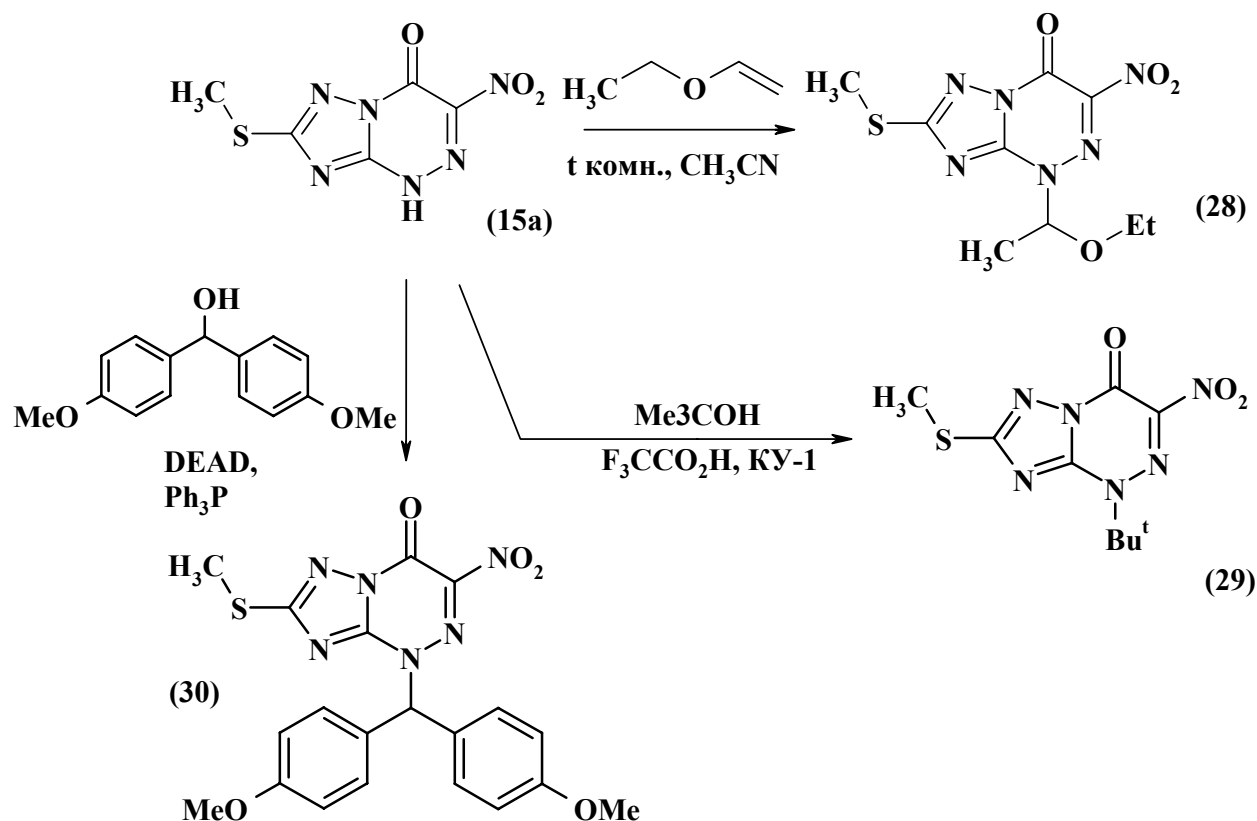
Взаимодействие триазолотриазина (15a) с винилэтиловым эфиром приводит к образованию 2-метилтио-4-этоксиэтил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина (28). Реакция была проведена в сухом ацетонитриле при комнатной температуре, выход составил 85%. Вводимая этоксиэтильная группа также является легкоудаляемой и может быть удалена в кислой среде. Производное (28) представляет собой неустойчивое соединение в присутствии даже малых количеств воды и легко превращается в исходное соединение (15a).

Другим методом введения защитной алкильной группы является алкилирование спиртами в присутствии сильной кислоты. Реакция протекает селективно с образованием только продукта алкилирования триазинового цикла, что можно объяснить иным, нежели с галоидными алкилами, механизмом взаимодействия. В кислых условиях реакция алкилирования обратима, и карбокатион реагирует с атомом азота в положении 4 триазолотриазина с образованием наиболее термодинамически стабильного продукта.

Реакция в серной кислоте протекает с низким выходом, тогда как использование трифторуксусной кислоты с катионообменной смолой КУ-1 в течение недели при комнатной температуре позволяет получить целевой N(4)-изомер с выходом 96 %. Так, алкилирование *tert*-бутанолом NH-кислоты 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина приводит к образованию единственного N(4) – *tert*-бутилированного изомера (29).

Удобным методом региоселективного алкилирования также является реакция Мицунобу. Так, в диоксане в присутствии трифенилфосфина и диэтилазадикарбоксилата была введена бис(4-метоксифенил) метильная группа в N(4) положение триазолотриазина (30) с выходом 74 %.

Образование только N(4)-изомера (30) объясняется большей NH-кислотностью атома азота в положении 4 триазолотриазина, обусловленной влиянием электрон-акцепторной нитрогруппы в положении 6 триазинового цикла.



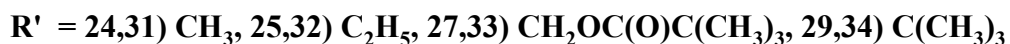
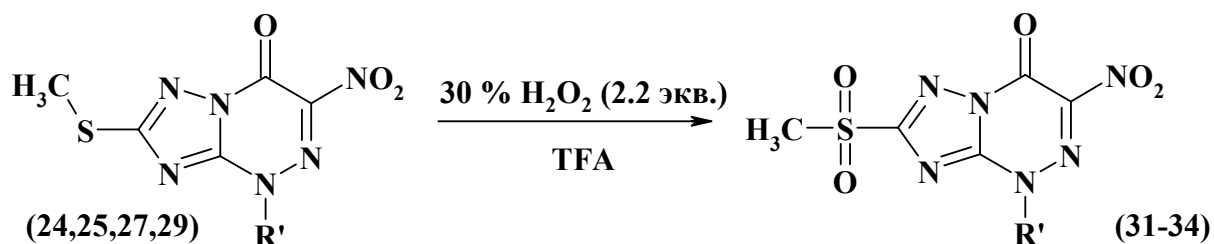
Строение всех новых 4-алкил-триазолотриазинов было доказано ^1H ЯМР спектроскопией, а также ИК и данными элементного анализа.

В спектрах ^1H ЯМР полученных соединений (27-30) наблюдаются резонансные пики протонов алкильных групп, а также протонов групп R^1 , находящихся в положении 2 триазольного цикла. В ИК спектрах присутствуют интенсивные полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы ($1731\text{-}1753 \text{ см}^{-1}$) и нитрогруппы ($1330\text{-}1359 \text{ см}^{-1}$ и $1545\text{-}1561 \text{ см}^{-1}$).

По большей части выбранные алкильные фрагменты моделируют рибозильный остаток либо содержатся в известных противовирусных препаратах.

Для определения приоритетного центра из двух конкурентных направлений реакции нуклеофильного замещения нами были синтезированы производные (31-34). 2-

Метилтио-4- R' -6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1- c][1,2,4]триазин-7-оны (**24,25,27,29**), как и соединения (**1a-d**), легко окисляются до соответствующих сульфонов (**31-34**) действием избытка перекиси водорода.



Спектры ^1H ЯМР полученных соединений (**31-34**) характеризуются присутствием сигналов протонов метилсульфонильной группы ($\delta = 3,0 \div 3,5$ м.д.), а также сигналами протонов N-алкильных групп. В ИК-спектрах присутствуют характерные полосы поглощения карбонильной, нитро- и сульфонильной групп.

Таким образом, на данном этапе работы нами были разработаны четыре методики алкилирования 6-нитротриазоло[5,1- c]триазина, с помощью которых были синтезированы новые 4-алкилтриазолотриазины, также были получены уже известные алкилированные аналоги «Триазавирин», которые были использованы в качестве исходных соединений для дальнейших превращений. Кроме того, стоит отметить, что бис(4-метоксифенил)метильная, пивалоилоксиметильная и этоксиэтильная группы являются легкоходящими и могут быть использованы как защитные [90] для блокирования NH протона в 4 положении для облегчения замещения нитрогруппы и последующего удаления защиты. То есть появляется возможность получить продукты замещения самого «Триазавирин», а не только его алкилированных аналогов на S- и N-нулеофилы.

2.5. Нуклеофильное замещение нитрогруппы в алкилированных аналогах «Триазавирин» (Направление С)

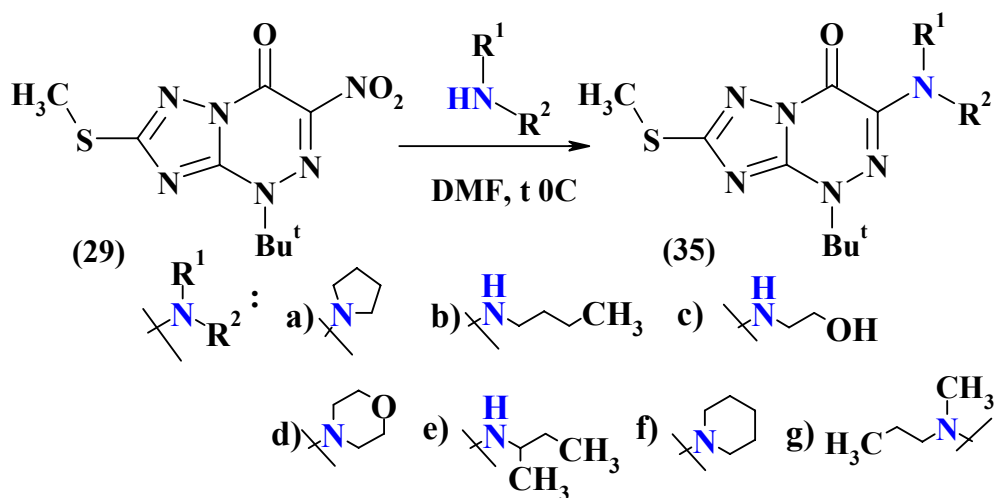
2.5.1. Взаимодействие с N-нуклеофилами

Следующим аспектом работы стало исследование нуклеофильного замещения нитрогруппы в 4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1- c][1,2,4]триазин-7-онах. Предыдущими исследованиями показано, что 4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1- c][1,2,4]триазин-7-оны способны к замещению нитрогруппы под действием N-нуклеофилов, однако не всегда эта реакция протекает однозначно [82]. В ходе исследований обнаружено, что 2-метилтио-4- R' -6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1- c][1,2,4]триазины, в отличие от триазолотриазина (**1a**) не способны к образованию солей с основаниями, активно взаимодействуют с N-нуклеофилами – первичными, вторичными аминами и циклоалкилиминами.

При взаимодействии 4-*трет*-бутил-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина (29) с N-нуклеофилами наиболее легко реакция проходит с первичными аминами – этаноламином и *n*-бутиламином (60-77 %). В то же время реакция со *втор*-бутиламином, диалкиламинами, а также с циклоалкилиминами требует более жестких условий.

Образование продуктов замещения нитрогруппы (35а-г) происходит при кипячении реагентов в ДМФА от 2 ч для первичных аминов до 15 часов для вторичных и циклических аминов.

Целевые продукты (35а,с-е,г) были очищены при помощи колоночной хроматографии; соединение (35b) выделено затиранием сухого остатка водой. Выход целевых продуктов (35а-г) составил 15-77%.



Для некоторых аминов, обладающих низкой температурой кипения (*n*-бутиламин, пирролидин, *втор*-бутиламин, морфолин), более целесообразным по сравнению с кипячением в ДМФА оказалось проведение реакции в чистых аминах. Если при комнатной температуре процесс протекает неэффективно и для получения целевого продукта реакционную массу выдерживали неделю, то при кипячении реакция завершается в течение 2-8 ч.

Строение синтезированных соединений установлено на основании данных ЯМР ^1H и элементного анализа. В спектрах присутствуют синглеты метилсульфанильной ($\delta = 2.63\text{-}2.69$ м.д) и *трет*-бутильной групп ($\delta = 1.68\text{-}1.73$ м.д.) и мультиплеты аминоалкильных фрагментов. В соединениях (35b,с,г) также присутствует уширенный однопротонный сигнал NH-группы в области 5.33-5.60 м.д.

Структурное строение соединения (35d) было также подтверждено методом рентгеноструктурного анализа. Структура молекулы приведена на рисунке 6. Основные длины связей и валентные углы приведены в приложении 1.

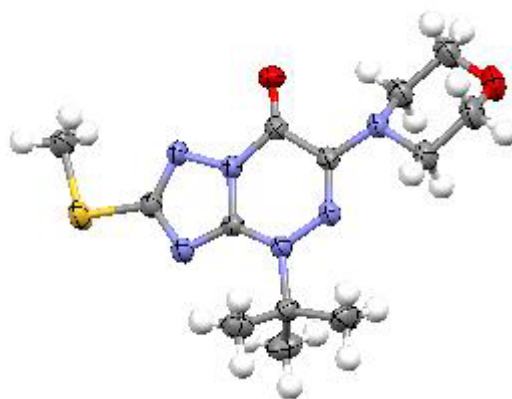
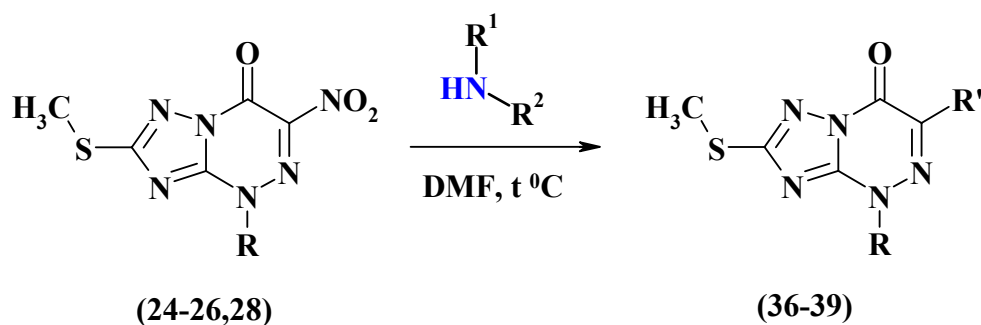


Рисунок 6. Структура 4-*tert*-бутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина (35d)

Полученные структурные данные однозначно указывают на то, что алкилирование 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-она (15a) в присутствии кислот приводит к образованию именно 4-*tert*-бутил-2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-она (29).

Взаимодействием 4-*R*-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов с некоторыми N-нуклеофилами был получен ряд соединений (36-39). Для проведения данных превращений были использованы те же условия, что и в случае замещения нитрогруппы в 4-*tert*-бутил-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазине: тройной избыток амина в ДМФА при нагревании. Продукты реакции были выделены с помощью колоночной хроматографии.

Замещение нитрогруппы в соединении (28) на остаток этаноламина протекает практически мгновенно при комнатной температуре в ДМФА. Продукт реакции (39a) был выделен с помощью флэш-хроматографии в системе этилацетат : гексан = 4 : 1.



36a, R = Me, R' = NHBu; 37a, R = Et, R' = NHBu;

37b, R = Et, R' = NHCH₂CH₂OH;

37c, R = Et, R' = морфолил,

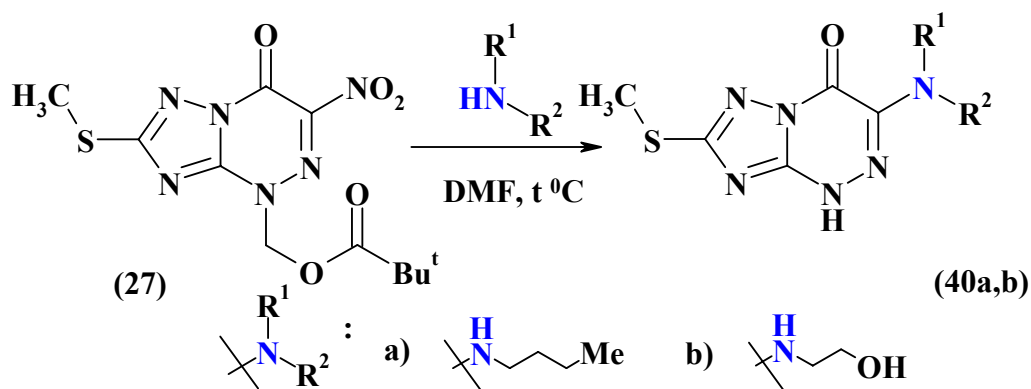
38a, R = Bn, R' = NHCH₂CH₂OH;

39a, R = Et, R' = NHCH₂CH₂OH

Как и в случае триазолотриазинов (**35a-g**), спектры ЯМР ^1H соединений (**36-39**) характеризуются присутствием синглетов метилсульфанильной ($\delta = 2.50-2.69$ м.д), мультиплетами и аминоалкильных фрагментов, также сигналами N(4)-алкильных групп.

Спектр ЯМР ^1H соединения (**39a**) характеризуется наличием синглета метилтиогруппы, мультиплетов этаноламина и этоксиэтильной группы с дополнительным расщеплением сигналов, вызванным спин-спиновым взаимодействием магнитно-неэквивалентных протонов метиленовой группы OCH_2 .

При исследовании взаимодействия 4-пивалоилоксиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина (**27**) с первичными аминами (бутиламин, этаноламин) установлено, что одновременно с замещением нитрогруппы проходит удаление пивалоилоксиметильного фрагмента и образование 6-алкиламинотриазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов (**40a,b**) с выходами 27-39%.

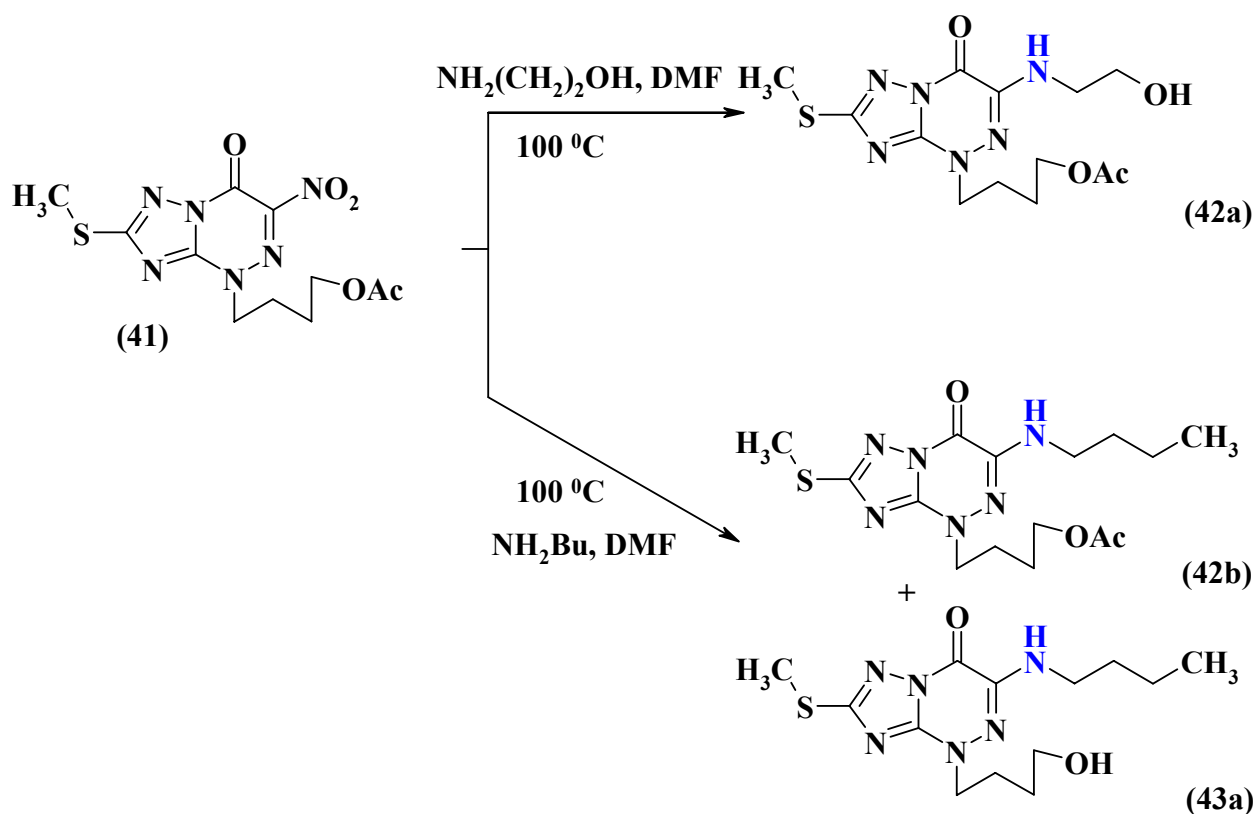


Таким образом, пивалоилоксиметильный фрагмент оказался в условиях реакции эффективной защитной группой, позволяющей реализовать замещение нитрогруппы амином и получить 6-алкиламинотриазолотриазины (**40**), не содержащие алкильную группу при N4-атоме. До сих пор в литературе было описано удаление пивалоилоксиметильного фрагмента метилатом натрия или раствором аммиака в метаноле [90-92]. Разработанный нами новый метод удаления пивалоилоксиметильного фрагмента показывает перспективность использования этой защитной группы в органическом синтезе.

В спектрах ЯМР ^1H помимо сигнала метилтиогруппы, мультиплетов алкильного фрагмента R и уширенного сигнала протона аминогруппы присутствует уширенный сигнал протона гетероциклической группы NH ($\delta = 11.40 - 13.24$ м.д).

В полученном по описанному ранее методу [76] 2-метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4H)-оне (**41**) также было проведено замещение нитрогруппы на остаток этаноламина и *n*-бутиламина. Реакция была проведена в ДМФА при 100°C с тройным избытком амина в течение 3 ч.

Взаимодействие соединения (41) с этаноламиноом. идет с получением единственно-го продукта (42a) и с высоким выходом (85%). При замещении бутиламиноом было выделено два продукта: 6-*n*-бутиламинозамещенный триазолотриазин (42b) с выходом 40% и 4-гидроксibuтил-6-бутиламино-триазоло[5,1-*c*]триазин (43a) с выходом 35%. Таким образом, одновременно с замещением под действием амина частично проходит гидролиз ацетильной защитной группы, что объясняется характером ацетильной группы как защитной группы, снимаемой основаниями.

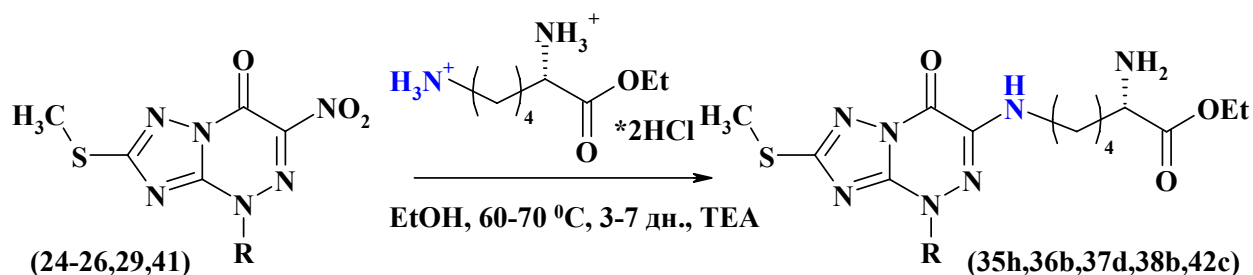


Строение полученных соединений было доказано на основе ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, а так же данных элементного анализа. В ЯМР ^1H спектрах соединений (42,43) присутствуют сигналы метилтиогруппы, уширенный сигнал протона NH-группы и мультиплеты алкильных фрагментов. В спектре соединения (43a) отсутствует синглет ацетильной группы ($\delta = 2.00\text{-}2.05$ м.д.) и присутствует уширенный синглет протона OH-группы ($\delta = 2.26$ м.д.).

В спектрах ЯМР ^{13}C соединений (42,43) сигналы C-атомов, принадлежащих гетероциклической структуре ($\delta = 142.33\text{-}168.43$ м.д.), имеют химические сдвиги, характерные для 5,1-*c* типа аннелирования триазинового цикла.

Удалось смоделировать также замещение нитрогруппы биогенными N-нуклеофилами. В качестве модельного соединения был выбран этиловый эфир *L*-лизина. Вследствие того, что сам лизин плохо растворяется в органических растворителях, а ис-

ходные триазолотриазины, напротив, являются гидрофобными соединениями, нами был использован этиловый эфир лизина.



R : 24,36b) Me; 25,37d) Et; 26,38b) Bn; 29,35h) (CH₃)₃C; 41,42c)

Взаимодействие алкилированных аналогов «Триазавирина» с этиловым эфиром *L*-лизина проводили в абсолютном этаноле во избежание нежелательного декарбоксилирования соединений (24-26,29,41) и умеренном нагревании (60-70°C) от трех дней до недели. Выход полученных соединений не превышает 20 %.

Строение соединений (35h,36b,37d,38b,42c) было установлено на основании данных ЯМР спектроскопии и элементного анализа. Для более точного соотнесения сигналов в ¹H и ¹³C ЯМР были исследованы ближние и дальние взаимодействия с помощью 2D HSQC и HMBC ЯМР спектра соединения (37d) (рис. 7).

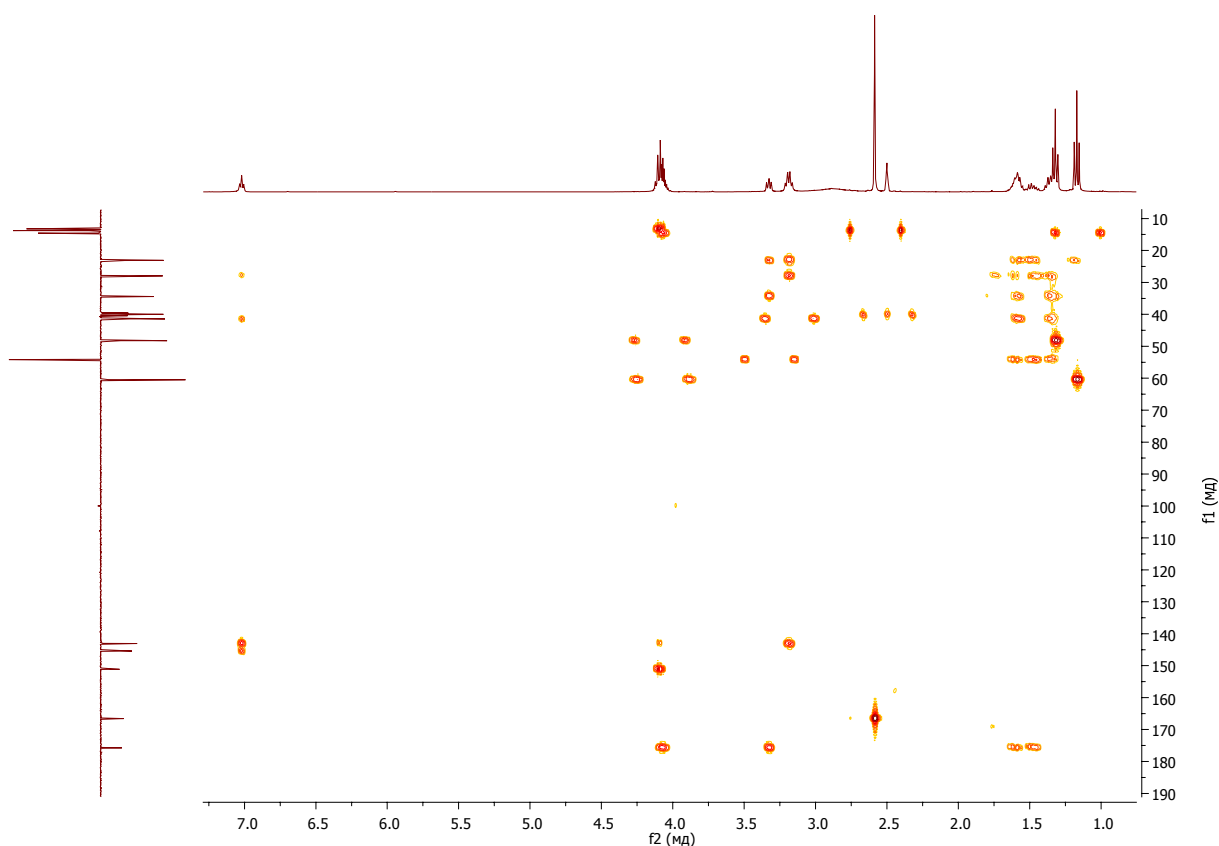


Рисунок 7. Спектр 2D HMBC соединения (37d)

В спектрах присутствуют синглеты метилсульфанильной ($\delta = 2.59-2.62$ м.д), мультиплеты N(4)-алкильных групп и этилового эфира лизина, в том числе однопротонный триплет NH-группы в области 6.84-7.02 м.д.

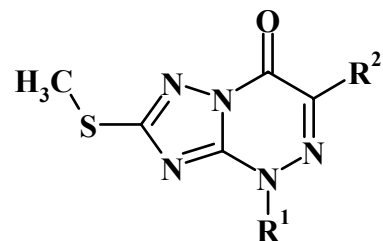
Продукт взаимодействия с аргинином, который также содержит концевую аминогруппу, получить в описанных выше условиях не удалось.

2.5.2. Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нулеофилами^{††}

Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нулеофилами представлены в таблице 17. Постановка эксперимента по определению минимальной токсической дозы и противовирусной активности описана в экспериментальной части.

^{††} Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Таблица 17. Данные противовирусной активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нулеофилами *in vitro*.



№	R ¹	R ²	МТД, мкг/мл	А/Петербург/16/09 А(Н3N2)		А/Виктория/35/72 А(Н3N2)		А/Петербург/5/09 А(Н1N1)	
				доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(lg)	доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(lg)	доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(lg)
35a	C(CH ₃) ₃	пирролидил	200			100	0.5	100	0.5
35b	C(CH ₃) ₃	NH(CH ₂) ₃ CH ₃	200			100	0.0	100	0.0
35c	C(CH ₃) ₃	NH(CH ₂) ₂ OH	200			100	1.0	100	1.0
35e	C(CH ₃) ₃	NHC(CH ₃)C ₂ H ₅	200			100	0.5	100	0.5
35g	C(CH ₃) ₃	N(CH ₃)(C ₃ H ₇)	200			100	0.5	100	0.5
42a	(CH ₂) ₄ OAc	NH(CH ₂) ₂ OH	>100	100	0				
42b	(CH ₂) ₄ OAc	NH(CH ₂) ₃ CH ₃	>100	100	0.5				
43a	(CH ₂) ₄ OH	NH(CH ₂) ₃ CH ₃	>100	100	0				
36a	CH ₃	NH(CH ₂) ₃ CH ₃	>100	100	1.0				
37a	C ₂ H ₅	NH(CH ₂) ₃ CH ₃	>100	100	0				
37b	C ₂ H ₅	NH(CH ₂) ₂ OH	>100	100	0				

Таблица 17 (продолжение)

37c	C₂H₅	морфолил	>100	100	0.5				
39a	CH(CH₃)O(C₂H₅)	NH(CH₂)₃CH₃	>100	100	1.0				
38a	CH₂Ph	NH(CH₂)₂OH	>100	100	1.5				
40b	H	NH(CH₂)₂OH	>100	100	0				

Как видно из данных, приведенных в таблице 17, некоторые продукты взаимодействия алкилированных аналогов «Тризавирина» с N-нуклеофилами (35с,36а,38а,39а) проявляют умеренную противовирусную активность и являются перспективными объектами дальнейшего исследования *in vivo*.

Определение противовирусного действия продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Тризавирина» и этилового эфира L-лизина.

Вирусы и клетки. Исследования проводились на первичной культуре клеток почек собаки (MDCK). Для оценки противовирусной активности препаратов использовали референс-вирус А/Перт/16/09 А(Н3N2). Данный штамм обладает достаточной гемагглютинирующей (1:128) и инфекционной активностью (7,0 lg ИД₅₀/50мкл).

Изучение токсичности препаратов.

Проверка токсичности препаратов осуществлялась по следующей схеме: навеска каждого препарата весом 5 мг отвешивалась в стерильную пробирку объемом 5 мл. Препараты разводили DMSO до концентрации 1 мг/мл, получая таким образом базовый раствор. Далее делали 6 последовательных двукратных разведений (100; 50; 25; 12,5; 6; 3 и 1 мкг/мл соответственно) на ростовой среде для клеток MDCK (α -MEM, Биолот, Санкт-Петербург), которые и использовали для проверки токсичности препаратов. Опыт ставили в 3 параллелях для каждой концентрации. Односуточную культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных планшетах, проверяли визуально в инвертированном микроскопе на целостность монослоя. Планшеты дважды отмывали средой, не содержащей сыворотки, после чего вносили препарат в соответствующей концентрации в объеме 100 мкл в каждую лунку. Планшеты инкубировали 72 часа при 37°C в присутствии 5% CO₂, после чего регистрировали результаты опыта визуально, оценивая целостность монослоя по сравнению с контролем клеток.

Оценка противовирусного действия препаратов на клетках MDCK.

Оценку противовирусной активности препаратов проводили для 1 концентрации каждого препарата: максимальной концентрации (из двукратных разведений), при которой выживало 100% клеток монослоя. Для оценки противовирусной активности использовали эталонный вирус А/Перт/16/09 А(Н3N2). Односуточную культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных планшетах, проверяли визуально в инвертированном микроскопе на целостность монослоя. Далее готовили десятикратные вирусные разведения на поддерживающей ростовой среде с добавлением трипсина (с -1 по -7). Планшеты с монослоем клеток дважды отмывали средой, не содержащей сыворотки, после чего вносили препараты в соответствующие лунки планшета в объеме 50 мкл. Контрольные лунки заполняли ростовой средой в равном объеме. Планшеты инкубировали 60 мин при 37°C в

присутствии 5% CO₂. Далее вносили вирус в соответствующих разведениях. Каждая концентрация препарата была поставлена в 3 параллелях для каждого вирусного разведения. Контрольные лунки заполняли ростовой средой в том же объеме. Также оставляли лунки для повторной проверки токсичности используемых концентраций. Планшеты инкубировали 48 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂, после чего регистрировали результаты опыта визуально, оценивая целостность монослоя по сравнению с контролем клеток и степень цитопатического действия вируса на культуру клеток, ставили реакцию гемагглютинации (РГА). Результаты биологический испытаний приведены в таблице 18.

Таблица 18. Данные противовирусной активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с этиловым эфиром *L*-лизина *in vitro*.

№	Формула	МТД, мкг/мл	Рабочая кон- центрация мкг/мл	Противовирусная активность (снижение ин- фекционной спо- собности в lgИД50/50мкл
36b		100*	100	0.5
35h		25	10	0.0
42c		100*	100	0.5

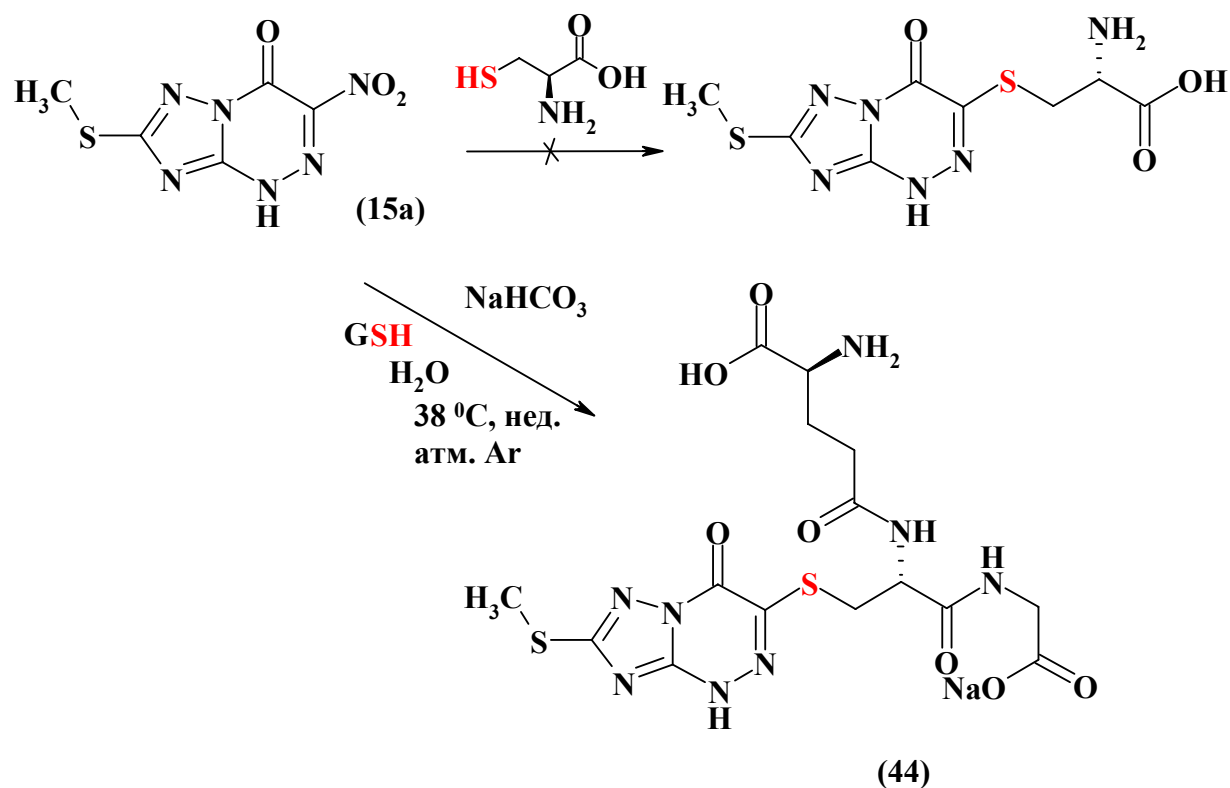
*Данные соединения не проявляли токсичность в концентрации 100 мкг/мл.

Как видно из данных, приведенных в таблице 18, соединения (**35h,36b,42c**) не проявляют противовирусной активности в отношении вируса А/Перт/16/09 А(Н3N2).

2.5.3. Взаимодействие с S-нуклеофилами

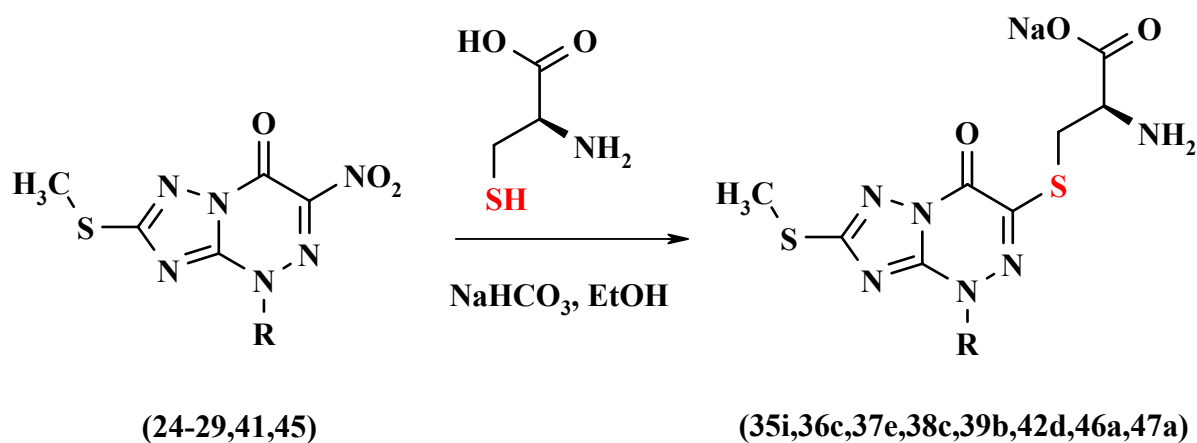
Моделирование процесса взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с цистеин-содержащими белками нами было осуществлено на примере цистеина - как ключевой аминокислоты и трипептида глутатиона как доступной модели цистеин-содержащих белков. При взаимодействии соединения (**15a**) с цистеином и глутатионом в температурных условиях, приближенных к температуре человеческого тела – 38°C, а так-

же в атмосфере аргона во избежание протекания нежелательной побочной реакции – образования цистина или окисленного глутатиона. Продукт нуклеофильного замещения нитрогруппы (44) с выходом 7 % удалось получить только после недельной выдержки реакционной массы в описанных выше условиях.

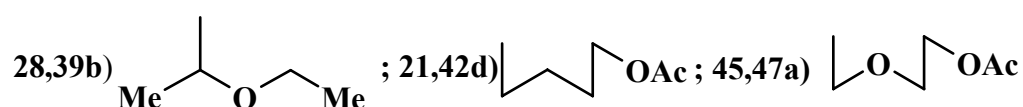


Какого-либо ковалентного взаимодействия «Триазавирина» с цистеином даже после двухнедельного инкубирования обнаружить не удалось даже на ТСХ.

При взаимодействии соединений (24-29,41,45) с *L*-цистеином при комнатной температуре в абсолютном этаноле в присутствии гидрокарбоната натрия происходит практически мгновенное замещение нитрогруппы с образованием 2-метилтио-4-*R*-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (35i,36c,37e,38c,39b,42d,46a,47a). Реакции протекают как в присутствии 1 эквивалента гидрокарбоната натрия, так и в его отсутствие; при этом получены продукты в солевой либо кислотной формах соответственно.

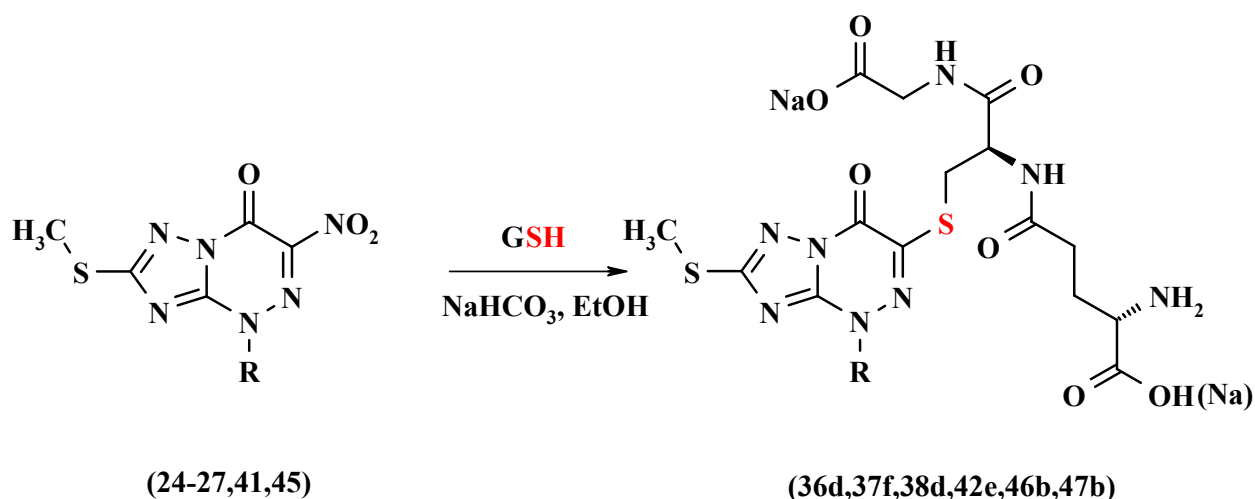


R : 24,36c) Me; 25,37e) Et; 29,35i) (CH₃)₃C; 27,46a) (CH₃)₃CCO₂CH₂; 26,38c) Bn;

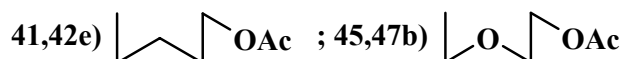


В ¹H ЯМР спектрах полученных соединений (35i,36c,37e,38c,39b,42d,46a,47a) присутствует синглет метилтиогруппы, сигналы протонов алкильных остатков и цистеинового фрагмента. Наблюдается расщепление сигналов протонов группы SCH₂, проявляющихся в виде однопротонных дублетов дублетов ($\delta = 4.13-4.18$, $J = 8.0-9.4$, $4.0-4.2$; $\delta = 3.88-3.98$, $J = 14.7-15.0$, $4.0-4.2$;))

Также гладко идет замещение нитрогруппы и при взаимодействии алкилированных аналогов «Триазавирина» (24-27,41,45) с более приближенным к цистеинсодержащим белкам трипептидом *L*-глутатионом. В результате образуются 2-метилтио-4-R-6-(глутатион-S-ил)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оны (36d,37f,38d,42e,46b,47b).



R : 24,36d) Me; 25,37f) Et; 27,46b) (CH₃)₃CCO₂CH₂; 26,38d) Bn;



Так же, как и для цистеиновых производных, ^1H ЯМР спектры соединений, содержащих остаток глутатиона в положении 6 (**36d,37f,38d,42e,46b,47b**), характеризуются синглетом метилтиогруппы, сигналами протонов алкильных остатков и глутатионового фрагмента. Расщепление сигналов протонов группы SCH_2 , проявляющихся в виде однопротонных дублетов дублетов с ($\delta = 3.71\text{-}3.82$; $\delta = 3.19\text{-}3.39$) также характерно и для соединений (**36d,37f,38d,42e,46b,47b**), что было определено при исследовании дальних взаимодействий с помощью 2D HMBC ЯМР спектра соединения (**37f**) (рис. 8).

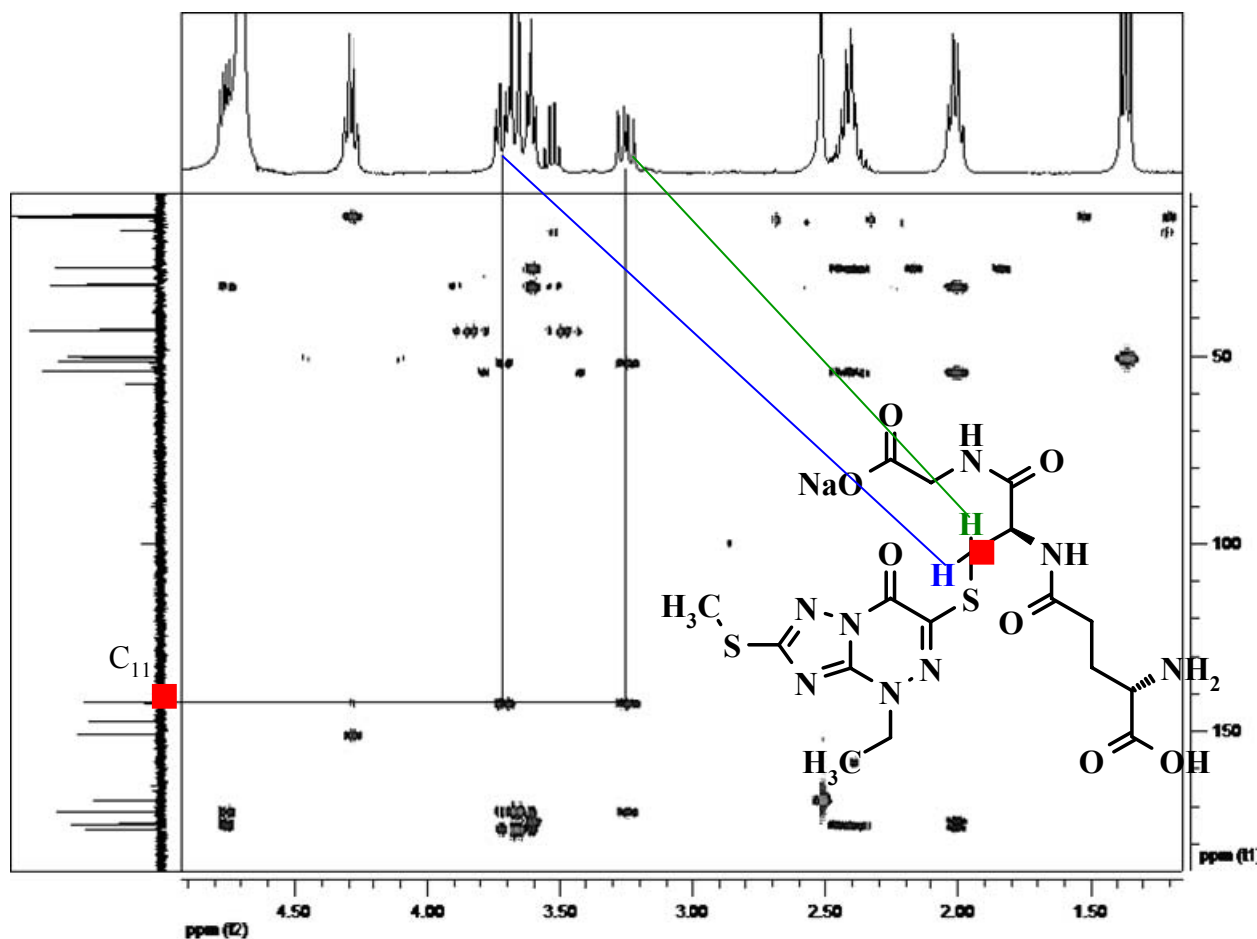
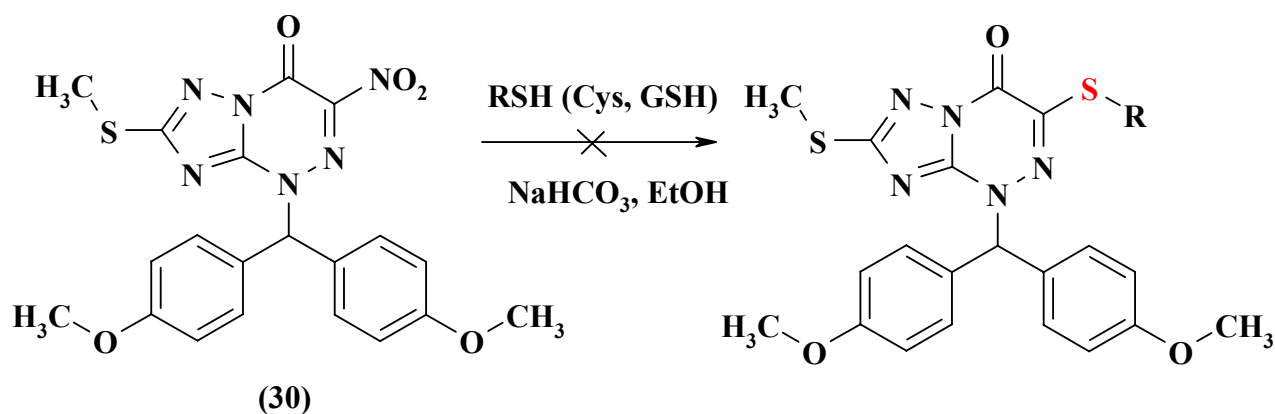
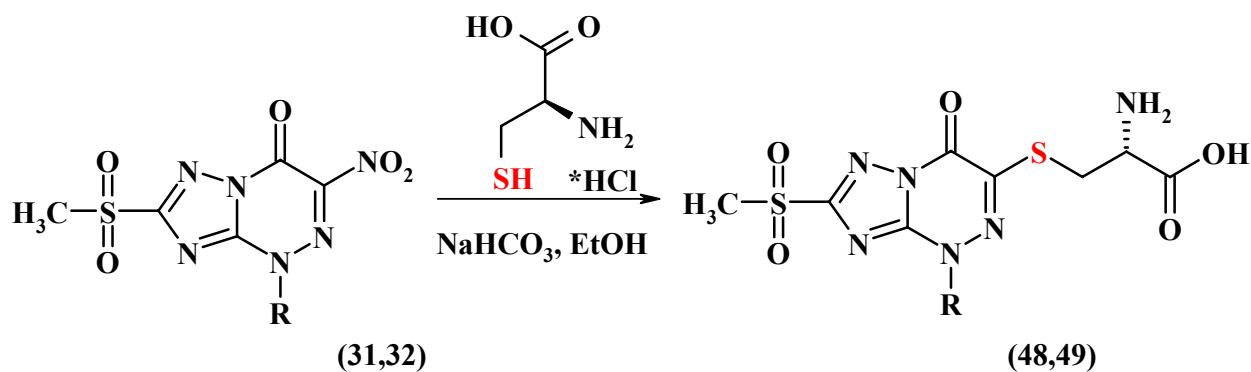


Рисунок 8. Спектр 2D HMBC соединения (**37f**)

Провести реакцию нуклеофильного замещения в 2-метилтио-4-(*p*-диметоксидифенил-метил)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазине (**30**) не удалось ни с цистеином, ни с глутатионом, вероятно, это можно объяснить стерическими затруднениями вследствие большого объема алкильного заместителя.



Из двух возможных конкурентных направлений реакции триазоло-1,2,4-триазинов (31,32) с цистеином при комнатной температуре также происходит замещение *только* нитрогруппы с сохранением метилсульфонильного фрагмента и образованием соединений (48,49), о чем свидетельствуют данные ^1H ЯМР и ИК-спектроскопии.



R = 31,48) CH₃, 32,49) C₂H₅

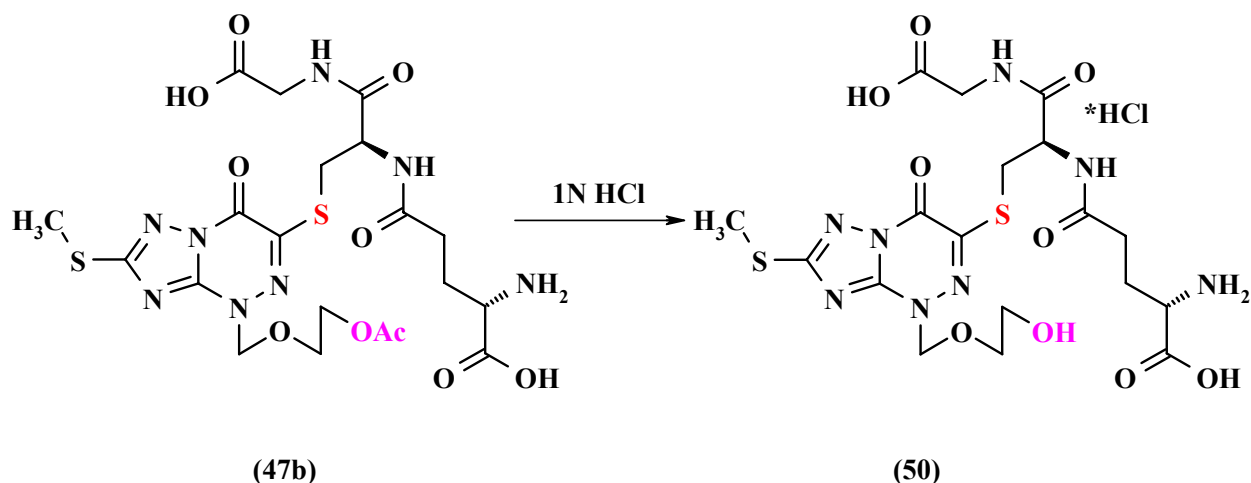
Получение 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов с цистеиновым фрагментом свидетельствуют о том, что и в физиологических условиях возможен ферментативный катализ синтеза таких соединений. Подобные превращения соответствуют ряду известных биохимических реакций, включая S- гуанилирование компонентов сигнальной редокс-системы [93] и модификацию клеточных и вирусных белков 8-нитрогуанозином [94]. Активация этих процессов характерна для гиперпродукции NO и пероксинитрита.

2.5.4. Удаление защитных групп

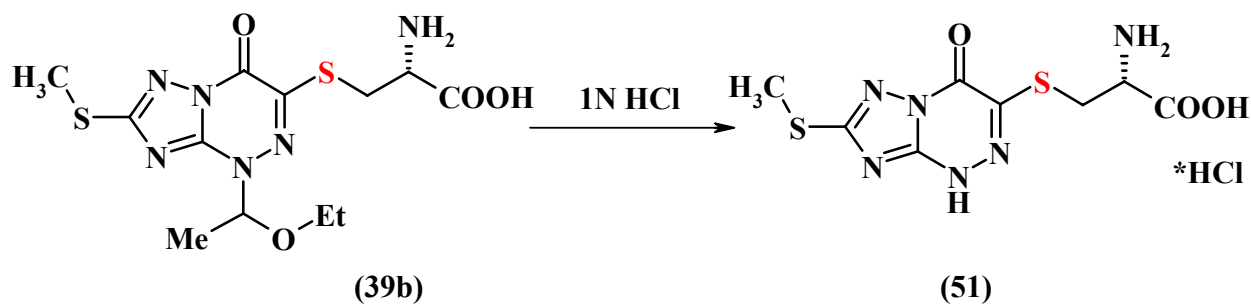
Завершающим этапом работы стало получение незамещенных по положению 4 триазолотриазинового цикла продуктов замещения нитрогруппы посредством удаления защитных групп в полученных ранее соединениях.

2-Метилтио-4-(2-гидроксиэтокси)метил-6-(глутатион-S-ил)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (50) содержит моделирующий фуранозильный фрагмент, подобно противовирусному препарату «Ацикловир» и был получен при обработке соединения

(47b) 1N раствором соляной кислоты вместо ожидаемого 2-метилтио-6-(глутатион-S-ил)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина.



Было установлено, что удаление этоксиэтильной группы осуществляется в относительно мягких условиях. Реакция была проведена в 1N растворе соляной кислоты при комнатной температуре в течение 72 часов. В результате были получено соединение (51) с выходом 53 %.



В ЯМР ^1H спектре производного (51) отсутствуют мультиплеты этоксиэтильного фрагмента, а также его строение было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа, 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (51) представляет собой моноклорид моногидрат. Структура молекулы приведена на рисунке 9. Основные длины связей и валентные углы приведены в приложении 2.

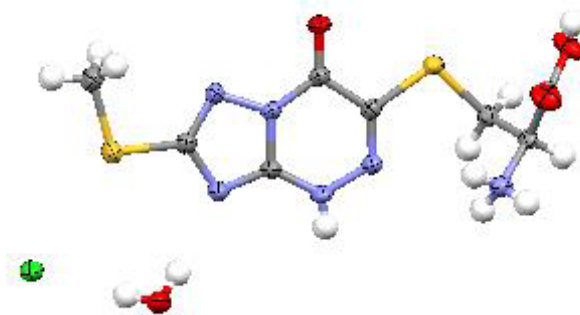
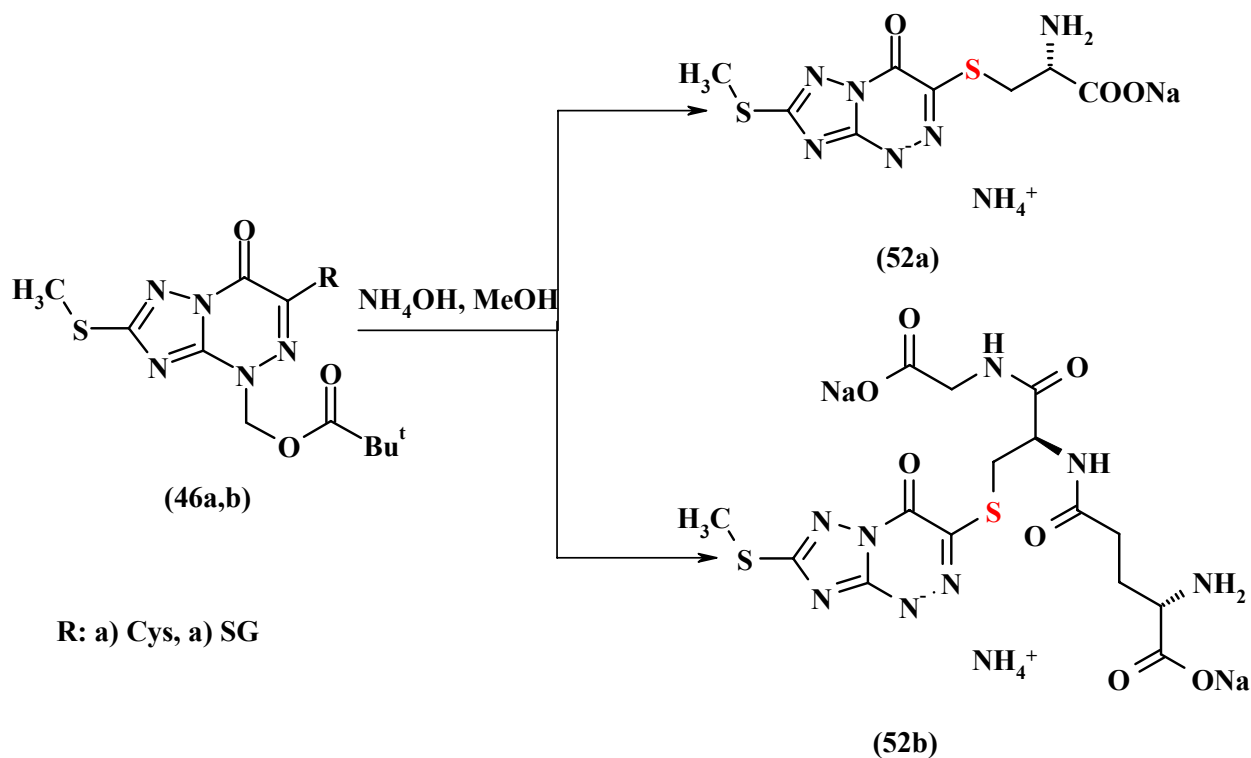


Рисунок 9. Структура 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина (51)

Пивалоилоксиметильная группа широко используется в качестве защитной, удаляемой в основных условиях, как упоминалось выше [90]. В результате удаления пивалоилоксиметильной группы в соединениях (46a,b) были получены незамещенные по положению 4 триазолотриазинового цикла цистеин- и глутатионпроизводные (52a,b). Реакции были проведены в растворе аммиака в метаноле при комнатной температуре в течение нескольких часов.



В ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах синтезированных соединений присутствуют сигналы цистеинового и глутатионового фрагментов и отсутствуют сигналы пивалоилоксиметильного остатка.

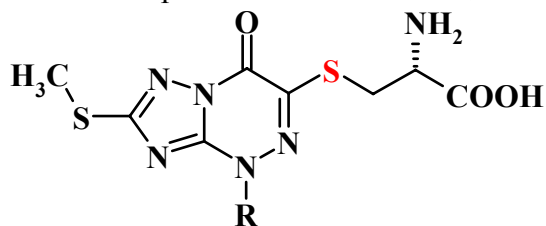
Так как при проведении реакций использовались оптически чистые *L*-цистеин и *L*-глутатион, то продукты замещения также обладают оптической активностью. Измеренные удельные оптические вращения приведены в экспериментальной части.

2.5.5. Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нуклеофилами^{§§}

Данные биологической активности продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с S-нуклеофилами представлены в таблицах 19 и 20. Постановка эксперимента по определению минимальной токсической дозы и противовирусной активности описана в экспериментальной части.

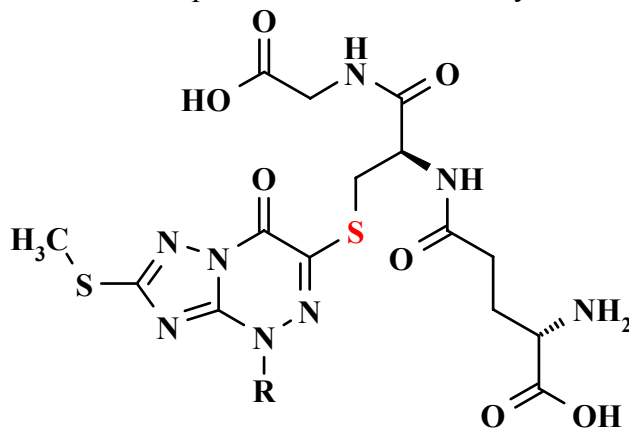
^{§§} Биологические испытания были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Таблица 19. Данные противовирусной активности продуктов взаимодействия «Триазавирина» и его алкилированных аналогов с цистеином *in vitro*



№	R	МТД, мкг/мл	А/Петербург/16/09 А(Н3N2)		А/С Петербург/5/09 А(Н1N1)	
			доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(lg)	доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(lg)
37e	C ₂ H ₅	>100	100	0		
38c	CH ₂ Ph	>100	100	0.5		
35i	C(CH ₃) ₃	588	125	0		
46a	CH ₂ OC(O)C(CH ₃) ₃	177	62,5	3.5	62,5	3.0
42d	(CH ₂) ₄ OAc	>100	100	0.5		
47a	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OAc	>100	100	0		
52a	NH ₄ ⁺	>100	100	0		

Таблица 20. Данные противовирусной активности продуктов взаимодействия «Триазавирина» и его алкилированных аналогов с глутатионом *in vitro*



№	R	МТД, мкг/мл	А/Петербург/16/09 А(Н3N2)	
			доза, мкг/мл	снижение титра вируса(lg)
28d	CH ₂ Ph	>100	100	0.5
46b	CH ₂ OC(O)C(CH ₃) ₃	>100	100	0
47b	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OAc	>100	100	0
50	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OH	>100	100	0.5
52b	NH ₄ ⁺	>100	100	0

Введение цистеинового фрагмента в качестве заместителя в молекулу «Триазавирина» (соединение **46a**) приводит к значительному усилению противовирусной активности *in vitro*, что, вероятно, делает эти соединения более близкими по метаболическим свойствам к обмену тиол-содержащих метаболитов в клетках, инфицированных вирусами гриппа.

2.6. Восстановление нитрогруппы как причина противовирусного действия «Триазавирина» (направление А).

При изучении данных рентгеноструктурного анализа третичной структуры гемагглютинина нами были идентифицированы дисульфидные связи для остатков цистеина в положениях 59, 292, 296, и 320 (рис.2 в разд. 2.2). Цис-292 связан с Цис-59, а Цис-296 образует Цис-XX-Цис-петлю с Цис-320. Предполагается, что в этом районе при активации гемагглютинина в процессе инфекции осуществляется изомеризация дисульфидных связей, что, естественно, предусматривает участие как протеиндисульфидизомеразы, так и других ферментов, включая Его-1, тиоредоксин, глутатионредуктазу [95-98].

Сравнительный анализ Цис-доменов ПДИ, строения активного центра фермента и ранее идентифицированных сайтов связывания «Триазавирина» на молекуле гемагглютинина приводит к следующим выводам:

1. Взаимодействие с гемагглютинином у молекулы «Триазавирина» не является высокоспецифичным, но может быть достаточно селективным в отношении обогащенных остатками цистеина доменов. Однако в процессе созревания гемагглютинин находится в комплексе с ПДИ, обеспечивающей контроль образования и изомеризации дисульфидных связей [98], поэтому взаимодействие потенциальных ингибиторов («Триазавирина») следует рассматривать как интерференцию с каталитическими процессами, происходящими в составе этого комплекса.

2. Поэтому «Триазавирин» может взаимодействовать как с субстратом ПДИ – вирусным белком гемагглютинином, так и с другими компонентами, обеспечивающими изомеризацию дисульфидных связей в структуре гемагглютинина.

Kersteen et al. провели детальное изучение структуры активных центров ПДИ и родственных ему ферментов [95]. В таблице 21 представлены структуры активных центров ПДИ животных, тиоредоксина *E. Coli* и белка Dsb *E. Coli*. Обращает на себя внимание тот факт, что для всех каталитических центров характерно наличие как положительно заряженных аминокислотных остатков, так и ароматических аминокислот. В частности, с N-конца сайтов располагается триптофан или фенилаланин. Это свидетельствует о том, что характер взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и каталитическими

центрами ПДИ и, например, тиоредоксином носит характер кислотно-основного и стэкинг-взаимодействия.

Таблица 21. Свойства оксидоредуктаз различного происхождения

Белки	Активный сайт	Функции в клетке	Дитиол- оксидазная активность	Дисульфид-редуктазная активность	Дисульфидизомеразная активность
ПДИ-животных	WCGHCK	Оксидаза/изомераз а	100%	100%	100%
Тиоредоксин <i>E.coli</i>	WCGPCK	Редуктаза	3	6	93
Белок Dsb <i>E.coli</i>	FCPHCY	Оксидаза	0	3	4

Изучение оксидазной, редуктазной и дисульфидизомеразной активностей у перечисленных ферментов показало, что только ПДИ характеризуется полным спектром каталитических активностей. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что каталитический центр ПДИ, имеющий структуру WCGHCK, представляется оптимальным для взаимодействия с молекулами типа «Триазавирин». С одной стороны, для молекулы «Триазавирин» возможно эффективное взаимодействие по заряду с остатком лизина (K), с другой стороны – стэкинг-взаимодействие с триптофаном, находящимся в непосредственной связи с каноническим цистеином. Поэтому на основании этих данных нами проводились исследования по тестированию «Триазавирин» в качестве ингибитора ПДИ.

Оценка влияния «Триазавирин» на ферментативную активность протеиндисульфидизомеразы (ПДИ) проводилась *in vitro* с использованием набора «ПДИ Inhibitor Screening Assay Kit» (Abcam, кат. номер ab139480)^{***}. Набор основан на катализируемом ПДИ восстановлении инсулина в присутствии DTT (дитиотреитол), приводящим к образованию инсулиновых агрегатов, которые связываются с флуорогенным реагентом «ПДИ Detection Reagent». В качестве ингибитора ПДИ в наборе используется бацитрацин (BAC).

Анализ влияния «Триазавирин» на ферментативную активность ПДИ проводили в полном соответствии с инструкцией производителя. Общая схема анализа приведена на рисунке 10.

^{***} Эксперимент по воздействию «Триазавирин» на ПДИ был проведен совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, автор выражает благодарность за помощь В.В. Егорову и С.А. Клотченко

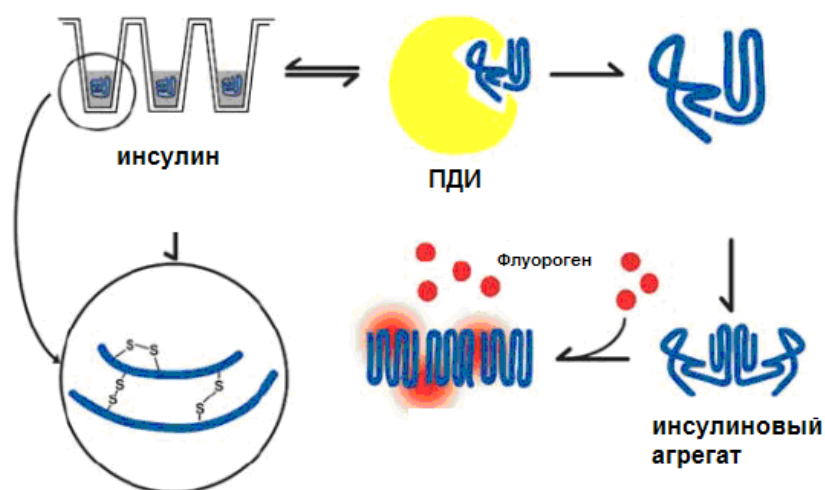
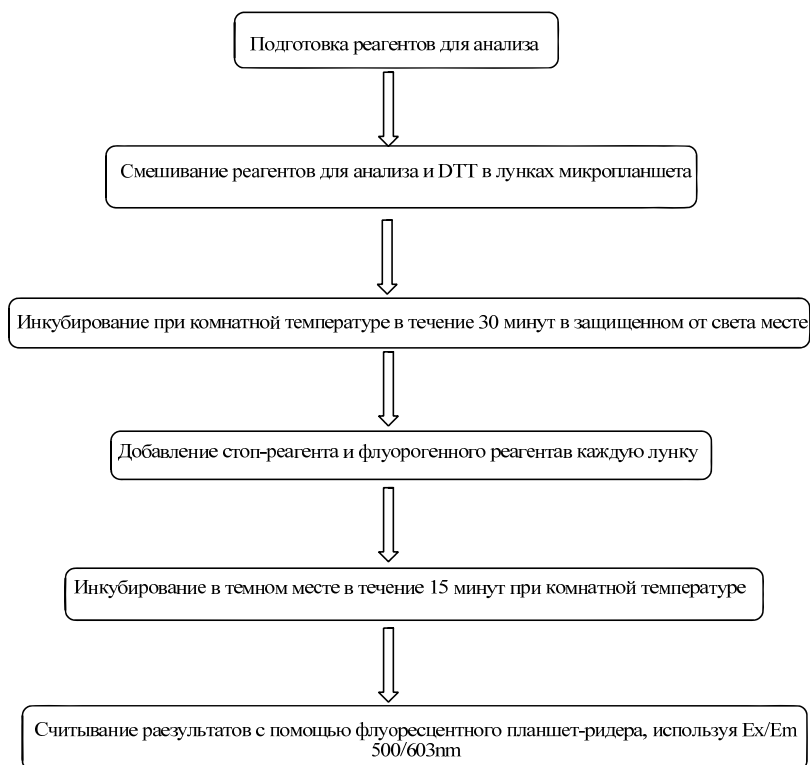


Рисунок 10. Схема проведения анализа ингибирования ПДИ с помощью набора «ПДИ Inhibitor Screening Assay Kit» (Abcam)

В эксперименте использовали «Триазавирин» в диапазоне концентраций 0-130 мМ. Результаты анализа представлены на рисунке 11.

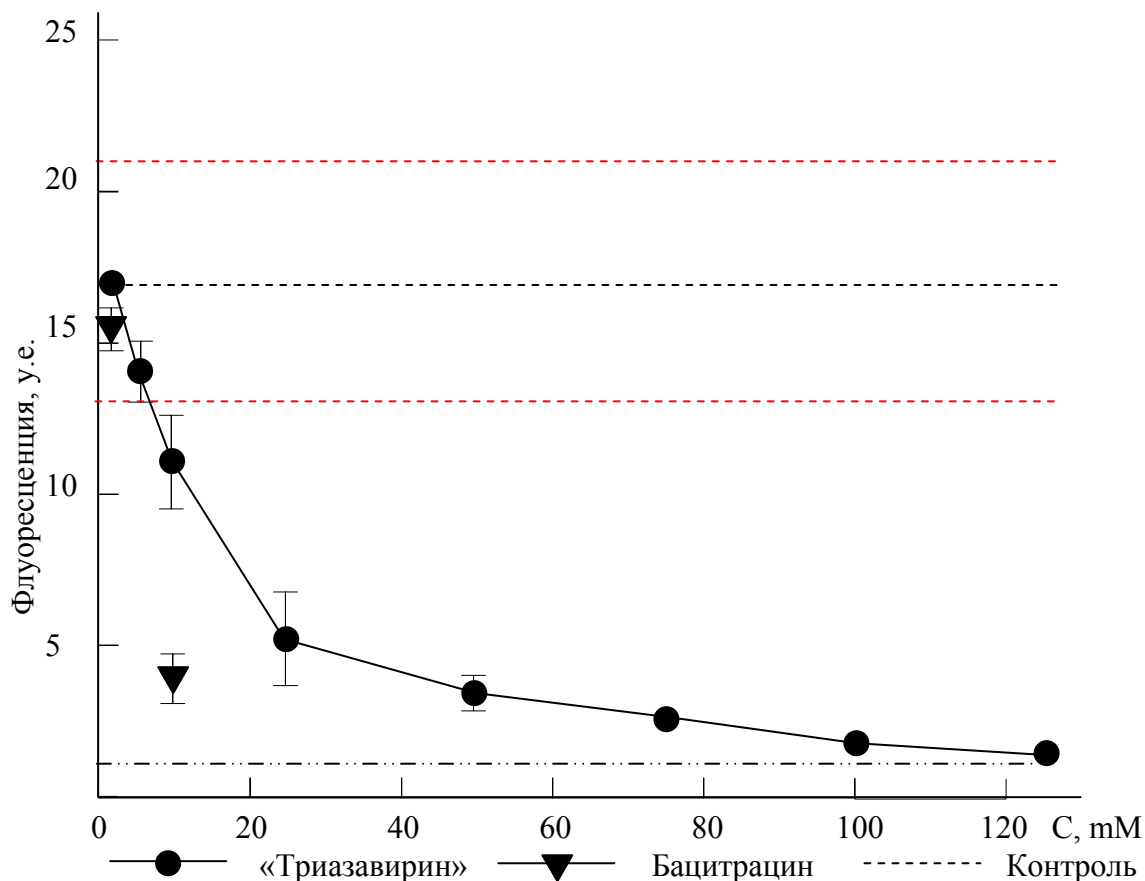


Рисунок 11. Ингибирующее действие «Триазавирина» в отношении ПДИ

По оси абсцисс - концентрации веществ в пробе, по оси ординат - флуоресценция реагента, детектирующего активность ПДИ. Красными линиями ограничен диапазон колебаний величины флуоресценции, соответствующей активности ПДИ в отсутствии ингибитора. Чёрные треугольники - точки, соответствующие двум концентрациям ингибитора ВАС, рекомендованного производителем к использованию в качестве контрольного ингибитора. Чёрные кружки соответствуют величине флуоресценции в присутствии различных концентраций «Триазавирина». Из данных, приведенных на рисунке 11 видно, что в концентрации 125 мМ «Триазавирин» ингибирует активность ПДИ на порядок (снижение флуоресценции с 17 до 1,5 у.е.).

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что в присутствии «Триазавирина» не образуется способного к связыванию с флуоресцентным красителем продукта действия ПДИ (агрегатов инсулина). Это свидетельствует о том, что в присутствии «Триазавирина» происходит ингибирование активности ПДИ *in vitro*. Такое воздействие «Триазавирина» возможно за счет способности нитрогруппы окислять свободные SH-группы с образованием дисульфидных связей (-S-S-), в результате чего происходит восстановление «Триазавирина». В пользу того, что «Триазавирин» восстанавливается в процессе ингибирования вирусов, говорит и тот факт, что при изучении фармакокинетики препарата ранее

было зафиксировано наличие 2-метилтио-6-амино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она, однако противовирусным действием *in vitro* это соединение не обладает [99]. Первоначально считалось, что это обусловлено обычным действием редуктаз, не относящееся к механизму противовирусного действия.

Воздействие препарата на ПДИ можно представить в виде рисунка 12.

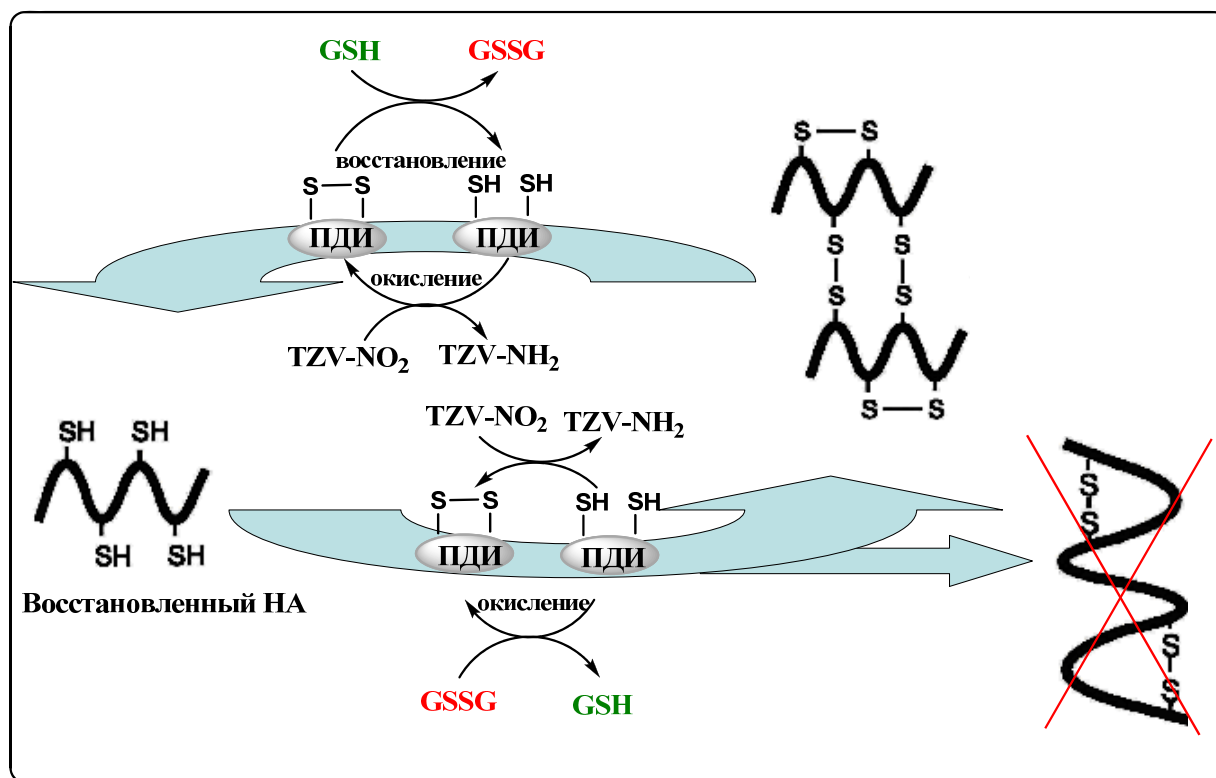
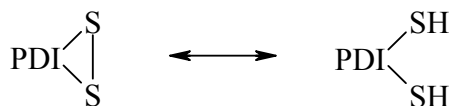


Рисунок. 12. Механизм ингибирующего действия «Триазавирин» в отношении ПДИ и гемагглютинаина

ПДИ контролирует изомеризацию дисульфидных связей в клеточных и вирусных белках путем окисления и восстановления SH-групп остатков цистеина [98, 100-102]. Действие ПДИ можно описать следующим образом:



В результате восстановительного и окислительного циклов ПДИ катализирует изомеризацию (смещение) дисульфидных связей, обеспечивая переход белка в оптимальную для функционирования конформацию. Действие ингибитора, в данном случае «Триазавирин», приводит к нарушению этого цикла в комплексе ПДИ - гемагглютинин. Одновременно с этим могут образовываться дисульфидные связи между остатками цистеина, которые нарушают структуру белка и приводят как к его инактивации, так и развитию окислительного стресса в клетке, что нарушает жизненный цикл репродукции вируса и может привести к апоптозу (гибели) клеток. Поэтому «Триазавирин», обладая более высо-

ким сродством к активному центру, вызывает окисление SH-групп активного центра и смещает равновесие, контролируемое GSH в сторону окисления и обратимой инактивации фермента.

Как было сказано выше, особый интерес в качестве лекарственной мишени в молекуле гемагглютинаина представляют домены, более обогащенные остатками цистеина. Вторым способом воздействия на данные домены является нековалентное взаимодействие «Триазавирина» с цистеиновым доменом гемагглютинаина, в области которого существуют две протяженных дисульфидных связи $^{59}\text{Cис-Цис}^{292}$ и $^{296}\text{Cис-Цис}^{305}$. Нарушение изомеризации дисульфидных связей в домене, выделенном на рисунке 13, может иметь наиболее важные последствия в нарушении функциональной активности НА и приводить к его инактивации, так как домен CNTTC является основным докинг-сайтом в молекуле НА, поэтому изомеризация S-S-связей в этом участке имеет принципиальное значение для активности этого белка и инфекционности вируса гриппа.

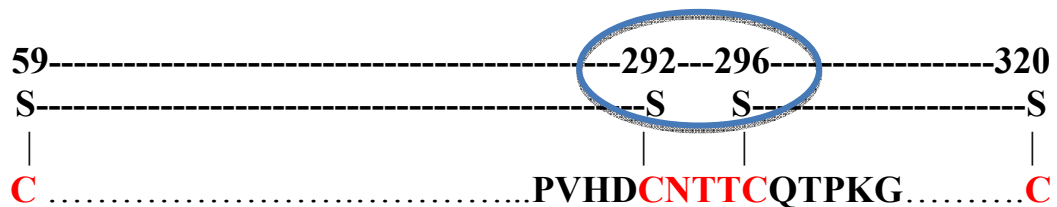


Рисунок 13. Дисульфидные связи в молекуле гемагглютинаина в положениях 59-292 и 293 – 320 с выделением домена CNTTC, содержащего два остатка Цистеина, разобценных тремя аминокислотами.

Доказательством того, что «Триазавирин» способствует образованию S-S связей в молекуле гемагглютинаина являются исследования MALDI-TOF MS, приведенные ниже^{†††}.

В качестве модельных пептидов были выбраны фрагменты гемагглютинаина - НА-I, НА-II и НА- III, имеющие в своей последовательности по два остатка цистеина. Пептид НА-I вообще не содержит основных аминокислот, но содержит остаток Asp. Пептиды НА-II и НА- III, напротив, содержат остатки Lys. Последовательность исследуемых пептидов представлена в таблице 22. Масс-спектрометрический анализ показал, что все пептиды соответствуют заявленным последовательностям и регистрируются в виде квазимолекулярных ионов $M+H^+$ или $M+Na^+$.

^{†††} Исследования MALDI-TOF MS по окислению пептидов «Триазавирином» были проведены совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, автор выражает благодарность за помощь в.н.с. О.А. Миргородской

Таблица 22. Последовательность и молекулярная масса модельных пептидов

№	Пептид	Последовательность	М.м.
1	HA-I	DC <u>N</u> TT <u>C</u> Q	783.25
2	HA-II	YG <u>N</u> CNT <u>K</u> <u>C</u> Q	1029.4
3	HA-III	L <u>C</u> KLGGIAPLHLG <u>K</u> CN-амид	1634.9

Была проведена серия кинетических экспериментов по окислению как каждого из этих пептидов по отдельности, так и их смесей, в присутствии «Триазавирина» и в его отсутствии. Постановка эксперимента описана в экспериментальной части.

На рис. 14 представлены масс-спектры пептида HA-I, полученные для смесей п.1-2. Ниже на рис. 15 представлены фрагменты из этих масс-спектров с изотопным распределением для мономерных и димерных форм HA-I.

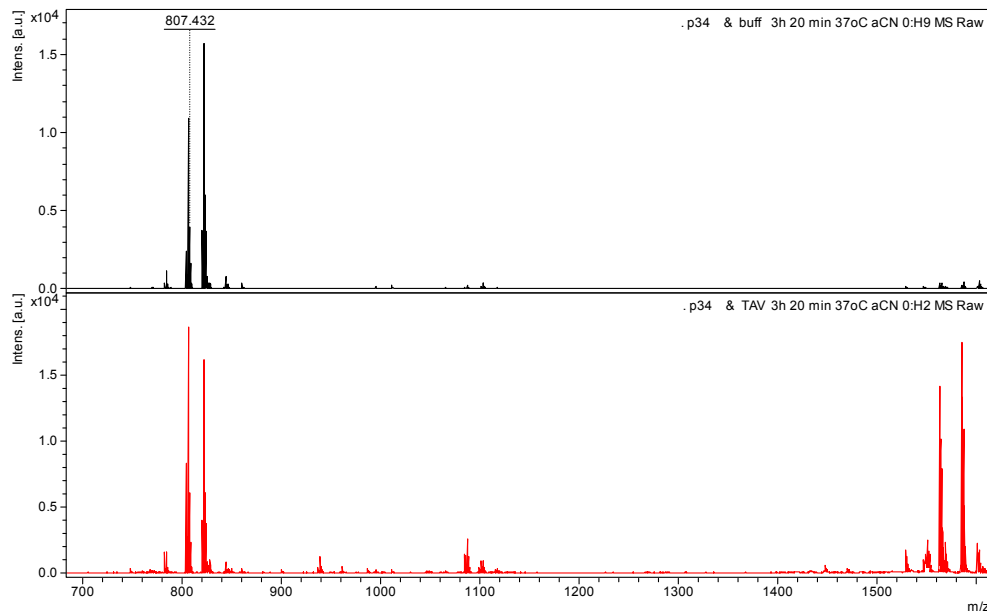


Рисунок 14. MALDI- масс-спектры смесей пептида HA-I в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом).

Мономерные и димерные формы пептида HA-I регистрируются в виде набора квази-молекулярных ионов с H^+ и с Na^+ . Набор пиков слева соответствует различным ионам мономера пептида HA-I, набор пиков справа – димерам пептида HA-I.

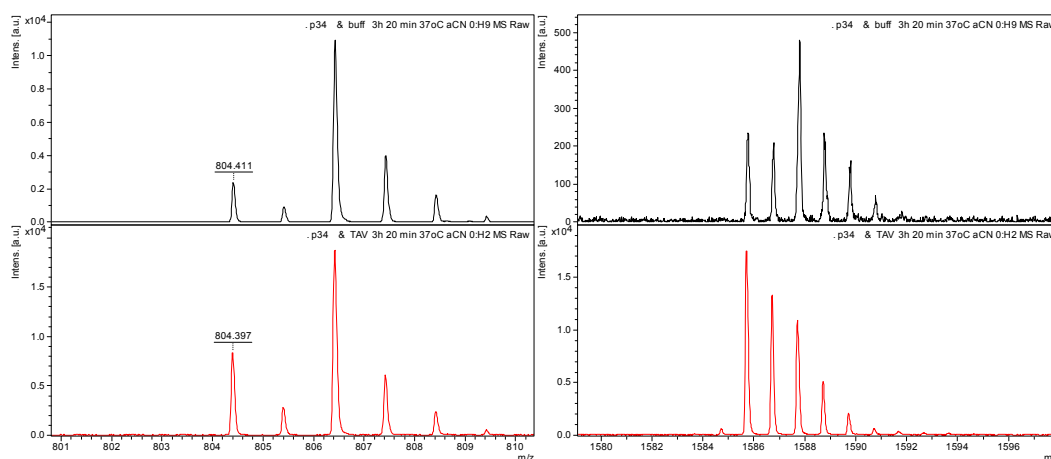


Рисунок 15. Фрагменты MALDI- масс-спектров смесей пептида НА-I в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом), представленных на рис. 14. Наборы пиков соответствуют мономерной (слева) и димерной (справа) формам пептида НА-I, регистрируемых в виде квазимолекулярных ионов с Na^+ и с H^+

Из представленных на рис. 14 и 15 данных для смесей с НА-I, во-первых, однозначно следует, что присутствие «Триазавирина» способствует образованию димерных форм пептида. При этом каждая из форм пептида представлена в виде смеси продуктов с разной степенью окисления (рис. 15). Для мономерных форм ионы с $m/z = 804$ соответствуют пептиду ($\text{НА-I} + \text{Na}^+$) с внутримолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 806$ соответствуют пептиду ($\text{НА-I} + \text{Na}^+$) с двумя свободными тиольными группами (-SH). Для димерных форм ионы с $m/z = 1565.7$ соответствуют дипептиду ($2\text{НА-I} + \text{H}^+$) с одной межмолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 1563.7$ соответствуют пептиду ($2 \text{НА-I} + \text{H}^+$) с двумя межмолекулярными S-S связями. Во-вторых, из сравнения соотношения интенсивностей относящихся к разным степеням окисления тиольных групп, следует, что присутствие «Триазавирина» увеличивает степень окисления для обеих форм пептида. Для мономерной формы – с 16% до 41%, для полностью окисленной формы димера – с 40% до 70%. Специально отметим, что при очевидном влиянии «Триазавирина» на окисление тиольных групп, продуктов ковалентного связывания с «Триазавирина» масс-спектрометрически не зарегистрировано.

Аналогичную картину влияния «Триазавирина» наблюдали для пептида НА-II (смеси п. 3,4). Увеличивалось количество димерных форм и степень окисления как для мономера, так и для димера.

Для пептида НА-III результаты масс-спектрометрического анализа (смеси п. 5,6) представлены на рисунке 16. Ниже на рисунке 17 представлены фрагменты из этих масс-спектров с изотопным распределением для мономерных и димерных форм НА-III.

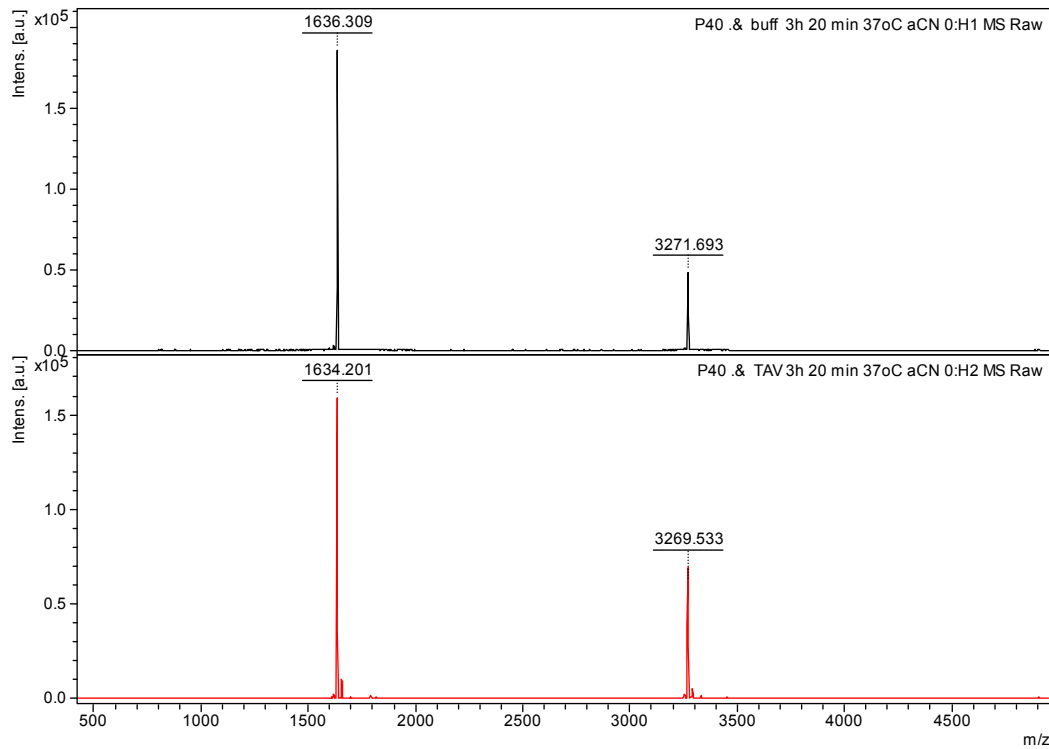


Рисунок 16. MALDI- масс-спектры смесей пептида НА-III в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом). Мономерные и димерные формы пептида НА-III регистрируются в виде набора квазимолекулярных ионов с H^+ . Набор пиков слева соответствует различным ионам мономера пептида НА-III, набор пиков справа – димерам пептида НА-III.

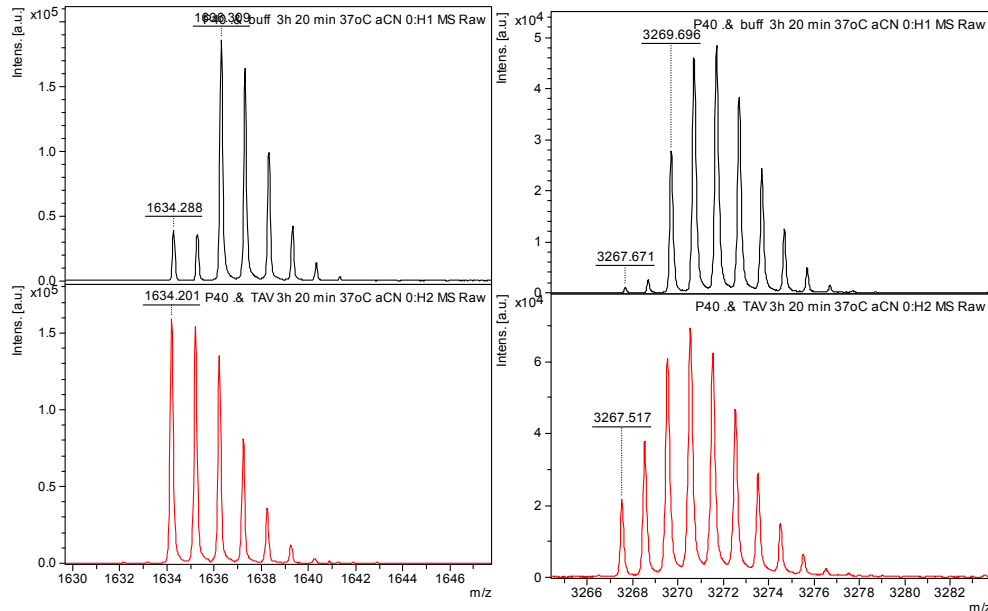


Рисунок 17. Фрагменты MALDI- масс-спектров смесей пептида НА-III в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом), представленных на рис. 16. Наборы пиков соответствуют мономерной (слева) и димерной (справа) формам пептида НА-III, регистрируемых в виде квазимолекулярных ионов с H^+

Из представленных на рисунках 16, 17 данных для смесей с НА-III следует, что присутствие «Триазавирина» также как и для пептидов НА-I и НА-II способствует образованию димерных форм пептида. И при этом каждая из форм пептида представлена в ви-

де смеси продуктов с разной степенью окисления (рис. 17). Для мономерных форм ионы с $m/z = 1634.3$ соответствуют пептиду (НА-III + H⁺) с внутримолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 1636.3$ соответствуют пептиду (НА-III + H⁺) с двумя свободными тиольными группами (-SH). Для димерных форм ионы с $m/z = 3269.7$ соответствуют дипептиду (2 НА-III + H⁺) с одной межмолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 3267.7$ соответствуют пептиду (2 НА-III + H⁺) с двумя межмолекулярными S-S связями. Также как и для двух других пептидов в каждой форме увеличивается степень окисления в присутствии «Триазавирина». Отметим, что для НА-III наблюдается существенно меньше образование полностью окисленных форм по сравнению с пептидами НА-I и НА-II. Отметим, что при очевидном влиянии «Триазавирина» на окисление тиольных групп и в этом пептиде, продуктов ковалентного связывания с «Триазавирином» масс-спектрометрически не зарегистрировано.

Рассмотрим далее как проходит окисление, если мы имеем одновременно смесь пептидов НА-I и НА-III в присутствии «Триазавирина» и без него. Результаты этого эксперимента представлены на рисунке 18, а на рисунке 19 - фрагменты масс-спектров с детальным распределением мономерных и димерных форм всех зарегистрированных продуктов.

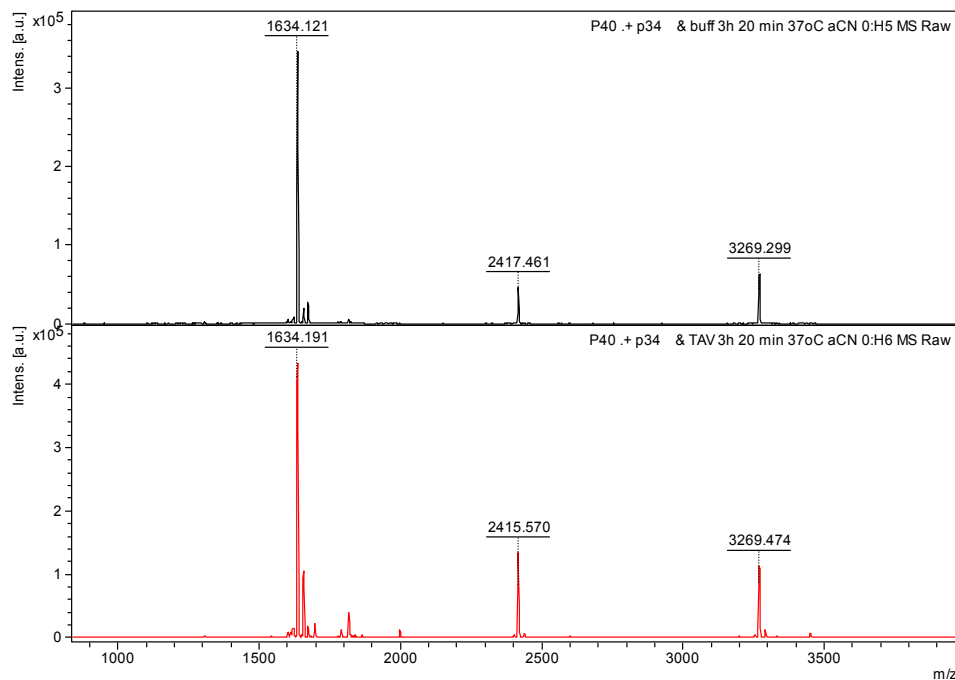


Рисунок 18. MALDI- масс-спектры смесей пептидов НА-I и НА-III в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом). Мономерные и димерные формы пептидов НА-I и НА-III регистрируются в виде набора квазимолекулярных ионов с H⁺. Набор пиков слева соответствует различным ионам мономера пептида НА-III, набор пиков справа – димерам пептида НА-III.

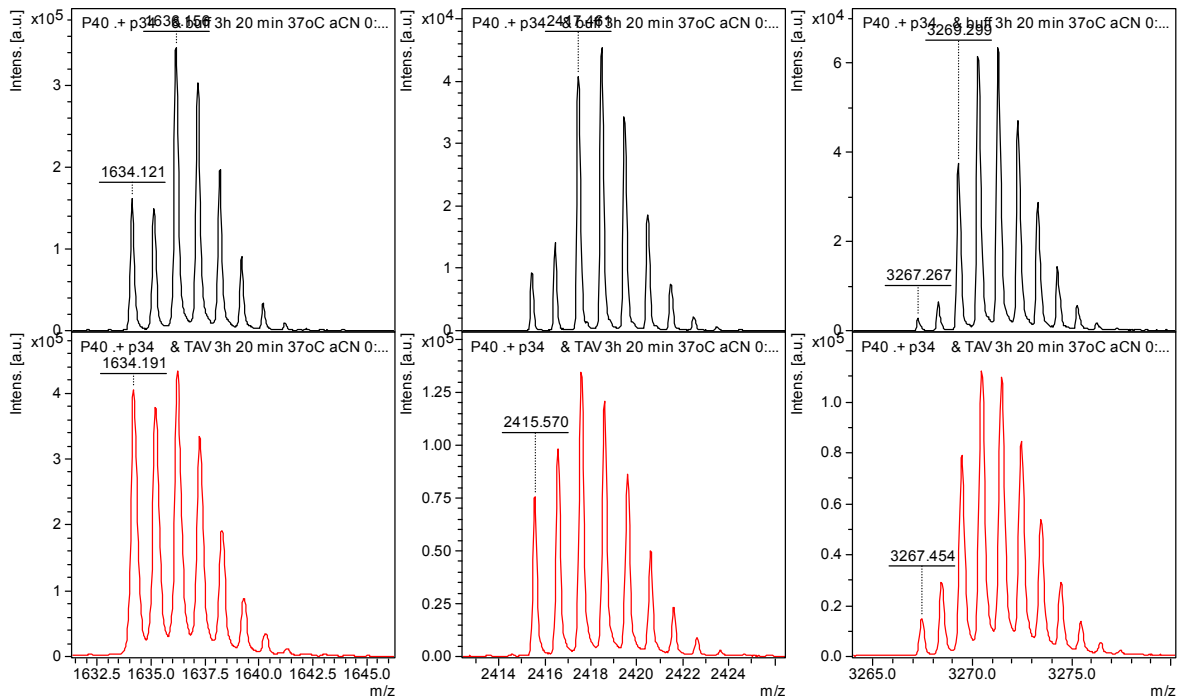


Рисунок 19. Фрагменты MALDI- масс-спектров смесей пептидов HA-I и HA-III в присутствии «Триазавирин» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом), представленных на рис. 18. Наборы пиков соответствуют мономерной (слева) и димерной (справа) формам пептидов HA-I и HA-III, регистрируемых в виде квазимолекулярных ионов с H^+

Анализ полученных данных показывает, что окисление смеси пептидов HA-I и HA-III не является аддитивным результатом окисления каждого из пептидов отдельно. В этом случае мы наблюдаем отсутствие как мономерных так и димерных форм для HA-I (см. рис. 14). Для этого пептида мы наблюдаем его ковалентное связывание с пептидом HA-III, т.е. образование исключительно гетеродимеров с одной или двумя дисульфидными связями (ионы с $m/z = 2417.6$ и с $m/z = 2415.6$, соответственно). При этом пептид HA-III наряду с образованием гетеродимеров образует моно- и гомодимеры. Причем степень окисления HA-III в гетеродимере выше, чем монодимере.

Можно предположить, что в растворах существует некоторое равновесие между свободными пептидами и их комплексами в виде моно- или гетеродимеров, если в смеси присутствует более одного пептида.

Таким образом, из полученных данных следует, что «Триазавирин» однозначно способствует образованию S-S связей, однако тип продуктов (моно- или димера) определяется свойствами самих пептидов.

Таким образом, действие «Триазавирин», являющегося лигандом и окислителем тиоловых групп в белках, интерферирует с активностью ПДИ и является ингибитором репродукции вирусов, белки которых зависят от каталитической активности ПДИ. Второе важное обстоятельство: нитрогруппы различных природных соединений и лекарственных

препаратов становятся более реакционно активны в условиях нитрозильного стресса, то есть генерирования пероксинитрита (ONOO^-). Поэтому активность препарата «Триазавирин» может возрастать в условиях, например развития вирусной пневмонии. Этим объясняется высокий проективный эффект «Триазавирина» при инфекциях, вызванных особо опасными вирусами, быстро вызывающими легочные осложнения.

Таким образом, установлен, по крайней мере, один способ ингибирующего действия «Триазавирина» на активность гемагглютинаина, участвующего в ключевых стадиях вирусного инфицирования и развития инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы синтеза новых 2-R-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов.
2. Разработан альтернативный метод синтеза «Триазавирина» и его гомологов, заключающийся в синтезе и алкилировании динатриевой соли 2-тио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она.
3. Сформулирована концепция возможных превращений «Триазавирина» в организме.
4. В соответствии с предложенной концепцией разработаны методы синтеза сульфоксидов и сульфонов в ряду 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов в качестве модели окисления гомологов «Триазавирина».
5. Исследовано замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оне биогенными S-нуклеофилами.
6. Разработаны методы N-алкилирования 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов для получения аналогов неприродных нуклеозидов.
7. Разработаны методы замещения нитрогруппы в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах.
8. Выявлены структурные фрагменты «Триазавирина» существенные для его противовирусной активности.
9. Установлено ингибирующее действие «Триазавирина» на протеин дисульфидизомеразу.
10. Среди синтезированных аналогов «Триазавирина» выявлены новые активные противовирусные соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{19}F были записаны на спектрометре Bruker AVANCE II в DMSO- d_6 , CDCl_3 и D_2O с использованием ТМС в качестве внутреннего стандарта для ЯМР ^1H и трифторхлорметана - для ЯМР ^{19}F . Рабочие частоты для ядер ^1H , ^{13}C и ^{19}F 400, 100 и 376 МГц соответственно. Химические сдвиги приведены в шкале δ , м.д., константы спин-спинового взаимодействия – в Гц.

Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществлялся методом ТСХ с использованием пластин Poligram Aloх N/UV-254. Колоночная хроматография проводилась на силикагеле фирмы Sigma Aldrich с диаметром пор 60Å, размер зерен 230–400 меш.

Элементный анализ был проведен на автоматическом CHNS/O анализаторе Perkin-Elmer 2400 Series II. Масс-спектры (электроспрей) записаны на приборе Varian MAT-311A.

ИК-спектры (4000–400 cm^{-1}) полученных соединений были зарегистрированы на спектрометре «Perkin Elmer Spectrum One B FTIR» в тонком слое образца (DRA), максимум частот поглощения приведены в cm^{-1} .

Рентгеноструктурные исследования производных проведены по стандартной процедуре на дифрактометре Xcalibur 3, оборудованном CCD детектором (λMo , графитовый монохроматор, 295(2)К, ω -сканирование, размер шагов сканирования – 1.0° , время измерения фрейма – 50 сек.) Структуры были расшифрованы прямым методом [103] и уточнены в полноматричном анизотропном приближении метода наименьших квадратов для всех отражений неводородных атомов (изотропном для атомов водорода) с использованием программы SHELXL-97 [104]. Данные PCA представлены в таблицах в приложениях 1 и 2.

Углы вращения были измерены на спектрофотополариметре Perkin Elmer 343 Plus.

В работе использовался препаративный жидкостной хроматограф Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором, препаративным автосамплером (900 мкл) и колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 PrepHT 21.2 * 150 мм, размер частиц 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Соединение (**1a**) получают по описанной ранее методике [2].

Исследование противовирусной активности и токсичности полученных соединений *in vivo*^{*}**

^{***} Исследование противовирусной активности полученных соединений на животных были проведены сотрудниками ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Вирус. В работе был использован адаптированный к мышам вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1). Вирус пассировали в аллантоисной полости 10-12 дневных куриных эмбрионов в течение 48 часов при 36°C.

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 12-16 г получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в условиях вивария ФГБУ НИИ гриппа. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 1 неделю.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных была использована вируссодержащая аллантоисная жидкость куриных эмбрионов. Из нее готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после чего инфекционная активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [105].

Исследуемые препараты вводили животным перорально через желудочный зонд в объеме 0,2 мл по лечебной схеме (один раз в сутки в течение 5 дней начиная с 1-ых суток после инфицирования животных). Препарат сравнения применяли по той же схеме. В качестве плацебо контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы. В каждую опытную группу брали по 10 животных.

Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 10 LD50. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней, т.е. срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе рассчитывали индекс защиты (IP, отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе) в соответствии со следующей формулой:

$IP = ((M_c - M_e) / M_c) \times 100\%$, где M_c и M_e – смертность в процентах в контрольной и опытной группах соответственно.

Исследование противовирусной активности и токсичности полученных соединений *in vitro*^{§§§}

Для исследования противовирусного действия использовали микротетразолиевый тест (ММТ) – тест, позволяющий определить противовирусную активность по уровню ци-

^{§§§} Исследования противовирусной активности и токсичности полученных соединений были проведены сотрудниками ФГБУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

топатического действия вируса. Репликацию вируса в присутствии тестируемых соединений изучали по проявлению цитопатического действия в культуре клеток, оценивая количество живых клеток при помощи ММТ, характеризующего интенсивность митохондриального дыхания живых клеток [106, 107]. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-тетразолий бромида (ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio). Оптическую плотность в лунках планшетов измеряли с использованием планшетного ридера Hydex Chameleon. При оценке возможной противовирусной активности в качестве критерия применяли снижение инфекционного титра вируса ($\Delta \lg \text{ТЦД}_{50}$) по сравнению с вирусным контролем (лунка с соответствующим разведением вируса без препаратов) вычисленное в результате анализа уравнений линейной регрессии контрольных и опытных лунок по всем титрам вируса в тесте МТТ: $\text{ТИД}_{50} = (y_{50\%} - a) / b$ (где; $y_{50\%}$ - оптическая плотность клеточного контроля/2; a – точка пересечения линий регрессии с осью ординат; b – коэффициент линейной регрессии). Степень ингибирования (%) является вычисленным оценочным критерием.

Методика исследования связывания «Триазавирина» и гемагглютини́на методом поверхностного плазмонного резонанса^{**}**

Связывание «Триазавирина» с гемагглютини́ном, выделенным из вируса гриппа А/Н3N2, определяли методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, USA) с использованием чипа GLC (Bio-Rad, USA). Лиофилизированный гемагглютинин растворяли до конечной концентрации (80-1000 нМ/л) в буфере PBS-T (BioRad, USA) и ковалентно иммобилизовали через аминокислотные группы на чип GLC (Bio-Rad, USA) согласно протоколу производителя (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6295.pdf). Чип после иммобилизации хранили в течение 4 недель. Для анализа взаимодействия с гемагглютини́ном использовали «Триазавирин», растворенный до конечной концентрации (50-1000 нМ/л) в буфере PBS-T (Bio-Rad). В качестве контроля взаимодействия использовали пробу, не содержащую гемагглютинин. Все эксперименты проводили при 37°C. Результаты экспериментов обрабатывали с помощью программного обеспечения ProteOn XPR36 (Bio-Rad, USA).

Для выбора оптимальных параметров нанесения белка на GLC чип использовали гемагглютинин в концентрациях 80, 160, 320, 640 и 1000 нМ/л. Наиболее эффективную иммобилизацию на GLC чип с сохранением свободных аминокислотных групп в белке наблюдали для гемагглютинина в концентрациях 320 и 640 нМ/л. Для дальнейшей характеристики связывания гемагглютинина с низкомолекулярными лигандами использовали «Триазави-

^{****} Исследование связывания «Триазавирина» с гемагглютини́ном методом поверхностного плазмонного резонанса было проведено совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

рин» в концентрациях 50, 100, 200, 500 и 1000 нМ/л. В результате для «Триазавирина» наблюдали сигнал резонанса, наиболее устойчивый при концентрации триазавирина 100 нМ/л. На рисунке 5 представлена кривая взаимодействия 100 нМ/л триазавирина с гемагглютинином в концентрациях 320 и 640 нМ/л. На основании полученных данных для всех значений концентраций гемагглютинина и «Триазавирина» средние значения константы ассоциации составляют $K_a = 2,32 \pm 0,15 \times 10^5 \text{ (M} \cdot \text{сек)}^{-1}$, константы диссоциации - $K_d = 0,54 \pm 0,02 \text{ сек}^{-1}$, а $K_D = K_d/K_a = 2,3 \pm 0,06 \text{ мкМ}$.

MALDI-TOF масс-спектрометрическое исследование окисления модельных пептидов-фрагментов гемагглютинина в присутствии и отсутствии «Триазавирина»^{††††}

Для определения окислительного воздействия «Триазавирина» на фрагменты гемагглютинина использовали метод масс-спектрометрии MALDI-TOF. Состав вариантов реакционных смесей, подготовленных для окисления пептидов в присутствии и в отсутствии «Триазавирина», приведен ниже в табл. 23:

Таблица 23. Состав реакционных смесей пептидов НА-I, НА-II, НА-III.

п.	НА-I	НА-II	НА-III	TZV	H ₂ O	NH ₄ HCO ₃
	9.7·10 ⁻⁴ М	13·10 ⁻⁴ М	9.7·10 ⁻⁴ М	7·10 ⁻³ М		50mM
	объем, μl					
1	-	6.5	-	-	9	10
2	-	6.5	-	4	5	10
3	5	-	-	-	10.5	10
4	5	-	-	4	6.5	10
5	-	-	5	-	9	10
6			5	4	-	10
7	5		5		9	10
8	5		5	4	-	10

Реакционные смеси инкубировали в течение трех часов при 37°С перед записью MALDI масс-спектров.

Общая методика синтеза натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он дигидратов (метод А) (1b-f). Соединения (1b-f) получают из соответствующих 3-алкилтио-5-амино-1,2,4-триазолов (2b-f) по методике, описанной для соединения (1a) [2].

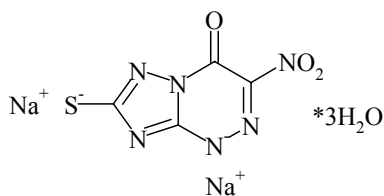
Синтез динатриевой соли 2-меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он тригидрата (7)

^{††††} Исследования MALDI-TOF MS по окислению пептидов «Триазавирином» были проведены совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ

Раствор 5,8 г (0,05 моль) 3-меркапто-5-амино-1,2,4-триазола (4) в 6,7 мл азотной кислоты (15 М) и 12 мл воды охлаждают до -7°C . Затем порциями прибавляют 40 % раствор 3,5 г нитрита натрия. К полученной соли диазония (5) приливают 5,6 мл этилнитроацетата. После пятиминутной выдержки к реакционной массе медленно прикапывают охлажденный раствор гидроокиси натрия до pH 9-10 и оставляют на 1 час при 0°C и на 2 часа при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывают и кристаллизуют из небольшого количества воды.

Общая методика синтеза натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он дигидратов (метод В) (1b,e,j-h).

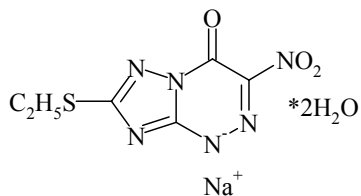
Раствор 0,2 г динатриевой соли меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она (7) в 10 мл метанола или в 5 мл ДМФА добавляют 1,1 эквивалент галоидного алкила. Реакционную массу сставляют при перемешивании и комнатной температуре на час, затем растворитель удаляют в вакууме, полученный осадок кристаллизуют.



Динатриевая соль 2-меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она тригидрат (7)

Выход 31 %, $T_{\text{пл}} > 320^{\circ}\text{C}$, ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1668,57 cm^{-1} (C=O), 1512,94 и 1365,08 cm^{-1} (NO_2);

Найдено, %: С – 15.06; Н – 1.63; N – 26.34; $\text{C}_4\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: С – 15.35; Н – 1.70; N – 26.62;



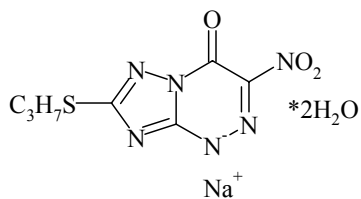
Натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1b) (Метод А и В)

Выход 65 % (метод А) и 68% (метод В), $T_{\text{пл}} = 302^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 3,20 (кв., 2H, CH_2), 1,43 (т.,

3H, $J = 7,3$ Гц, CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1693,27 cm^{-1} (C=O), 1514,53 и 1376,91 cm^{-1} (NO_2);

Найдено, %: С – 24.18; Н – 2.94; N – 28.11; $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_6\text{NaO}_3\text{S}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: С – 24.00; Н – 3.02; N – 27.99



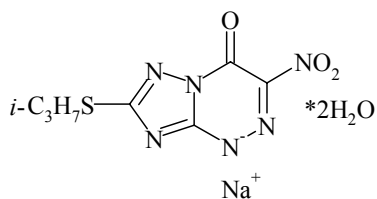
Натриевая соль 2-пропилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1c) (Метод А)

Выход 63 %, $T_{\text{пл}} = 315^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 3,18 (т., 2H, $J = 7$ Гц, CH_2), 1,78 (м., 2H, CH_2), 1,06 (т.,

3H, $J = 7,3$ Гц, CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1670,93 см⁻¹ (C=O), 1512,35 и 1364,34 см⁻¹ (NO₂);

Найдено, %: C – 26.96; H – 3.40; N – 26.71; C₇H₇N₆NaO₃S*2H₂O; Вычислено, %: C – 26.75; H – 3.53; N – 26.74;

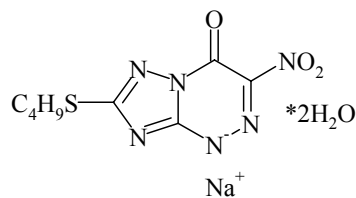


Натриевая соль 2-изопропилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1d) (Метод А)

Выход 49 %, $T_{пл} = 285^{\circ}\text{C}$, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 3.85-3.95 (1H, м, CH), 1.42 (6H, д, $J = 6.52$, 2CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 165.44 (C₂), 160.42 (C_{3a}), 145.03 (C₆), 143.54 (C₇), 36.72 (CH), 23.73 (2CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1671 (C=O); 1510,1363 (NO₂);

Найдено, %: C – 26.81; H – 3.66; N – 26.58; C₇H₇N₆NaO₃S*2H₂O; Вычислено, %: C – 26.75; H – 3.53; N – 26.74;

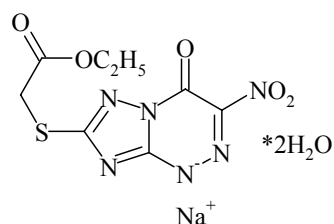


Натриевая соль 2-бутилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1e) (Метод А и В)

Выход 49 % (метод А) и 64% (метод В), $T_{пл} = 318^{\circ}\text{C}$, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 3,20 (т., 2H, $J = 7$ Гц), 1,74 (м., 2H, CH₂), 1,49 (м., 2H, CH₂), 0,96 (т., 3H, $J = 7,3$ Гц, CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1667,59 (C=O), 1512,94 и 1365,08 (NO₂);

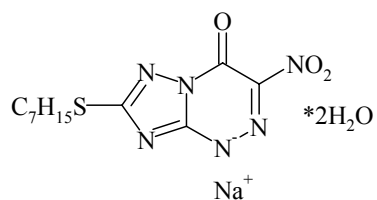
Найдено, %: C – 29.10; H – 4.08; N – 25.46; C₈H₉N₆NaO₃S*2H₂O; Вычислено, %: C – 29.27; H – 3.99; N – 25.60;



Натриевая соль 2-этоксикарбонил-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1f) (Метод А)

Выход 69 %, $T_{пл} = 306^{\circ}\text{C}$, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 4,15 (кв., 2H, OCH₂), 4,07 (с., 2H, CH₂), 1,25 (т., 3H, $J = 7,28$ Гц, CH₃);

Найдено, %: C – 27.01; H – 2,88; N – 23,37; C₈H₇N₆NaO₅S*2H₂O; Вычислено, %: C – 26,82; H – 3,09; N – 23,46



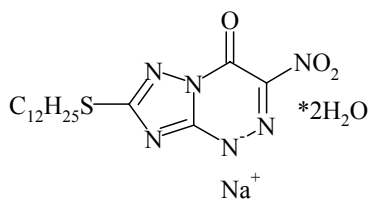
Натриевая соль 2-гептилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (1g) (Метод В)

Выход 57 %, $T_{пл} = 314^{\circ}\text{C}$, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 3,21 (т., 2H, $J = 7$ Гц), 1,75 (м., 2H, CH₂), 1,40 (м., 8H,

4CH₂), 0,95 (т., 3H, *J* = 7,3 Гц, CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1667,60 (C=O), 1512,94 и 1365,28 (NO₂);

Найдено, %: C – 35.71; H – 5.12; N – 22.78; C₁₁H₁₅N₆NaO₃S*2H₂O; Вычислено, %: C – 35.67; H – 5.17; N – 22.69;



Натриевая соль 2-додecilтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-она дигидрат (1h) (Метод В)

Выход 40 %, *T*_{пл} = 310°C, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 3,21 (т., 2H, *J* = 7 Гц), 1,72 (м., 2H, CH₂), 1,36 (м., 18H,

9CH₂), 0,96 (т., 3H, *J* = 7,3 Гц, CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1657,90 (C=O), 1512,96 и 1364,08 (NO₂);

Найдено, %: C – 43.50; H – 6.68; N – 19.20; C₁₆H₂₅N₆NaO₃S*2H₂O; Вычислено, %: C – 43.63; H – 6.64; N – 19.08;

Общая методика синтеза 3-R-1H-1,2,4-триазолилгидразонов этилфторглиоксала (8a,i,j).

К раствору 10 ммоль соответствующего соединения (2a,i,j) в 2.0 мл воды добавляют 2.2 мл (20 ммоль) конц. HCl. Реакционную массу охлаждают до –10°C и прибавляют раствор 0.7 г (10 ммоль) нитрита натрия в 1 мл воды при температуре от –10 до –5°C. Реакционную массу выдерживают 15–30 мин, затем добавляют к раствору 1.25 мл (10 ммоль) этилового эфира 2-фторацетоуксусной кислоты, 7.3 мл (22 ммоль, 3 моль/л) ацетата натрия и 10 мл этанола, охлаждённого до 0°C. Реакционную массу выдерживают 1 ч при 5°C и 2 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из этанола.

Общая методика синтеза 2-R-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-онов (9a,i,j).

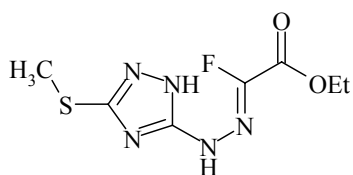
Раствор 1 ммоль гидразона соответствующего соединения (8a,i,j) и 0.164 г (2 ммоль) ацетата натрия в 10 мл 80% водного этанола кипятят 5 ч. Окончание реакции определяют с помощью ТСХ. По окончании реакции растворитель упаривают при пониженном давлении, соединение очищают хроматографически.

Натриевые соли 2-R-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-онов (10a,j) были получены взаимодействием соответствующих соединений (9a,j) с эквивалентом NaOH в этаноле.

2-R-6-пиридиний-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (11a,i)

Способ А. Раствор гидразона (8) (1 ммоль) в 1 мл пиридина кипятят в течение 2 часов. Реакционную массу охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из этанола.

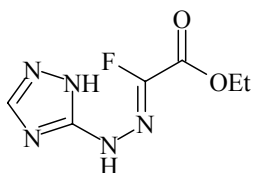
Способ Б. К раствору 10 ммоль 3-амино-5-*R*-1,2,4-триазола (**2a,i**) в 2.0 мл воды добавляют 2.2 мл концентрированной соляной кислоты (20 ммоль). Реакционную массу охлаждают до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и прибавляют раствор нитрита натрия (0.7 г, 10 ммоль) в 1 мл воды при температуре $-10\div-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакционную массу выдерживают 15 минут при той же температуре и добавляют к раствору бромид диэтил пиридиниймалоната, полученному выдерживанием при комнатной температуре раствора 1.7 мл (10 ммоль) диэтилброммалоната, 2.5 мл (30 ммоль) пиридина в 10 мл этанола в течение 12 ч. Реакционную массу выдерживают при температуре $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 1 ч, оставляют при комнатной температуре на ночь, выпавший осадок фильтруют, промывают водой и кристаллизуют из этанола.



3-Метилтио-1*H*-1,2,4-триазолилгидразон этилфторглиоксала (8a)

Выход 42 %, $T_{\text{пл}} = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 1.35 (3H, т, $J = 7.1$, CH_3); 2.58 (3H, с, SCH_3); 4.31 (2H, к, $J = 7.1$, OCH_2); 11.60 (1H, уш. с, NH); 13.07 (1H, уш. с, NH); ^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -81.84 ; ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1739 (C=O), 1167 (C-F);

Найдено, %: C – 34.16; H – 4.23; N – 28.54; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}$; Вычислено, %: C – 34.00; H – 4.08; N – 28.32



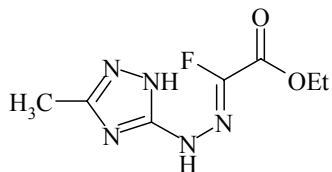
1*H*-1,2,4-Триазолилгидразон этилфторглиоксала (8i)

Выход 49 %, $T_{\text{пл}} = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 1.27 (3H, т, $J = 7.2$, CH_3); 4.26 (2H, к, $J = 7.2$, CH_2); 8.10 (1H, с, H-3); 11.58 (1H, уш. с, NH); 13.28 (1H, уш. с, NH)

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -82.41 ;

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1726 (C=O), 1155 (C-F);

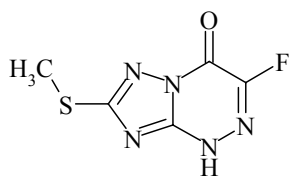
Найдено, %: C – 35.96; H – 4.24; N – 34.68; $\text{C}_6\text{H}_8\text{FN}_5\text{O}_2$; Вычислено, %: C – 35.83; H – 4.01; N – 34.81



3-Метил-1*H*-1,2,4-триазолилгидразон этилфторглиоксала (8j)

Выход 45 %, $T_{\text{пл}} = 196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 1.34 (3H, т, $J = 7.2$, CH_3); 2.27 (3H, с, 3- CH_3); 4.28 (2H, к, $J = 7.2$, OCH_2); 10.88 (1H, уш. с, NH); 12.68 (1H, уш. с, NH); ^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -82.64 ; ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1742 (C=O), 1120 (C-F);

Найдено, %: C – 39.24; H – 4.85; N – 32.78; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{FN}_5\text{O}_2$; Вычислено, %: C – 39.07; H – 4.68; N – 32.55



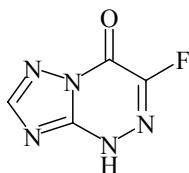
2-Метилтио-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-онов (9а)

Выход 63 %, $T_{пл} = 200^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 2.61 (3H, с, SCH₃); 12.46 (1H, уш. с, NH);

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -114.32;

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1690 (C=O), 1301 (C-F);

Найдено, %: C – 30.04; H – 2.18; N – 34.64; C₅H₄FN₅OS; Вычислено, %: C – 29.85; H – 2.00; N – 34.81



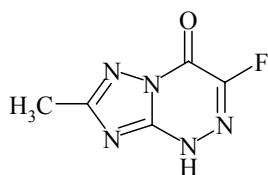
6-Фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-онов (9i)

Выход 58 %, $T_{пл} = 207^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 8.23 (1H, с, H-7); 12.20 (1H, уш. с, NH);

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -115.66;

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1621 (C=O), 1304 (C-F);

Найдено, %: C – 31.12; H – 1.24; N – 45.24; C₄H₂FN₅O; Вычислено, %: C – 30.98; H – 1.30; N – 45.16



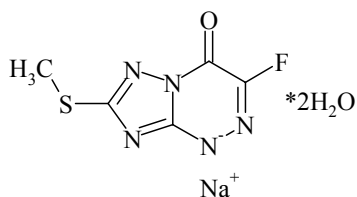
2-Метил-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-онов (9j)

Выход 55 %, $T_{пл} = 198^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 2.38 (3H, с, CH₃); 12.34 (1H, уш. с, NH);

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -114.98;

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1652 (C=O), 1294 (C-F);

Найдено, %: C – 35.28; H – 2.50; N – 41.63; C₅H₄FN₅O; Вычислено, %: C – 35.51; H – 2.38; N – 41.41

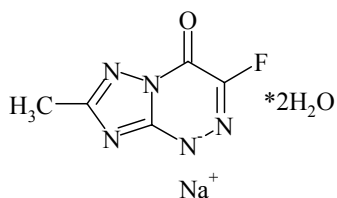


Натриевая соль 2-метилтио-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она дигидрат (10а)

Выход 51 %, $T_{пл} = 298^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 2.58 (3H, с, SCH₃);

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -114.59;

Найдено, %: C – 23.25; H – 2.55; N – 26.89; C₅H₃FN₅NaOS*2H₂O; Вычислено, %: C – 23.17; H – 2.72; N – 27.02

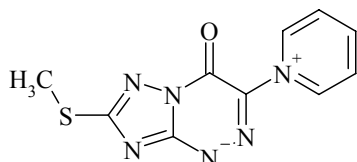


Натриевая соль 2-метил-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-она дигидрат (10j)

Выход 47,6 %, $T_{пл} > 300^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 2.34 (3H, с, CH₃);

^{19}F ЯМР (DMSO- d_6): -115.00;

Найдено, %: С – 26.46; Н – 3.00; N – 31.02; C₅H₃FN₅NaO*2H₂O; Вычислено, %: С – 26.44; Н – 3.11; N – 30.83



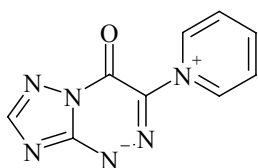
2-метилтио-6-пиридиний-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (11a)

Выход 53 %, $T_{пл} = 265^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 9,48 (2H, м, α -Py), 8,74 (1H, м, γ -Py), 8,29 (2H, м, β -Py),

2,66 (3H, с, SCH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1661 (C=O);

Найдено, %: С – 46.32; Н – 3.27; N – 32.46; C₁₀H₈N₆OS; Вычислено, %: С – 46.15; Н – 3.10; N – 32.29



6-пиридиний-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (11i)

Выход 57 %, $T_{пл} > 350^\circ\text{C}$ (разл.), ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 9.44 (2H, м, α -Py), 8.76 (1H, м, γ -Py), 8.40

(1H, с, CH), 8.31 (2H, м, β -Py);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1673 (C=O);

Найдено, %: С – 50.63; Н – 3.06; N – 39.47; C₉H₆N₆O; Вычислено, %: С – 50.47; Н – 2.82; N – 39.24

Синтез 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (15a-d).

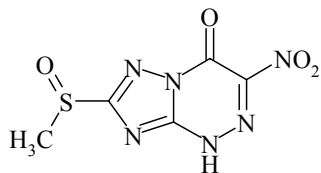
Раствор серной кислоты (1 экв.) прибавляют к соединению (1a-d). Полученное соединение (30a-d) экстрагируют этилацетатом, экстракт сушат над Na₂SO₄ и упаривают.

Общая методика синтеза 2-алкилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (16a-d).

К суспензии 0,01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (1a-d) в 10 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании добавляют 1,78 мл (1 экв) 18 % перекиси водорода. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из *изо*-пропанола.

Общая методика синтеза 2-алкилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (17a-d).

К суспензии 0,01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (**1a-d**) в 14 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании по каплям добавляют 4 мл (2 экв) 30 % перекиси водорода так, чтобы температура не превышала 80°C. Далее реакционную массу перемешивают при комнатной температуре еще три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из *изо*-пропанола.



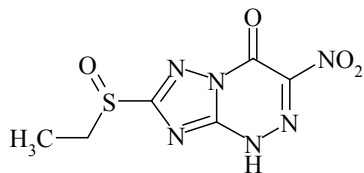
2-Метилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-он (16a)

Выход 70 %, $T_{пл} = 256^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 9.84 (1H, уш.с, NH), 3.05 (3H, с, CH₃); ^{13}C NMR

(DMSO- d_6): 169.09 (C₂), 157.32 (C_{3a}), 144.05 (C₇), 143.57 (C₆), 25.58 (CH₃SO);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1750 (C=O); 1036 (-SO-); 1553, 1340 (NO₂);

Найдено, %: C – 24.62; H – 1.43; N – 34.28; C₅H₄N₆O₄S; Вычислено, %: C – 24.59; H – 1.65; N – 34.42



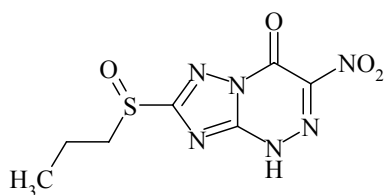
2-Этилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-он (16b)

Выход 74 %, $T_{пл} = 227^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 11.16 (1H, уш.с, NH), 3.16-3.36 (2H, м, CH₂), 1.23 (3H,

t , $J = 7.4$, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 168.34 (C₂), 157.58 (C_{3a}), 144.36 (C₇), 143.87 (C₆), 46.64 (CH₂SO), 6.15 (CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1748 (C=O); 1022 (-SO-); 1552, 1336 (NO₂);

Найдено, %: C - 27.87, H - 2.27, N - 32.31; C₆H₆N₆O₄S; Вычислено, %: C - 27.91, H - 2.34, N - 32.55



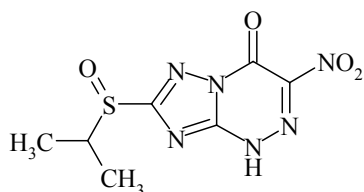
2-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-он (16c)

Выход 72 %, $T_{пл} = 222^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 8.41 (1H, уш.с, NH), 3.18-3.29 (2H, м, SOCH₂), 1.55-

1.78 (2H, м, CH₂), 1.01 (3H, м, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 168.19 (C₂), 157.87 (C_{3a}), 144.19 (C₇), 143.46 (C₆), 54.15 (CH₂SO), 15.21 (CH₂), 12.94 (CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1748 (C=O); 1013 (-SO-); 1556, 1336 (NO₂)

Найдено, %: C - 30.82, H - 3.12, N - 30.77; C₇H₈N₆O₄S; Вычислено, %: C - 30.88, H - 2.96, N - 30.87

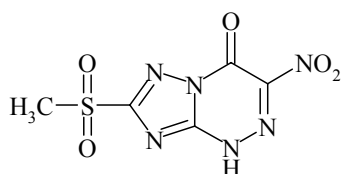


**2-изо-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-
с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он (16d)**

Выход 77 %, $T_{пл} = 239^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 7.60 (1H, уш.с, NH), 3.38-3.49 (1H, м, CH), 1.27 (6H, дд, $J = 6.8$, 2CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 167.79 (C₂), 157.42 (C_{3a}), 144.33 (C₇), 143.86 (C₆), 53.07 (CHSO), 15.92 (CH₃), 14.59 (CH₃)

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1752 (C=O); 992(-SO-); 1555, 1342 (NO₂)

Найдено, %: C - 31.07, H - 2.95, N - 30.89; C₇H₈N₆O₄S; Вычислено, %: C - 30.88, H - 2.96, N - 30.87

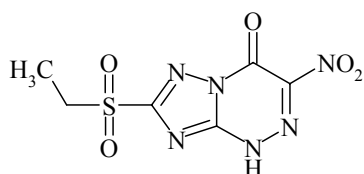


**2-Метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-
с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он (17a)**

Выход 66 %, $T_{пл} = 275^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 7.57 (1H, уш.с, NH), 3.41 (3H, с, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 163.86 (C₂), 158.41 (C_{3a}), 144.69 (C₇), 143.64 (C₆), 41.84 (CH₃SO₂);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1759 (C=O); 1347, 1138 (-SO₂-); 1570, 1323 (NO₂);

Найдено, %: C - 23.21, H - 1.31, N - 32.33; C₅H₄N₆O₅S; Вычислено, %: C - 23.08, H - 1.55, N - 32.30

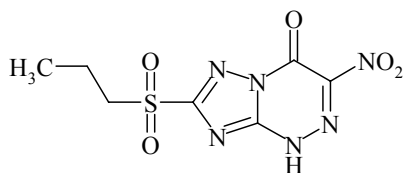


**2-Этилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-
с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он (17b)**

Выход 64 %, $T_{пл} = 259^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 9.71 (1H, уш.с, NH), 3.52 (2H, кв, $J = 7.4$, CH₂), 1.33 (3H, т, $J = 7.4$, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 162.82 (C₂), 158.93 (C_{3a}), 145.06 (C₇), 144.02 (C₆), 48.54 (CH₂SO₂), 7.26 (CH₃);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1759 (C=O); 1311, 1140 (-SO₂-); 1557, 1332 (NO₂);

Найдено, %: C - 26.44, H - 2.20, N - 30.43; C₆H₆N₆O₅S; Вычислено, %: C - 26.28, H - 2.21, N - 30.65



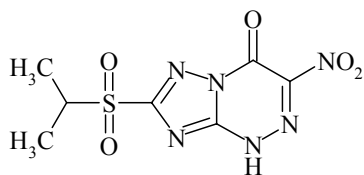
**2-Пропилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-
с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он (17с)**

Выход 71 %, $T_{пл} = 264^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 11.98 (1H, уш.с, NH), 3.53 (2H, т, $J = 7.6$, SO₂CH₂), 1.67-1.76 (2H, м, CH₂), 0.98 (3H, т, $J = 7.4$, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163.22 (C₂), 158.44 (C_{3a}), 144.91 (C₇), 143.99 (C₆), 55.35 (CH₂SO₂), 16.20 (CH₂), 12.94 (CH₃);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1748 (C=O); 1293, 1139 (-SO₂-); 1556, 1326 (NO₂)

Найдено, %: C - 29.01, H - 2.88, N - 29.24; C₇H₈N₆O₅S; Вычислено, %: C - 29.17, H - 2.80, N

- 29.16



**2-изо-Пропилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-
с][1,2,4]триазин-7(4Н)-он (17d)**

Выход 62 %, $T_{пл} = 282^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 8.27 (1H, уш.с, NH), 3.63-3.73 (1H, м, CH), 1.35 (6H, д, $J = 6.8$, 2CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 161.91 (C₂), 158.80 (C_{3a}), 144.98 (C₇), 144.02 (C₆), 54.30 (CHSO₂), 15.02 (2CH₃);

ИК спектр, ν , см⁻¹: 1749 (C=O); 1311, 1135 (-SO₂-); 1556, 1326 (NO₂);

Найдено, %: С - 29.11, Н - 2.69, N - 29.00; C₇H₈N₆O₅S; Вычислено, %: С - 29.17, Н - 2.80, N - 29.16

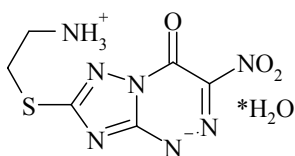
Общая методика нуклеофильного замещения в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оне (17а).

К суспензии 0,001 моль S-нуклеофила (цистеамина, цистеина или восстановленного глутатиона) в 20 мл метанола прибавляют триэтиламин и перемешивают в атмосфере аргона в течение пяти минут, затем в реакционную массу вносят эквивалент 2-метилсульфонилтриазолотриазина (17а) и кипятят. Окончание реакции определяют по ТСХ в системе бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:1, после чего реакционную массу упаривают досуха. Полученный осадок промывают *изо*-пропиловым спиртом и очищают от примесей.

2-(2'-Амино-этилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин гидрат (18) получают с использованием общей методики и 2 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного метанола.

Триэтиламмониевую соль (2'-амино-2'-карбоксиилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина гидрат (19) получают с использованием общей методики и 3 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного этанола.

2-Амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(3-нитро-4-оксо-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляную кислоту гидрат (20) получают с использованием общей методики и 6 экв. триэтиламина. Продукт нейтрализуют 3 экв. 1 М соляной кислоты и очищают с помощью ВЭЖХ (элюент: 0.1 М ацетат аммония в изократическом режиме в течение 5 мин, далее градиент от 5 до 95 % ацетонитрила за 15 мин; скорость потока 20 мл/мин в течение 7 мин, затем 15 мл/мин, длина волны 254 нм).

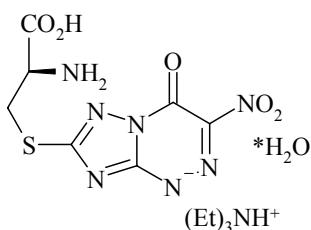


2-(2'-Амино-этилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин гидрат (18)

Выход 41 %, $T_{пл} = 285^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 3.58 (2H, т, $J = 7.03$, NCH_2), 3.49 (2H, т, $J = 7.03$, SCH_2); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): 163.95 (C_2), 160.12 (C_{3a}), 144.77 (C_7), 142.94 (C_6), 38.69 (CH_2N), 27.87 (SCH_2);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1690 ($\text{C}=\text{O}$); 1514, 1371 (NO_2); 3521 (уш.) ($-\text{NH}_3^+$)

Найдено, %: С - 25.91, Н - 2.98, N - 35.57; $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_7\text{O}_3\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: С - 26.18, Н - 3.27, N - 35.64

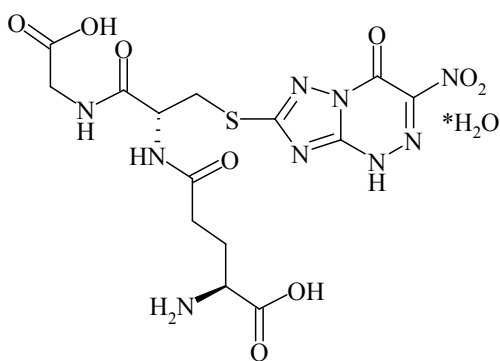


Триэтиламмониевая соль (2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина гидрат (19)

Выход 46 %, $T_{пл} = 158^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4.27 (1H, дд, $J = 7.5, 3.8$, CHN), 3.98 (1H, дд, $J = 15.2, 3.8$, H_a в SCH_2), 3.66 (1H, дд, $J = 15.2, 7.5$, H_b в SCH_2), 3.21 (6H, кв, $J = 7.28$, 3CH_2), 1.29 (9H, т, $J = 7.28$, 3CH_3); ^{13}C NMR (D_2O): 172.02 (COO^-), 166.09 (C_2), 159.16 (C_{3a}), 144.55 (C_7), 143.06 (C_6), 54.47 (CHN), 46.71 (3CH_2), 31.67 (SCH_2), 8.27 (3CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1682, 1615 ($\text{C}=\text{O}$); 1504, 1361 (NO_2);

Найдено, %: С - 36.96, Н - 5.56, N - 26.72; $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_5\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: С - 37.10, Н - 5.71, N - 26.63



2-Амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(3-нитро-4-оксо-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляная кислота гидрат (20)

Выход 27 %, $T_{пл} = 170^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4,94 (1H, дд, $J = 8.8, 4.4$), 3,90 (1H, дд, $J = 14.5, 4.4$, H_a в SCH_2), 3,71-3,86 (3H, м), 3,51 (1H, дд, $J = 14.5, 8.8$, H_b в SCH_2), 2,46-2,50 (2H, м), 2,09-2,14 (2H, м); ^{13}C NMR (D_2O): 176.06 (COOH), 175.18 (CONH), 174.51 (COOH), 172.05 (CONH), 167.26 (C_2), 158.58 (C_{3a}), 145.21 (C_7), 143.89 (C_6), 54.27 (CHNH_2), 52.06 (CH), 44.33 (CH_2), 31.51 (CH_2), 30.95 (SCH_2), 26.52 (CH_2)

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1661, 1620 ($\text{C}=\text{O}$); 1505, 1375 (NO_2);

Найдено, %: С - 33.19, Н - 3.51, N - 25.12; $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: С - 33.27, Н - 3.76, N - 24.95

Синтез 2-метилтио-4-пивалоилокиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (27) (Метод А).

К раствору 0.01 моль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**15a**) в 10 мл ДМФА прибавляют 1 эквивалент карбоната натрия и 0.011 моль хлорметиллоксипивалата. Реакционную массу перемешивают трое суток при комнатной температуре, после чего растворитель отгоняют в вакууме. Остаток затирают спиртом и отфильтровывают.

Синтез 2-метилтио-4-пивалоилокиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (27) (Метод В).

1.13 г 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**15a**), 2 мл (2 экв.) ангидрида пивалеовой кислоты, 0.3 г (2 экв.) параформа и каталитические количества $ZnCl_2$ выдерживают при температуре 140°C в течение трех часов. Реакционную массу охлаждают до комнатной температуры и продукт экстрагируют 20 мл хлороформа, экстракт промывают водой 2×10 мл, сушат над сульфатом натрия и упаривают растворитель, остаток заливают гексаном и оставляют на ночь. Осадок отфильтровывают.

Синтез 2-метилтио-4-этоксиэтил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (28).

К раствору 0,01 моль 2-R-6-нитро-1,2,4-триазол[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**15a**) в сухом ацетонитриле прибавляют 0,015 моль винилэтилового эфира. Реакционную массу выдерживают при комнатной температуре 3 часа, после чего в нее добавляют сухой поташ, перемешивают в течение 15 мин, растворитель упаривают в вакууме. Продукт экстрагируют четыреххлористым углеродом, упаривают в вакууме и затирают гексаном.

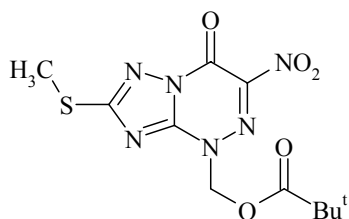
Синтез 2-метилтио-4-трет-бутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (29).

К суспензии 0.01 моль триазолотриазина (**15a**) в 15 мл трифторуксусной кислоты прибавляют небольшое количество катионообменной смолы КУ-1 и эквивалент трет-бутанола. Реакционную массу оставляют при перемешивании на несколько дней при комнатной температуре до полного растворения исходного (**15a**). По окончании реакции в полученный раствор вносят 30-40 мл воды. Полученную суспензию отфильтровывают, осадок промывают водой.

Синтез 2-метилтио-4-(*p*-диметокси-дифенил-метил)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (30).

К раствору 228 мг 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**15a**), 320 мг трифенилфосфина (1.5 экв.) и 155 мг *p*-диметокси-дифенилметанола (1.5 экв.) в диоксане по каплям прибавляют растворенный в диоксане диэтилазидикарбоксилат (0.15 мл, 1.5 экв.). Реакционную массу выдерживают при комнатной температуре. Окон-

чение реакции определяют по ТСХ (элюент этилацетат). По окончании реакции раствор упаривают в вакууме, осадок затирают этанолом.



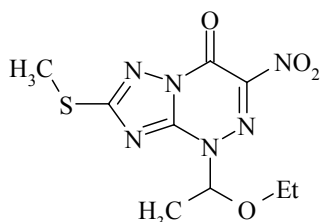
2-Метилтио-4-пivaloилокиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (27)

Выход 35 % (метод А) и 82 % (метод В), $T_{\text{пл}} = 80^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 6.25 (2H, с, CH_2N), 2.72 (3H, с, SCH_3), 1.24 (9H, с, 3CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6):

176.28 ($\text{C}=\text{O}$), 167.42 (C_2), 151.93 (C_{3a}), 142.40 (C_7), 142.13 (C_6), 74.87 (CH_2N), 38.86 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.98 (3CH_3), 14.10 (SCH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1359, 1573 (NO_2), 1744 ($\text{C}=\text{O}$);

Найдено, %: С - 38.69, Н - 3.99, N - 24.42; $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$; Вычислено, %: С - 38.59, Н - 4.12, N - 24.55

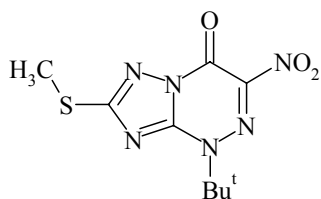


2-Метилтио-4-этоксигтил-6-нитро-1,2,4-триазоло [5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (28)

Выход 85 %, $T_{\text{пл}} = 110^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 6.16 (1H, кв, $J = 5.6$), 3.70 (1H, м, CH_2), 3.55 (1H, м, CH_2), 2.73 (3H, с, SCH_3), 1.79 (3H, д, $J = 7.2$, $\text{CH}_3(\text{CH})$),

1.24 (3H, т, $J = 7.2$, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): 169.73 (C_2), 151.31 (C_{3a}), 141.34 (C_7), 140.68 (C_6), 91.48 (CH), 66.10 (CH_2), 19.60 ($\text{CH}_3(\text{CH})$), 14.74 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)$), 14.14 (SCH_3);

Найдено, %: С - 35.96, Н - 3.87, N - 28.23; $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$; Вычислено, %: С - 36.00, Н - 4.03, N - 27.99



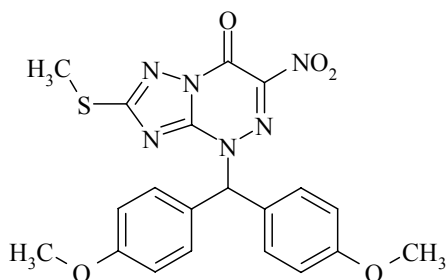
2-Метилтио-4-трет-бутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (29)

Выход 96 %, $T_{\text{пл}} = 157^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 2.73 (3H, с, SCH_3), 1.83 (9H, с, 3CH_3); ^{13}C NMR

(DMSO-d_6): 166.52 (C_2), 151.60 (C_{3a}), 142.36 (C_7), 139.75 (C_6), 69.97 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.44 (3CH_3), 14.09 (SCH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1333, 1542 (NO_2), 1731 ($\text{C}=\text{O}$);

Найдено, %: С - 38.02, Н - 4.52, N - 29.69; $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$; Вычислено, %: С - 38.02, Н - 4.25, N - 29.56



2-Метилтио-4-(*p*-диметокси-дифенил-метил)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (30)

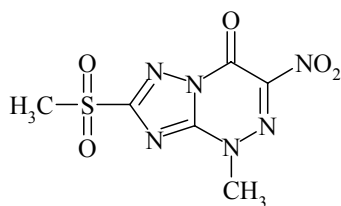
Выход 74 %, $T_{пл} = 190^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 7.29 (4H, м, Ph), 7.24 (1H, с, CHN), 6.91 (4H, м, Ph), 3.81 (6H, с, 2OCH₃), 2.72 (3H, с, SCH₃);

ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 1336, 1561 (NO₂), 1744 (C=O);

Найдено, %: С – 53.04, Н – 4.12, N – 18.31; C₂₀H₁₈N₆O₅S; Вычислено, %: С – 52.86, Н – 3.99, N – 18.49

Общая методика синтеза 2-метилсульфонил-4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (31-34).

К суспензии 0.002 моль 2-метилтио-4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (24,25,27,29) в 3 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании по каплям добавляют 1.6 мл 30 % перекиси водорода. Далее реакцию массу перемешивают при комнатной температуре еще три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из этилацетата.



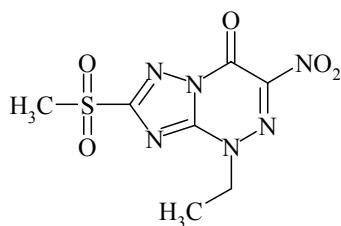
2-Метилсульфонил-4-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (31)

Выход 63 %, $T_{пл} = 242^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO-d_6) спектр, δ , м.д.: 4.17 (3H, с, NCH₃), 3.51 (3H, с, SO₂CH₃); ^{13}C NMR

(DMSO-d_6): 163.75 (C₂), 153.07 (C_{3a}), 143.32 (C₇), 141.56 (C₆), 43.27 (NCH₃), 42.14 (SO₂CH₃);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1745 (C=O); 1314, 1153 (-SO₂-); 1560, 1330 (NO₂);

Найдено, %: С - 26.42, Н - 2.35, N - 30.62; C₆H₆N₆O₅S; Вычислено, %: С - 26.28, Н - 2.21, N - 30.65



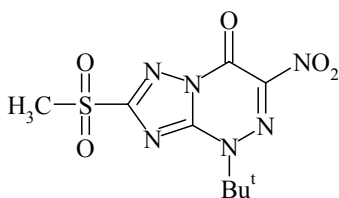
2-Метилсульфонил-4-этил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (32)

Выход 57 %, $T_{пл} = 190^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO-d_6) спектр, δ , м.д.: 4.54 (2H, кв, $J = 7.28$, NCH₂), 3.51 (3H, с, SO₂CH₃), 1.55 (3H, т, $J = 7.28$, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): 163.71

(C₂), 152.61 (C_{3a}), 143.34 (C₇), 141.75 (C₆), 51.63 (CH₂N), 42.17 (SO₂CH₃), 13.18 (CH₃);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1747 (C=O); 1316, 1155 (-SO₂-); 1567, 1329 (NO₂);

Найдено, %: С - 29.31, Н - 2.82, N - 29.14; C₇H₈N₆O₅S; Вычислено, %: С - 29.17, Н - 2.80, N - 29.16



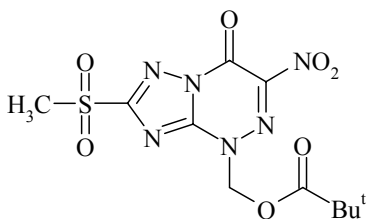
2-Метилсульфонил-4-*трет*-бутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (33)

Выход 82 %, $T_{пл} = 275^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 3.51 (3H, с, SO_2CH_3), 1.80 (9H, с, 3CH_3); ^{13}C NMR

(DMSO- d_6): 163.11 (C_2), 151.81 (C_{3a}), 143.25 (C_7), 139.90 (C_6), 70.95 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42.11 (SO_2CH_3), 27.51 (3CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1746 ($\text{C}=\text{O}$); 1317, 1149 ($-\text{SO}_2-$); 1556, 1331 (NO_2);

Найдено, %: C - 34.41, H - 3.63, N - 26.41; $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$; Вычислено, %: C - 34.18, H - 3.82, N - 26.57



2-Метилсульфонил-4-пивалоилоксиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (34)

Выход 79 %, $T_{пл} = 186^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 6.29 (2H, с, CH_2N), 3.50 (3H, с, SO_2CH_3), 1.20 (9H, с, 3CH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 176.27 ($\text{C}=\text{O}$), 163.67 (C_2),

152.16 (C_{3a}), 143.06 (C_7), 142.42 (C_6), 74.98 (CH_2N), 42.11 (SO_2CH_3), 38.87 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.94 (3CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1751 ($\text{C}=\text{O}$); 1320, 1154 ($-\text{SO}_2-$); 1566, 1320 (NO_2);

Найдено, %: C - 35.36, H - 3.59, N - 22.61; $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$; Вычислено, %: C - 35.30, H - 3.77, N - 22.45

Общая методика замещения нитрогруппы N-нуклеофилами в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онах (24-29,41).

0.7 ммоль исходного 2-метилтио-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она растворяют в ДМФА, приливают 3 экв. амина и кипятят. Окончание реакции определяют по ТСХ в системе этилацетат : гексан в различных соотношениях, либо кристаллизуют из подходящего растворителя. Реакционную массу упаривают, продукт выделяют с помощью колоночной хроматографии или перекристаллизовывают.

2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-пирролидил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35a). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 1.

2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35b). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 1.

2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35c). Реакционную массу затирают небольшим количеством воды, осадок отфильтровывают.

2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35d). Элюент – этилацетат : гексан = 4 : 1.

Кристаллографические данные соединения (35d)

Параметр	Значение
Молекулярная формула	C ₁₃ H ₂₀ N ₆ O ₂ S
Молекулярная масса	324,41
Сингония	Триклинная
Пространственная группа	P-1
$a/\text{Å}$	10,597 (5)
$b/\text{Å}$	11,629 (11)
$c/\text{Å}$	13,270 (8)
$\alpha/\text{град}$	83,15 (6)
$\beta/\text{град}$	82,29 (5)
$\gamma/\text{град}$	79,64 (7)
Z	4
$\lambda/\text{Å}$	0.71073
$V/\text{Å}^3$	1586,3 (19)
Интервал измерения индексов	$-7 \leq h \leq 16, -17 \leq k \leq 17, -20 \leq l \leq 20$
$d_{\text{calc}}/\text{Г}\cdot\text{см}^{-3}$	1.358
$\mu/\text{мм}^{-1}$	0.221
Число измеренных отражений	15716
Число независимых отражений	10166
R	0,0959
wR_2	0,0695
Число уточняемых параметров	405
GOOF	1.003
Остаточная электронная плотность/ $e \text{ Å}^{-3}$ (min/max)	-0.234/0.203

2-Метилтио-4-трет-бутил-6-втор-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35e). Элюент - этилацетат : гексан = 1 : 1.

2-Метилтио-4-трет-бутил-6-пиперидил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35f). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 2.

2-Метилтио-4-трет-бутил-6-изо-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35g). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 2.

2-Метилтио-4-метил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (36a). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 1.

2-Метилтио-4-этил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (37a). Элюент – этилацетат : гексан = 1 : 1.

2-Метилтио-4-этил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (37b). Продукт перекристаллизовывают из воды.

2-Метилтио-4-этил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (37c). Элюент – этилацетат : гексан = 2 : 1.

2-Метилтио-4-бензил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (38a). Продукт кристаллизуют в небольшом количестве воды, перекристаллизовывают из 50% этанола.

2-Метилтио-4-этоксипропил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (39a). Продукт выделяют флэш-хроматографией в системе этилацетат : гексан = 4 : 1.

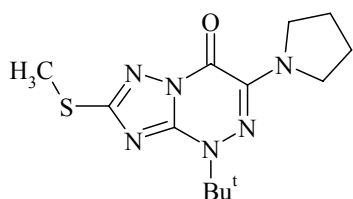
2-Метилтио-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин(4Н)-7-он (40a). Элюент – этилацетат : гексан = 2 : 1.

2-Метилтио-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин(4Н)-7-он (40b). Элюент – этилацетат : изопропанол = 7 : 1.

2-Метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (42a). Целевой продукт получают обработкой упаренной реакционной массы небольшим количеством воды.

2-Метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (42b). Элюент – этилацетат.

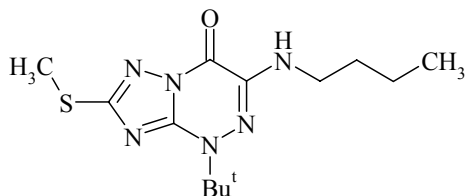
2-Метилтио-4-(4-гидроксибутил)-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (43a). Элюент – этилацетат



2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-пирролидил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (35a)

Выход 46 %, $T_{пл} = 116^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 3.93 (2H, т, $J = 6.8$, CH_2), 3.74 (2H, т, $J = 6.8$, CH_2), 2.69 (3H, с, SCH_3), 2.04 (2H, п, $J = 6.8$, CH_2), 1.97 (2H, п, $J = 6.8$, CH_2), 1.72 (9H, с, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.99 (C_2), 155.32 (C_{3a}), 154.28 (C_7), 131.96 (C_6), 60.71 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 48.24 (NCH_2), 46.98 (NCH_2), 28.38 ($3(\text{CH}_3)$), 26.37 (CH_2), 23.81 (CH_2), 14.21 (SCH_3);

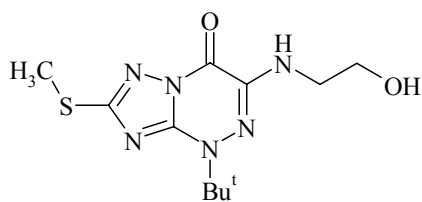
Найдено, %: С - 50.47, Н - 6.64, N - 26.97; $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{OS}$; Вычислено, %: С - 50.63, Н - 6.54, N - 27.25;



2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (35b)

Выход 60 %, $T_{пл} = 97^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 5.33 (1H, уш.т, $J = 5.6$, NH), 3.32 (2H, дт, $J = 7.3$, $J = 5.6$, CH_2), 2.68 (3H, с, SCH_3), 1.72 (9H, с, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.64 (2H, п, $J = 7.3$, CH_2), 1.42 (2H, м, $J = 7.3$, CH_2), 0.96 (3H, т, $J = 7.3$, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.59 (C_2), 150.36 (C_{3a}), 145.06 (C_7), 140.47 (C_6), 65.66 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.54 (NHCH_2), 30.78 (CH_2), 27.82 ($3(\text{CH}_3)$), 20.19 (CH_2), 13.96 (CH_3), 13.80 (SCH_3);

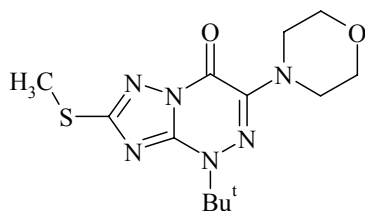
Найдено, %: C – 50.36, H – 7.33, N – 26.91; C₁₃H₂₂N₆OS; Вычислено, %: C – 50.30, H – 7.14, N – 27.07;



2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35с)

Выход 77 %, T_{пл} = 126°C, ¹H ЯМР (DMSO-D₆) спектр, δ, м.д.: 5.33 (1H, уш. с, NH), 3.58 (2H, т, J = 5.7, CH₂), 3.27 (2H, т, J = 5.7, CH₂), 3.08 (1H, уш. с, OH), 2.63 (3H, с, SCH₃), 1.68 (9H, с, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 165.90 (C₂), 150.67 (C_{3a}), 145.21 (C₇), 141.29 (C₆), 65.13 (C(CH₃)₃), 59.03 (CH₂), 44.43 (CH₂), 27.82 (3(CH₃)), 13.80 (SCH₃);

Найдено, %: C – 44.20, H – 6.13, N – 28.08; C₁₁H₁₈N₆O₂S; Вычислено, %: C – 44.28, H – 6.08, N – 28.17;

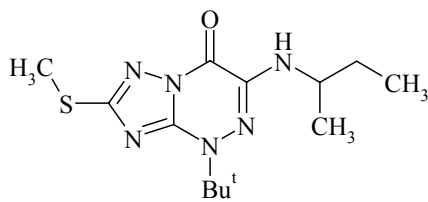


2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35d)

Выход 58 %, T_{пл} = 142°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 3.87 (4H, т, J = 4.5, CH₂), 3.50 (4H, т, J = 4.5, CH₂), 2.69 (3H, с, SCH₃), 1.72 (9H, с, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 167.42 (C₂), 150.56 (C_{3a}), 145.34 (C₇), 141.97 (C₆), 66.45 (2NCH₂, C(CH₃)₃), 48.14 (2OCH₂), 27.76 (3(CH₃)), 13.97 (SCH₃);

Найдено, %: C – 47.95, H – 5.94, N – 25.68; C₁₃H₂₀N₆O₂S; Вычислено, %: C – 48.13, H – 6.21, N – 25.91;

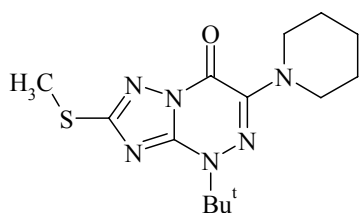
Данные РСА см. в Приложении 1



2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-втор-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35е)

Выход 49 %, T_{пл} = 101°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 4.19 (1H, п, J = 7.4, CH), 2.66 (3H, с, SCH₃), 1.73 (9H, с, C(CH₃)₃), 1.63 (2H, п, J = 7.4, CH₂), 1.29 (3H, д, J = 6.6, CH₃), 1.00 (3H, т, J = 7.4, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 167.59 (C₂), 150.36 (C_{3a}), 145.06 (C₇), 140.47 (C₆), 65.66 (C(CH₃)₃), 41.54 (NHCH₂), 30.78 (CH₂), 27.82 (3(CH₃)), 20.19 (CH₂), 13.96 (CH₃), 13.80 (SCH₃);

Найдено, %: C – 50.30, H – 6.88, N – 27.30; C₁₃H₂₂N₆OS; Вычислено, %: C – 50.30, H – 7.14, N – 27.07;

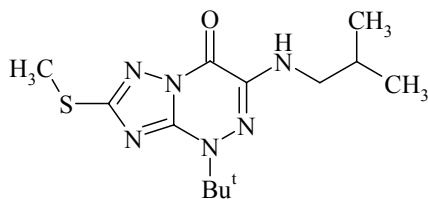


2-Метилтио-4-*трет*-бутил-6-пиперидил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (35f)

Выход 15 %, T_{пл} = 162°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 3.45 (4H, т, J = 5.7, 2CH₂), 2.69 (3H, с, SCH₃), 1.72

(13H, с, C(CH₃)₃, м, 2CH₂), 1.65 (2H, м, CH₂);

Найдено, %: С – 51.91, Н – 6.72, N – 26.23; C₁₄H₂₂N₆OS; Вычислено, %: С – 52.15, Н – 6.88, N – 26.06;

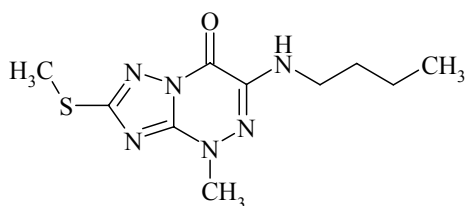


2-Метилтио-4-трет-бутил-6-изо-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (35g)

Выход 28 %, T_{пл} = 111°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 5.43 (1H, уш.с, NH), 3.15 (2H, т, J = 6,4, CH₂), 2.68

(3H, с, SCH₃), 1.97 (1H, п, J = 6.4, CH), 1.71 (9H, с, C(CH₃)₃), 0.98 (6H, д, J = 6.4, 2CH₃);

Найдено, %: С – 50.34, Н – 7.28, N – 27.19; C₁₃H₂₂N₆OS; Вычислено, %: С – 50.30, Н – 7.14, N – 27.07;

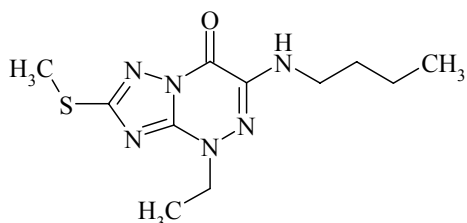


2-Метилтио-4-метил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (36a)

Выход 65 %, T_{пл} = 119°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 5.45 (1H, уш.с, NH), 3.87 (3H, с, CH₃), 3.31 (2H, м,

J = 7.3, CH₂), 2.68 (3H, с, SCH₃), 1.65 (2H, м, J = 7.3, CH₂), 1.43 (2H, м, J = 7.3, CH₂), 0.97 (3H, т, J = 7.3, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 166.56 (C₂), 151.63 (C_{3a}), 145.46 (C₇), 142.96 (C₆), 41.33 (N-CH₂), 40.67 (CH₂), 30.31 (CH₂), 20.21 (CH₂), 14.19 (CH₃), 13.77 (SCH₃);

Найдено, %: С – 45.05; Н – 6.24; N – 31.14; C₁₀H₁₆N₆OS; Вычислено, %: С – 44.76; Н – 6.01; N – 31.32;

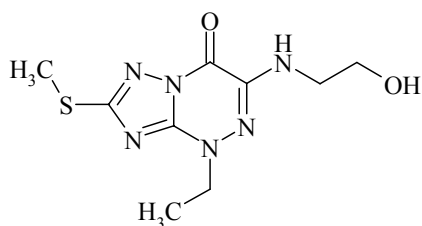


2-метилтио-4-этил-6-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (37a)

Выход 64 %, T_{пл} = 120°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 5.45 (1H, уш.с, NH), 4.24 (2H, кв, J = 7.2, CH₂), 3.32 (2H, м, J = 7.3, CH₂), 2.68 (3H, с, SCH₃), 1.65 (2H,

м, J = 7.3, CH₂), 1.44 (5H, м, CH₂, CH₃), 0.97 (3H, т, J = 7.3, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 168.42 (C₂), 150.83 (C_{3a}), 145.15 (C₇), 142.29 (C₆), 48.59 (NCH₂), 41.50 (CH₂), 30.76 (CH₂), 20.15 (CH₂), 13.96 (CH₃), 13.77 (SCH₃), 13.12 (CH₃);

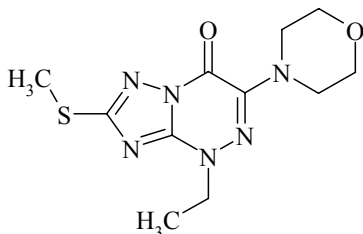
Найдено, %: С – 46.53; Н – 6.75; N – 29.62; C₁₁H₁₈N₆OS; Вычислено, %: С – 46.79; Н – 6.43; N – 29.76;



2-Метилтио-4-этил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (37b)

Выход 67 %, T_{пл} = 128°C, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ, м.д.: 6.72 (1H, уш.с, NH), 4.17 (2H, кв, J = 7.2, CH₂), 3.62 (2H, т, J = 5.6, CH₂), 3.31 (2H, м, CH₂(OH)), 2.63

(3H, c, SCH₃), 1.42 (3H, т, $J = 7.2$, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 166.61 (C₂), 151.21 (C_{3a}), 145.44 (C₇), 143.11 (C₆), 58.97 (NCH₂), 48.28 (CH₂), 44.34 (CH₂), 13.78 (SCH₃), 13.27 (CH₃);
Найдено, %: C – 40.30; H – 5.38; N – 31.01; C₉H₁₄N₆O₂S; Вычислено, %: C – 39.99; H – 5.22; N – 31.09;

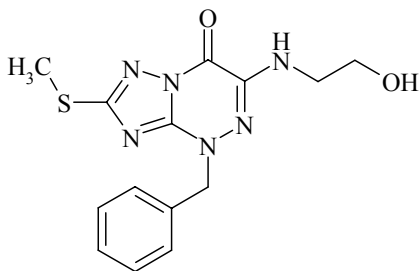


2-Метилтио-4-этил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (37с)

Выход 25 %, $T_{пл} = 107^\circ\text{C}$, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ , м.д.: 4.30 (2H, кв, $J = 7.2$, CH₂), 3.87 (4H, т, $J = 4.8$, N(CH₂)₂), 3.52 (4H, т, $J = 4.8$, O(CH₂)₂), 2.50 (3H, с,

SCH₃), 1.47 (3H, т, $J = 7.2$, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 168.22 (C₂), 151.05 (C_{3a}), 145.48 (C₇), 143.97 (C₆), 66.44 (2NCH₂), 48.87 (NCH₂), 48.15 (2OCH₂), 14.00 (SCH₃), 13.11 (CH₃);

Найдено, %: C – 44.57; H – 5.28; N – 28.03; C₁₁H₁₆N₆O₂S; Вычислено, %: C – 44.58; H – 5.44; N – 28.36;

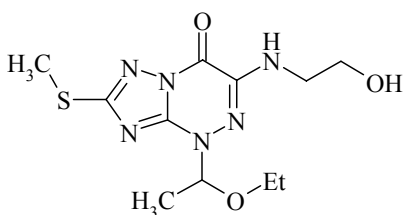


2-Метилтио-4-бензил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (38а)

Выход 64 %, $T_{пл} = 155^\circ\text{C}$, ¹H ЯМР (DMSO-d₆) спектр, δ , м.д.: 7.39 (2H, д, $J = 6.8$, Ph), 7.30 (3H, м, Ph), 6.75 (1H, т, $J = 5.5$, NH), 5.25 (2H, с, CH₂), 3.57 (2H, т, $J = 5.5$, CH₂OH), 3.27 (2H, кв, $J = 5.5$, CH₂NH), 2.62 (3H, с,

SCH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 166.61 (C₂), 151.78 (C_{3a}), 145.47 (C₇), 143.27 (C₆), 136.05 (C в C₆H₅), 128.96 (CH в C₆H₅), 128.27 (CH в C₆H₅), 58.85 (NHCH₂), 56.37 (NCH₂), 44.37 (CH₂OH), 13.81 (SCH₃);

Найдено, %: C – 50.52; H – 4.85; N – 24.99; C₁₄H₁₆N₆O₂S; Вычислено, %: C – 50.59; H – 4.85; N – 25.28;

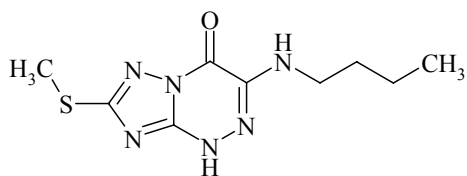


2-Метилтио-4-этоксиптил-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (39а)

Выход 56 %, $T_{пл} = 129^\circ\text{C}$, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ , м.д.: 6.71 (1H, т, $J = 5.7$, NH), 5.89 (1H, кв, $J = 4.0$, CH),

4.52 (1H, т, $J = 5.7$, OH), 3.62 (2H, кв, $J = 5.7$, CH₂NH), 3.47 (2H, м, OCH₂), 3.34 (2H, кв, $J = 5.7$, CH₂OH), 2.61 (3H, с, SCH₃), 1.59 (3H, д, $J = 8.0$, CH₃), 1.13 (3H, т, $J = 8.0$, CH₃(CH₂));

Найдено, %: C – 41.73; H – 5.89; N – 26.53; C₁₁H₁₈N₆O₃S; Вычислено, %: C – 42.03; H – 5.77; N – 26.73;

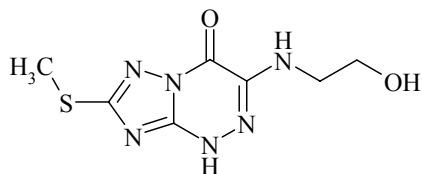


2-Метилтио-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин(4H)-7-он (40a)

Выход 27 %, $T_{пл} = 121^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 11.4 (1H, уш.с, NH), 5.50 (1H, уш.т, $J = 4.8$, NH),

3.34 (2H, кв, $J = 7.2$, CH_2), 2.71 (3H, с, SCH_3), 1.66 (2H, п, $J = 7.2$, CH_2), 1.44 (2H, м, $J = 7.2$, CH_2), 0.97 (3H, т, $J = 7.2$, CH_3);

Найдено, %: C – 42.59, H – 5.60, N – 32.89; $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_6\text{OS}$; Вычислено, %: C – 42.51, H – 5.55, N – 33.05;

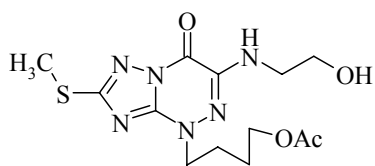


2-Метилтио-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин(4H)-7-он (40b)

Выход 31 %, $T_{пл} = 230^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$) спектр, δ , м.д.: 13.24 (1H, уш.с, NH), 6.53 (1H, уш.т, $J = 5.2$,

NH), 4.59 (1H, уш.с, OH), 3.58 (2H, уш.с, CH_2), 3.28 (2H, кв, $J = 5.6$, CH_2), 2.60 (3H, с, SCH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$): 166.76 (C_2), 151.95 (C_{3a}), 145.93 (C_7), 143.09 (C_6), 59.06 (CH_2NH), 44.28 (CH_2OH), 13.80 (SCH_3);

Найдено, %: C – 34.86, H – 3.95, N – 34.90; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$; Вычислено, %: C – 34.71, H – 4.16, N – 34.69;

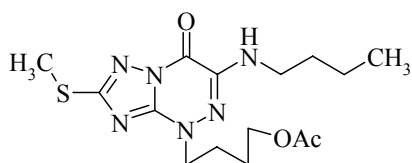


2-Метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-(2'-гидроксиэтиламино)-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (42a)

Выход 85 %, $T_{пл} = 127^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$) спектр,

δ , м.д.: 6.61 (1H, уш.т., NH), 4.48 (1H, уш.т., OH), 4.15 (2H, т, $J = 6,8$, CH_2), 4.06 (2H, т, $J = 6,8$, CH_2), 3.63 (2H, к, $J = 5.5$, CH_2), 3.33 (2H, к, $J = 5.5$, CH_2), 2.63 (3H, с, SCH_3), 2.00 (3H, с, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.92 (2H, п, $J = 7$, CH_2), 1.68 (2H, п, $J = 7$, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$): 170.81 ($\text{C}=\text{O}(\text{CH}_3)$), 166.57 (C_2), 151.64 (C_{3a}), 145.45 (C_7), 143.07 (C_6), 63.75 (CH_2), 59.00 (CH_2), 52.48 (CH_2), 44.37 (CH_2), 25.41 (CH_2), 24.33 (CH_2), 21.12 ($\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})$), 13.78 (SCH_3);

Найдено, %: C – 43.83, H – 5.76, N – 23.51; $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$; Вычислено, %: C – 43.81, H – 5.66, N – 23.58;



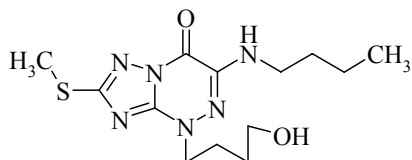
2-Метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (42b)

Выход 40 %, $T_{пл} = 135^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (CDCl_3) спектр, δ , м.д.: 5.46 (1H, уш.т., $J = 6.0$, NH), 4.21 (2H, т, $J = 7.0$,

NCH_2), 4.12 (2H, т, $J = 6.0$, CH_2O), 3.31 (2H, к, $J = 5.8$, NHCH_2), 2.68 (3H, с, SCH_3), 2.05 (3H, с, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.97 (2H, п, $J = 7.5$, CH_2), 1.70 (2H, п, $J = 7.5$, CH_2), 1.64 (2H, п, $J = 7.5$,

CH₂), 1.43 (2H, м, $J = 7.5$, CH₂CH₃), 0.97 (3H, т, $J = 7.5$, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 171.01 (C=O(CH₃)), 168.43 (C₂), 151.16 (C_{3a}), 145.06 (C₇), 142.22 (C₆), 63.66 (OCH₂), 52.76 (NCH₂), 41.51 (NHCH₂), 30.72 (CH₂), 25.53 (CH₂), 24.50 (CH₂), 20.90 (C(O)CH₃), 20.14 (CH₂CH₃), 13.94 (SCH₃), 13.93 (CH₃);

Найдено, %: С – 49.11, Н – 6.45, N – 22.75; C₁₅H₂₄N₆O₃S; Вычислено, %: С – 48.90, Н – 6.57, N – 22.81;



2-Метилтио-4-(4-гидроксибутил)-6-*n*-бутиламино-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-он (43а)

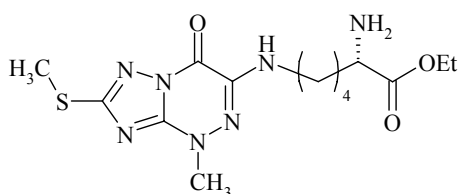
Выход 35 %, T_{пл} = 132°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) спектр, δ, м.д.: 5.49 (1H, уш.т., $J = 6.0$, NH), 4.23 (2H, т, $J = 7.0$,

OCH₂), 3.71 (2H, т, $J = 7.0$, NCH₂), 3.31 (2H, кв, $J = 6.0$, NHCH₂), 2.67 (3H, с, SCH₃), 2.26 (1H, уш.с, OH), 1.98 (2H, п, $J = 7.5$, CH₂), 1.63 (4H, м, 2CH₂), 1.42 (2H, м, $J = 7.5$, CH₂CH₃), 0.96 (3H, т, $J = 7.5$, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): 168.43 (C₂), 151.20 (C_{3a}), 145.13 (C₇), 142.33 (C₆), 62.18 (OCH₂), 53.24 (NCH₂), 41.61 (NHCH₂), 30.80 (CH₂), 29.22 (CH₂), 24.63 (CH₂), 20.24 (CH₂CH₃), 14.04 (SCH₃), 13.87 (CH₃);

Найдено, %: С – 47.59, Н – 7.04, N – 25.56; C₁₃H₂₂N₆O₂S; Вычислено, %: С – 47.84, Н – 6.79, N – 25.75;

Общая методика синтеза этиловых эфиров 2-амино-6-(1-*R*-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (35h,36b,37d,38b,42c)

К раствору 0,247 г (0,001 моль) этилового эфира L-лизина дигидрохлорида с 0.279 мл (0.002 моль) триэтиламина в абсолютном этаноле прибавляют свежеприготовленный раствор 0.001 моль 2-метилтио-4-*R'*-6-нитро-1,2,4-триазол[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (24-26,29,41) в абсолютном этаноле. Реакционную массу выдерживают при температуре 60-70°C и перемешивании от 3 до 7 дней. Окончание реакции определяют с помощью ТСХ. Продукт очищают с использованием колоночной хроматографии, элюент этилацетат : этанол = 4 : 1.

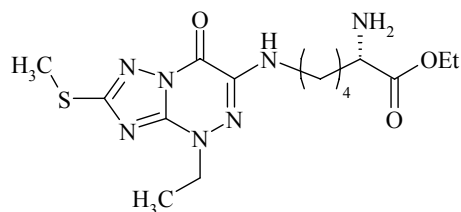


Этиловый эфир 2-амино-6-(1-метил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (36b)

Выход 16 %, T_{пл} = 86°C, ¹H ЯМР (DMSO-*d*₆) спектр, δ, м.д.: 6.93 (1H, т, $J = 5.7$, NH), 4.13 (2H, м, CH₂(CH)), 3.77 (3H, с, NCH₃), 3.41 (1H, дд, $J = 6.8$, CH), 3.21 (2H, к, $J = 6.9$, OCH₂), 2.60 (3H, с, SCH₃), 1.51 – 1.70 (4H, м, 2CH₂), 1.41 (2H, дд, $J = 14.9, 7.6$, CH₂), 1.25 (3H, т, $J = 7.1$, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 174.22 (C=O(OEt)), 166.60 (C₂), 151.68 (C_{3a}), 145.48 (C₇),

142.97 (C₆), 60.92 (CH₂), 53.70 (CH), 41.35 (OCH₂), 40.68 (NCH₃), 33.30 (CH₂), 27.85 (NHCH₂), 22.88 (CH₂), 14.52 (CH₃), 13.78 (SCH₃);

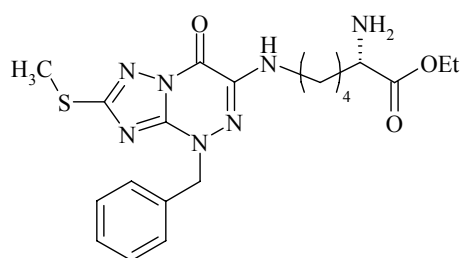
Найдено, %: С – 45.33, Н – 5.99, N – 26.42; C₁₄H₂₃N₇O₃S; Вычислено, %: С – 45.52, Н – 6.28, N – 26.54



Этиловый эфир 2-амино-6-(1-этил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]-триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (37d)

Выход 14 %, T_{пл} = 67°C, ¹H ЯМР (DMSO-D₆) спектр, δ, м.д.: 6.96 (1H, т, J = 5.7, NH), 4.07 – 4.17 (4H, м, NCH₂, CH₂(CH)), 3.32 (1H, дд, J = 7.2, 5.8, CH), 3.22 (2H, к, J = 6.8, OCH₂), 2.60 (3H, с, SCH₃), 1.43 – 1.67 (6H, м, 3CH₂), 1.39 (3H, т, J = 7.1, CH₃(NCH₂)), 1.17 (3H, т, J = 7.1, CH₃(OCH₂)); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 175.73 (C=O(OEt)), 166.57 (C₂), 151.14 (C_{3a}), 145.41 (C₇), 143.05 (C₆), 60.48 (NCH₂), 54.19 (CH), 48.23 (CH₂(CH)), 41.42 (OCH₂), 34.40 (CH₂), 27.94 (NHCH₂), 23.12 (CH₂), 14.56 (CH₃(OCH₂)), 13.78 (SCH₃), 13.25 (CH₃);

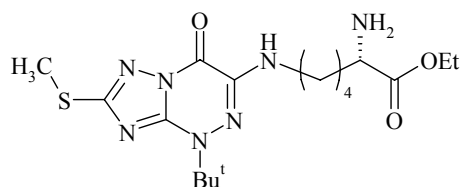
Найдено, %: С - 46.82, Н - 6.57, N - 25.38; C₁₅H₂₅N₇O₃S; Вычислено, %: С – 46.98, Н – 6.57, N – 25.57



Этиловый эфир 2-амино-6-(1-бензил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]-триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (38b)

Выход 5 %, T_{пл} = 77°C, ¹H ЯМР (DMSO-D₆) спектр, δ, м.д.: 7.23–7.45 (5H, м, Ph), 5.24 (2H, с, NCH₂), 4.05–4.17 (2H, м, CH₂(CH)), 3.36 (1H, дд, J = 7.4, 5.5, CH), 3.22 (2H, м, OCH₂), 2.62 (3H, с, SCH₃), 1.45–1.70 (4H, м, 2CH₂), 1.30–1.43 (2H, м, CH₂), 1.23 (3H, т, J = 7.1, CH₃);

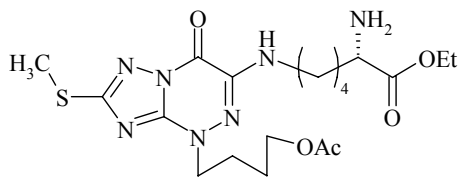
Найдено, %: С – 53.69, Н – 5.96, N – 22.27; C₂₀H₂₇N₇O₃S; Вычислено, %: С – 53.92, Н – 6.11, N – 22.01



Этиловый эфир 2-амино-6-(1-*tert*-бутил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]-триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (35h)

Выход 7 %, T_{пл} = 75°C, ¹H ЯМР (DMSO-D₆) спектр, δ, 6.84 (1H, т, J = 5.7, NH), 4.10 (2H, м, CH₂(CH)), 3.26 (3H, м, CH, OCH₂), 2.62 (3H, с, SCH₃), 1.69 (9H, с, C(CH₃)₃), 1.34.-1.66 (6H, м, 3CH₂), 1.24 (3H, т, J = 7.1, CH₃);

m/z : 411 (вычислено 411 для $[C_{17}H_{30}N_7O_3S]^+$, $[M]^+$)



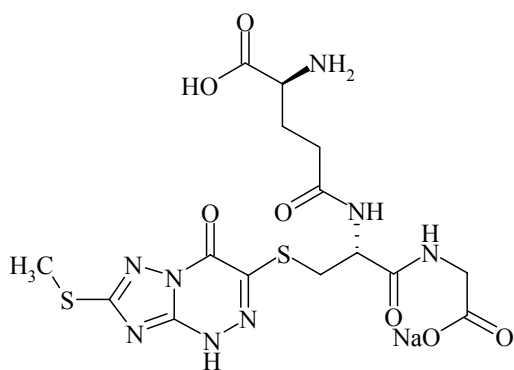
Этиловый эфир 2-амино-6-(1-ацетоксибутил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]-триазин-3-иламино)-гексановой кислоты (42с)

Выход 20 %, $T_{пл} = 70^\circ C$, 1H ЯМР (DMSO- D_6) спектр, δ , 6.99 (1H, т, $J = 5.6$, NH), 4.12 (4H, м, 2CH₂), 4.05 (2H, т, $J = 6.5$, NCH₂), 3.36 (1H, дд, $J = 7.3, 5.5$, CH), 3.23 (2H, м, OCH₂), 2.62 (3H, с, SCH₃), 2.00 (3H, с, CH₃(C=O)), 1.89 (2H, м, CH₂), 1.33-1.75 (8H, м, 4CH₂), 1.25 (3H, т, $J = 7.1$, CH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 175.83(C=O(OEt)), 170.77 (C=O(CH₃)), 166.53 (C₂), 151.56 (C_{3a}), 145.42 (C₇), 142.99 (C₆), 63.75 (NCH₂), 60.43 (OCH₂), 54.25 (CH), 52.43 (CH₂), 41.46 (OCH₂), 34.51 (CH₂), 27.93 (NHCH₂), 25.42 (CH₂), 24.30 (CH₂), 23.15 (CH₂), 21.10 (CH₃C=O), 14.54 (CH₃), 13.77 (SCH₃);

Найдено, %: C – 48.46, H – 6.35, N – 20.83; $C_{19}H_{31}N_7O_5S$; Вычислено, %: C – 48.60, H – 6.65, N – 20.88

Синтез натриевой соли 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты (44)

К 307 мг восстановленного глутатиона приливают эквивалент 1M раствора $NaHCO_3$, смесь выдерживают 20 минут под вакуумом в колбе Шленка. Далее через септу прибавляют раствор 228 мг 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**15a**) в воде. Реакционную массу выдерживают в атмосфере аргона в течение недели при температуре $38^\circ C$. Продукт выделяют при помощи колоночной хроматографии в системе бутанол:уксусная кислота:вода = 4:1:1.



Натриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты (44)

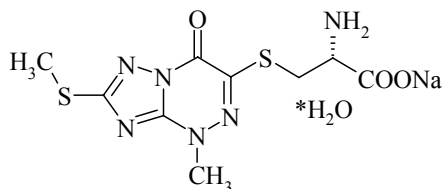
Выход 7 %, $T_{пл} = 297^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4,69 (1H, дд, $J = 8.6, 4.3$, CH), 3,66-3,87 (4H, м, H_a в SCH₂, CH₂, CHNH₂), 3,39 (1H, дд, $J = 14.3, 8.6$, H_b в SCH₂), 2,65 (3H, с, SCH₃), 2,52 (2H, дд, $J = 12.4, 7.5$, CH₂), 2,15 (2H, дд, $J = 12.4, 7.5$, CH₂);

m/z : 511.0751 (вычислено 511.0789 для $[C_{15}H_{19}N_8NaO_7S_2]^+$, $[M+H]^+$)

Общая методика замещения нитрогруппы S-нуклеофилами в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах (24-29,41,45)

0.001 моль исходного триазолотриазина (24-29,41,45) растворяют в абсолютном этаноле и приливают к свежеприготовленному раствору 0.001 моль цистеина (глутатиона) в 1 экв., либо без основания (для цистеина) или 3 экв. (для глутатиона) 1М раствора гидрокарбоната натрия при перемешивании и комнатной температуре. Продукт отфильтровывают и перекристаллизовывают из 50% этанола (для цистеинзамещенных продуктов) или 65% этанола (для глутатионзамещенных продуктов).

Динатриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-пивалоилоксиметил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты дигидрат (46b). Продукт выделяют при помощи колоночной хроматографии, элюент – бутанол : уксусная кислота : вода = 4:1:1.



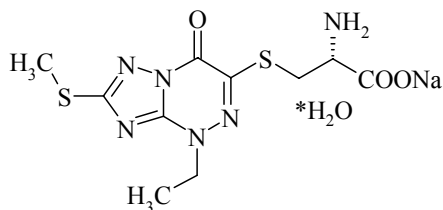
Натриевая соль 2-метилтио-4-метил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (36с)

Выход 62 %, $T_{пл} = 185^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4.55 (1H, дд, $J = 8.0, 4.2$, CHN), 4.06 (3H, с, CH_3), 3.98 (1H, дд, $J = 15.0, 4.2$, H_a в SCH_2), 3.67 (1H, дд, $J = 15.0, 8.0$, H_b в SCH_2), 2.67 (3H, с, SCH_3); ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOD}$): 169.65 (COONa), 168.62 (C_2), 151.34 (C_{3a}), 146.87 (C_7), 141.32 (C_6), 51.49 (CHN), 41.45 (CH_3N), 29.20 (SCH_2), 13.16 (SCH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1698 (C=O);

$[\alpha]_D = -5.86$ ($c = 2.18$, 50% TFA);

Найдено, %: C - 30.58, H - 3.99, N - 23.75; $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{NaO}_3\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 30.33, H - 3.68, N - 23.58;



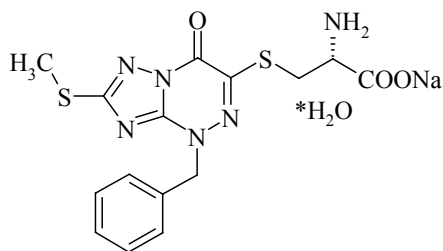
Натриевая соль 2-метилтио-4-этил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (37е)

Выход 68 %, $T_{пл} = 210^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4.45 (2H, кв, $J = 7.1$, CH_2), 4.17 (1H, дд, $J = 8.4, 4.1$, CHN), 3.93 (1H, дд, $J = 15.0, 4.1$, H_a в SCH_2), 3.55 (1H, дд, $J = 15.0, 8.4$, H_b в SCH_2), 2.69 (3H, с, SCH_3), 1.48 (3H, т, $J = 7.1$, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOD}$): 169.64 (COONa), 168.63 (C_2), 151.11 (C_{3a}), 147.22 (C_7), 141.26 (C_6), 51.55 (CHN), 50.29 (CH_2N), 29.30 (SCH_2), 13.16 (SCH_3), 12.23 (CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1691 (C=O)

$[\alpha]_D = -6.28$ ($c = 2.17$, 50% TFA);

Найдено, %: C - 34.17, H - 4.57, N - 23.84; $C_{10}H_{14}N_6NaO_3S_2 \cdot H_2O$; Вычислено, %: C - 34.47, H - 4.63, N - 24.12;

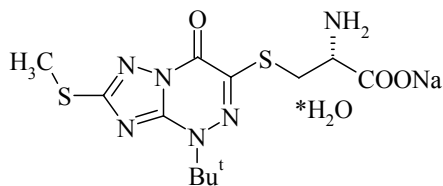


Натриевая соль 2-метилтио-4-бензил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (38с)

Выход 56 %, $T_{пл} = 154^\circ C$, 1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 7.52 (2H, д, $J = 6.7$, Ph), 7.33 (3H, м Ph), 5.48 (2H, с, CH_2), 3.75 (1H, дд, $J = 14.3, 3.3$, CHN), 3.52 (1H, дд, $J = 8.7, 3.3$, H_a в SCH_2), 3.23 (1H, дд, $J = 14.3, 8.7$, H_b в SCH_2), 2.64 (3H, с, SCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 168.36 (COONa), 165.10 (C_2), 152.45 (C_{3a}), 149.23 (C_7), 136.84 (C_6), 128.95 (Ph), 128.50 (Ph), 128.17 (Ph), 128.13 (Ph), 55.97 (CH_2N), 52.30 (CH), 29.54 (SCH_2), 13.81 (SCH_3);

$[\alpha]_D = -12.21$ ($c = 1.33$, 50% TFA);

Найдено, %: C - 43.62, H - 4.30, N - 20.25; $C_{15}H_{16}N_6O_3S_2 \cdot H_2O$; Вычислено, %: C - 43.89, H - 4.42, N - 20.47;



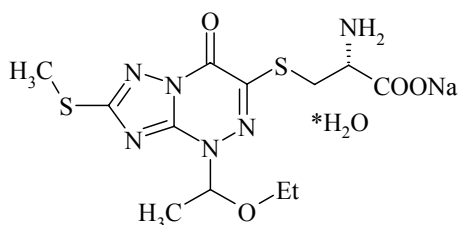
Натриевая соль 2-метилтио-4-*tert*-бутил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (35i)

Выход 27 %, $T_{пл} = 168^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4.13 (1H, дд, $J = 9.4, 4.0$, CHN), 3.98 (1H, дд, $J = 14.7, 4.0$, H_a в SCH_2), 3.47 (1H, дд, $J = 14.7, 9.4$, H_b в SCH_2), 2.70 (3H, с, SCH_3), 1.77 (9H, с, $3CH_3$); ^{13}C NMR ($D_2O + CF_3COOD$): 169.17 (COONa), 167.92 (C_2), 150.27 (C_{3a}), 146.94 (C_7), 137.73 (C_6), 68.58 ($C(CH_3)_3$), 51.09 (CHN), 28.81 ($3CH_3$), 26.56 (SCH_2), 12.87 (SCH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1696 (C=O);

$[\alpha]_D = -20.40$ ($c = 1.93$, 10% TFA);

Найдено, %: C - 36.29, H - 4.78, N - 21.12; $C_{12}H_{17}N_6NaO_3S_2 \cdot H_2O$; Вычислено, %: C - 36.17, H - 4.81, N - 21.09;

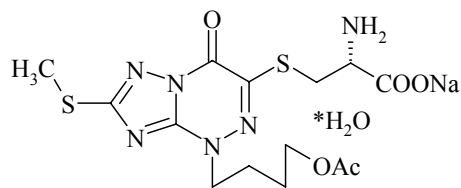


Натриевая соль 2-метилтио-4-этоксиил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (39b)

Выход 55 %, 1H ЯМР (DMSO- d_6) спектр, δ , м.д.: 5.99 (1H, м, CHN), 3.79 (2H, м, SCH_2), 3.52 (2H, м, OCH_2), 3.28 (1H, м, CH), 2.64 (3H, с, SCH_3), 1.70 (3H, д, $J = 5.8$, CH_3), 1.16 (3H, м, CH_3);

Технический продукт был использован на следующей стадии удаления защитной группы

без дополнительной очистки.



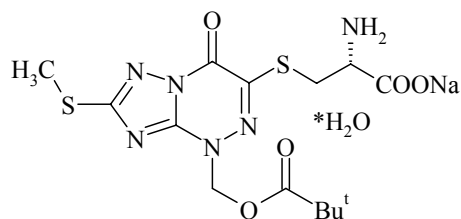
Натриевая соль 2-метилтио-4-ацетоксибутил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (42d)

Выход 46 %, $T_{пл} = 176^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.45 (2H, т, $J = 6.5$, CH_2N), 4.14 (3H, м, OCH_2 , CHN), 3.93 (1H, дд, $J = 4.2, 15.0$, SCH_2), 3.52 (1H, дд, $J = 8.8, 15.0$, SCH_2), 2.66 (3H, с, SCH_3), 2.08 (3H, с, $(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (2H, п, $J = 6.5$, CH_2), 1.75 (2H, п, $J = 7.2$, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): 170.34 ($\text{OC}=\text{O}$), 164.49 (COONa), 151.65 (C_2), 148.84 (C_{3a}), 145.96 (C_7), 124.17 (C_6), 63.34 (NCH_2), 51.74 (OCH_2), 25.11 (CH_2), 24.84 (SCH_2), 24.29 (CH_2), 20.67 ($\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})$), 13.40 (SCH_3), 13.27 (CH_2);

$[\alpha]_D = -13.70$ ($c = 2.07$, 50% TFA);

Найдено, %: C - 36.80, H - 4.89, N - 18.72; $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{NaO}_5\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 36.84, H - 4.64, N - 18.41;



Натриевая соль 2-метилтио-4-пивалоилоксиметил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (46a)

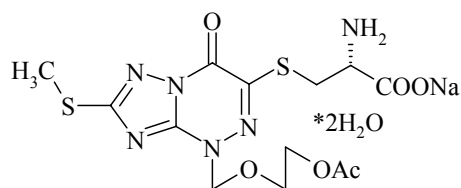
Выход 35 %, $T_{пл} = 163^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 6.28 (2H, с, CH_2N), 4.21 (1H, дд, $J = 8.1, 4.2$, CHN), 3.90 (1H, дд, $J = 15.0, 4.2$, H_a в SCH_2), 3.55 (1H, дд, $J = 15.0, 8.1$, H_b в SCH_2), 2.67 (3H, с, SCH_3), 1.18 (9H, с, 3CH_3); ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOD}$): 178.99 ($\text{C}=\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 169.33 (COONa), 168.88 (C_2), 151.22 (C_{3a}), 146.62 (C_7), 143.23 (C_6), 74.67 (CH_2N), 51.65 (CHN), 38.62 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.37 (SCH_2), 25.89 (3CH_3), 13.21 (SCH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1711 ($\text{C}=\text{O}$);

$[\alpha]_D = -20.40$ ($c = 1.75$, 10% TFA);

Найдено, %: C - 36.53, H - 4.51, N - 18.48; $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{NaO}_5\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 36.84, H - 4.64, N - 18.41;



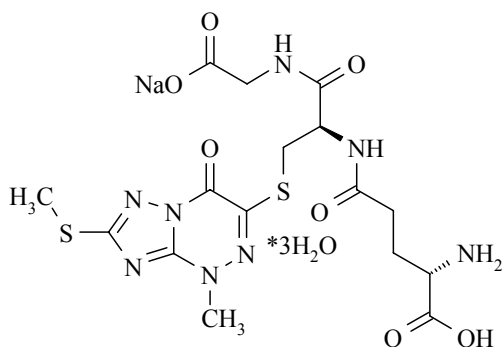
Натриевая соль 2-метилтио-4-(2-ацетоксиэтокси)-метил-6-(2'-амино-2'-карбоксиилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она дигидрат (47a)

Выход 51 %, $T_{пл} = 159^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 5.77 (2H, с, NCH_2), 4.18 (3H, м, CH_2 , CH), 3.97 (3H, м, CH_2 , SCH_2), 3.54 (1H, с, SCH_2), 2.63 (3H, с, SCH_3), 2.00 (3H, с, CH_3);

^{13}C NMR (D_2O): 174.27 (OC=O), 171.89 (COONa), 169.12 (C_2), 152.08 (C_{3a}), 147.64 (C_7), 143.59 (C_6), 83.39 (NCH₂), 68.58 (OCH₂), 63.91 (OCH₂), 53.68 (CH), 30.72 (SCH₂), 20.48(CH₃(C=O)), 13.71 (SCH₃);

$[\alpha]_{\text{D}} = -4.48$ ($c = 1.34$, H_2O);

Найдено, %: C - 35.22, H - 4.70, N - 19.05; $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{NaO}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 35.14, H - 4.76, N - 18.91;



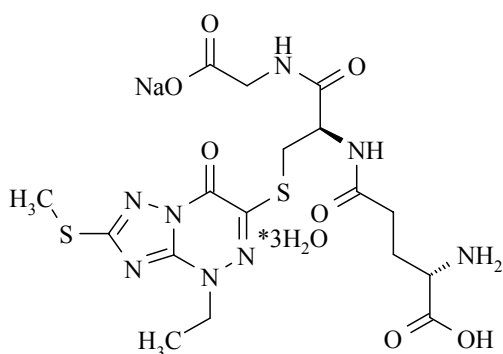
Натриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметилкарбамоил)-2-(1-метил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (36d)

Выход 34 %, $T_{\text{пл}} = 242^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.88 (1H, дд, $J = 8.8, 4.9$, CH), 4.06 (3H, с, NCH₃), 3.79 (4H, м, H_a в SCH₂, CH₂, CHNH₂), 3.39 (1H, м, H_b в SCH₂), 2.67 (3H, с, SCH₃), 2.54 (2H, м, CH₂), 2.15 (2H, м, CH₂); ^{13}C NMR (D_2O): 176.11 (COOH), 174.97 (C=O(NH)), 173.97 (COONa), 171.33 (C=O(NH)), 168.59 (C_2), 151.57 (C_{3a}), 147.40 (C_7), 142.51 (C_6), 54.17 (CH(NH₂)), 51.78 (CH(SCH₂)), 43.47 (CH₂(COOH)), 41.63 (NCH₃), 31.52 (CH₂(C=O)), 31.29 (SCH₂), 26.28 (CH₂(CH)), 13.37 (SCH₃);

$[\alpha]_{\text{D}} = -35.65$ ($c = 2.09$, H_2O);

Найдено, %: C - 33.29, H - 4.80, N - 19.12; $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{NaO}_7\text{S}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 33.22, H - 4.70, N - 19.37;



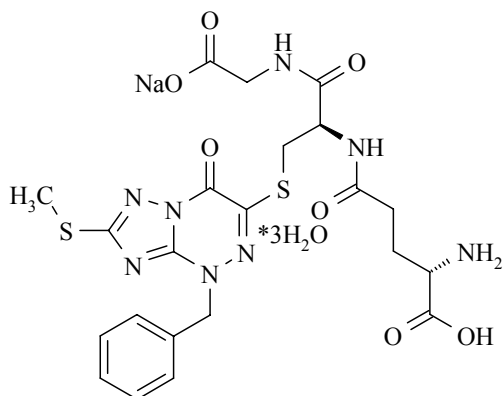
Натриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметилкарбамоил)-2-(1-этил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (37f)

Выход 35 %, $T_{\text{пл}} = 210^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.90 (1H, дд, $J = 8.9, 5.1$, CH), 4.43 (2H, к, $J = 7.2$, CH₂), 3.75 (4H, м, H_a в SCH₂, CH₂, CHNH₂), 3.39 (1H, дд, $J = 14.3, 9.0$, H_b в SCH₂), 2.67 (3H, с, SCH₃), 2.52 (2H, м, CH₂), 2.11 (2H, м, CH₂), 1.50 (3H, т, $J = 7.2$, CH₃); ^{13}C NMR (D_2O): 176.09 (COOH), 175.06 (C=O(NH)), 174.35 (COOH), 171.33 (C=O(NH)), 168.16 (C_2), 151.08 (C_{3a}), 147.38 (C_7), 142.48 (C_6), 54.08 (CH(NH₂)), 51.53 (CH(SCH₂)), 50.25 (NCH₂), 43.31 (CH₂(COOH)), 31.43 (CH₂(CH₂CH)), 31.07 (SCH₂), 26.44 (CH₂(CH)), 13.22 (SCH₃), 12.41 (CH₃);

$[\alpha]_D = -25.66$ ($c = 2.29$, H_2O);

Найдено, %: C - 34.41, H - 4.87, N - 18.63; $C_{17}H_{23}N_8NaO_7S_2 \cdot 3H_2O$; Вычислено, %: C - 34.46, H - 4.93, N - 18.91;



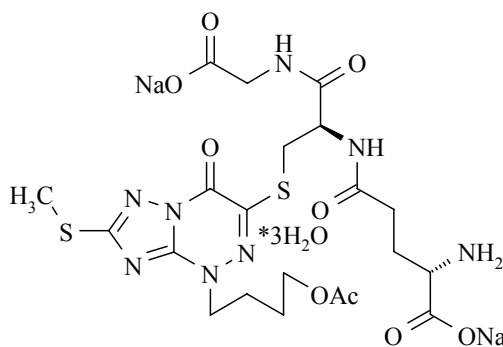
Натриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-бензил-7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (38d)

Выход 23 %, $T_{пл} = 231^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 7.41 (5H, м, Ph), 5.64 (1H, д, $J = 14.6$, H_a в

CH_2), 5.45 (1H, д, $J = 14.6$, H_b в CH_2), 4.62 (1H, дд, $J = 9.7, 4.6$, CH), 3.71 (4H, м, H_a в SCH_2 , CH_2 , $CHNH_2$), 3.19 (1H, дд, $J = 14.4, 9.8$, H_b в SCH_2), 2.69 (3H, с, SCH_3), 2.45 (2H, м, CH_2), 2.07 (2H, м, CH_2); ^{13}C NMR (D_2O): 176.09 (COONa), 174.97 (C=O(NH)), 174.37 (COONa), 171.16 (C=O(NH)), 168.54 (C_2), 151.40 (C_{3a}), 147.01 (C_7), 143.09 (C_6), 133.90 (Ph), 129.02 (Ph), 128.90 (Ph), 128.84 (Ph), 57.77 (NCH₂), 54.42 ((CH(NH₂))), 51.31 (CH(NH)), 43.56 (CH_2 (COONa)), 31.75 (CH_2 (CH)), 31.46 (CH_2 (C=O)), 26.70 (SCH_2), 13.67 (SCH_3);

$[\alpha]_D = -43.82$ ($c = 2.00$, H_2O);

Найдено, %: C - 39.24, H - 4.71, N - 16.41; $C_{22}H_{24}N_8Na_2O_7S_2 \cdot 3H_2O$; Вычислено, %: C - 39.05, H - 4.47, N - 16.56;



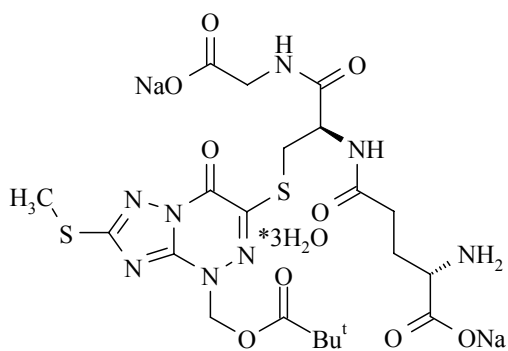
Динатриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-ацетоксибутил-7-метил-сульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (42e)

Выход 42 %, $T_{пл} = 172^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.91 (1H, м, CH), 4.45 (2H, м, CH_2), 4.13 (2H, м, CH_2), 3.73 (4H, м, H_a в SCH_2 , CH_2 , $CHNH_2$), 3.35 (1H, м, H_b в SCH_2), 2.68 (3H, с, SCH_3), 2.51 (2H, м, CH_2), 2.06 (7H, м, (C=O)CH₃, CH_2 , CH_2), 1.75 (2H, м, CH_2); ^{13}C NMR (D_2O): 176.04 (COONa), 175.29 (COONa), 174.51 (C=O(NH)), 171.28 (C=O(CH₃)), 168.47 (C=O(NH)), 166.18 (C_2), 151.42 (C_{3a}), 147.34 (C_7), 142.71 (C_6), 64.63 (OCH₂), 54.38 (CH(NH₂)(COONa)), 54.23 (CH(NH)(C=O)), 51.36 (NCH₂), 43.36 (CH_2 (COONa)), 31.64 (CH_2 (CH)), 31.25 (CH_2 (C=O)), 27.25 (SCH_2), 24.72 (CH_2), 23.94 (CH_2), 20.40 (CH₃(C=O)), 13.30 (SCH_3);

$[\alpha]_D = -27.81$ ($c = 2.48$, H_2O);

Найдено, %: С - 36.21, Н - 4.73, N - 15.73; $C_{21}H_{28}N_8Na_2O_9S_2 \cdot 3H_2O$; Вычислено, %: С - 36.00, Н - 4.89, N - 15.99;



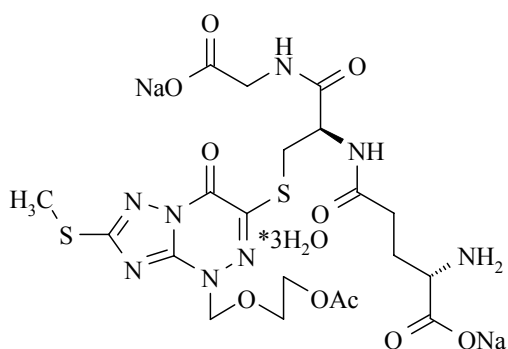
Динатриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-пивалоилоксиметил-7-метил-сульфанил)-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (46b)

Выход 38 %, $T_{пл} = 224^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 6.30 (2H, дд, $J = 24.1, 11.0$, CH_2), 4.95 (1H, дд,

$J = 10.0, 4.5$, CH), 3.82 (4H, м, H_a в SCH_2 , CH_2 , $CHNH_2$), 3.27 (1H, dd, $J = 14.4, 9.9$, H_b в CH_2), 2.68 (3H, с, SCH_3), 2.52 (2H, dd, $J = 15.4, 7.1$, CH_2), 2.13 (2H, м, CH_2), 1.17 (9H, с, $C(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (D_2O): 179.69 (OC=O), 175.98 (COONa), 175.04 (C=O(NH)), 173.93 (COONa), 171.42 (C=O(NH)), 168.68 (C_2), 151.59 (C_{3a}), 147.36 (C_7), 144.55 (C_6), 74.56 (NCH_2), 54.49 ($CH(NH_2)$), 51.01 ($CH(SCH_2)$), 43.49 ($CH_2(COOH)$), 38.76 ($C(CH_3)_3$), 31.69 ($CH_2(C=O)$), 31.65 (SCH_2), 26.43 ($CH_2(CH)$), 26.17 (SCH_2), 13.49 (SCH_3);

$[\alpha]_D = -28.80$ ($c = 1.00$, H_2O);

Найдено, %: С - 36.28, Н - 5.07, N - 15.74; $C_{21}H_{28}N_8Na_2O_9S_2 \cdot 3H_2O$; Вычислено, %: С - 36.00, Н - 4.89, N - 15.99;



Динатриевая соль 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-(2-ацетоксиэтокси)-метил-7-метил-сульфанил)-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты тригидрат (47b)

Выход 45 %, $T_{пл} = 234^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

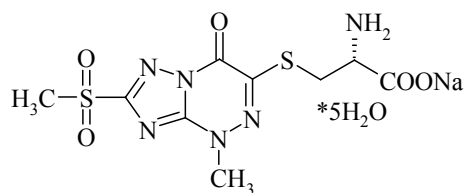
м.д.: 5.72 (2H, с, NCH_2), 4.80 (1H, дд, $J = 10.0, 5.0$, CH), 4.16 (2H, дд, $J = 5.3, 3.7$, CH_2), 3.92 (2H, дд, $J = 5.3, 3.7$, CH_2), 3.75 (4H, м, H_a в SCH_2 , CH_2 , $CHNH_2$), 3.28 (1H, дд, $J = 14.3, 9.4$, H_b в CH_2), 2.60 (3H, с, SCH_3), 2.45 (2H, м, CH_2), 2.07 (2H, дд, $J = 14.2, 7.7$, CH_2), 1.94 (3H, с, $(C=O)CH_3$); ^{13}C NMR (D_2O): 175.68 (COONa), 175.25 (C=O(NH)), 174.24 (COONa), 173.96 (C=O(CH_3)), 171.54 (C=O(NH)), 169.03 (C_2), 152.07 (C_{3a}), 147.72 (C_7), 144.17 (C_6), 83.41 (NCH_2), 68.62 (OCH_2), 63.97 (OCH_2), 54.57 ($CH(NH_2)$), 51.99 ($CH(SCH_2)$), 43.48 ($CH_2(COOH)$), 31.90 (CH_2), 31.73 (SCH_2), 26.56 ($CH_2(CHNH)$), 20.49 ($CH_3(C=O)$), 13.74 (SCH_3);

$[\alpha]_D = -27.21$ ($c = 1.09$, 10% TFA);

Найдено, %: С - 35.47, Н - 4.91, N - 16.73; $C_{20}H_{27}N_8NaO_{10}S_2 \cdot 3H_2O$; Вычислено, %: С - 35.29, Н - 4.89, N - 16.46;

Общая методика получения 2-метилсульфонил-4-алкил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов пентагидратов (48,49).

Триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (31 или 32) растворяют в этаноле и приливают к свежеприготовленному раствору одного эквивалента цистеина гидрохлорида в 1М растворе гидрокарбоната натрия (1 экв.) при перемешивании и комнатной температуре. Реакционную массу оставляют на час, а затем упаривают растворитель в вакууме. Полученный осадок кристаллизуют из водного этанола.



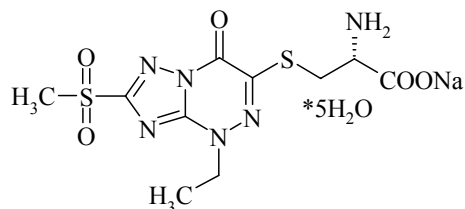
2-Метилсульфонил-4-метил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она пентагидрат (48)

Выход 56 %, $T_{пл} = 102^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.41 (1H, дд, $J = 6.4, 3.3$, CHN), 3.51 (1H, дд, $J = 13.1, 3.3$, H_a в SCH_2), 3.32 (1H, дд, $J = 13.1, 6.4$, H_b в SCH_2), 3.28 (3H, с, SO_2CH_3), 3.25 (3H, с, NCH_3); ^{13}C NMR (D_2O): 174.74 (COOH), 166.76 (C_2), 160.00 (C_{3a}), 158.25 (C_7), 155.27 (C_6), 55.79 (CHN), 42.47 (SO_2CH_3), 40.22 (CH_3N), 29.87 (SCH_2);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1615 (C=O); 1294, 1133 ($-SO_2-$);

Найдено, %: С - 24.55, Н - 5.28, N - 18.92; $C_9H_{12}N_6O_5S_2 \cdot 5H_2O$; Вычислено, %: С - 24.66, Н - 5.06, N - 19.17;



2-Метилсульфонил-4-этил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она пентагидрат (49)

Выход 48 %, $T_{пл} = 106^\circ C$, 1H ЯМР (D_2O) спектр, δ ,

м.д.: 4.36 (1H, дд, $J = 6.8, 3.3$, CHN), 3.69-3.79 (2H, м, NCH_2), 3.43 (1H, дд, $J = 13.0, 3.3$, H_a в SCH_2), 3.28 (3H, с, SO_2CH_3), 3.24 (1H, дд, $J = 13.0, 6.8$, H_b в SCH_2), 1.16 (3H, т, $J = 7.1$, CH_3); ^{13}C NMR (D_2O): 174.72 (COOH), 164.17 (C_2), 160.06 (C_{3a}), 158.21 (C_7), 152.45 (C_6), 55.83 (CHN), 50.01 (NCH_2), 42.46 (SO_2CH_3), 30.04 (SCH_2), 11.71 (CH_3);

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1613 (C=O); 1287, 1130 ($-SO_2-$);

Найдено, %: С - 26.65, Н - 5.38, N - 18.45; $C_{10}H_{14}N_6O_5S_2 \cdot 5H_2O$; Вычислено, %: С - 26.55, Н - 5.35, N - 18.57;

Синтез гидрохлорида 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-(2-гидроксиэтокси)-метил-7-метил-сульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты дигидрат (50)

Раствор 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-(2-ацетоксиэтокси)-метил-7-метил-сульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты (**47b**) в 1N соляной кислоте оставляют при перемешивании при комнатной температуре на 3 дня. Реакционную массу упаривают, продукт выделяют при помощи колоночной хроматографии, элюент – бутанол : уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 1.

Методика удаления этоксиэтильной защитной группы

Раствор 1 ммоль 2-метилтио-4-этоксиэтил-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (**39b**) в 1M растворе соляной кислоты и оставляют на 3 дня при комнатной температуре. Выпавший 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (**51**) отфильтровывают и промывают этилацетатом.

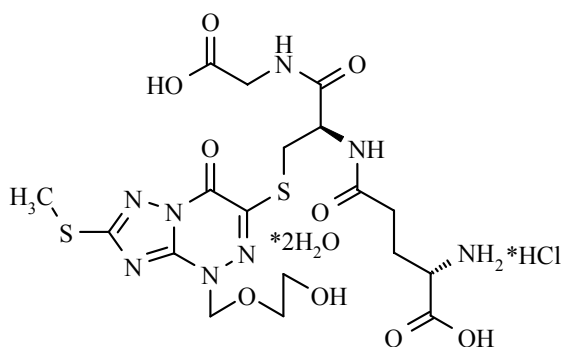
Таблица 25

Кристаллографические данные соединения (**51**)

Параметр	Значение
Молекулярная формула	$C_8H_{10}N_6O_3S_2 \cdot HCl \cdot H_2O$
Молекулярная масса	356,81
Сингония	Моноклинная
Пространственная группа	P2 (1)
$a/\text{Å}$	5.1966 (4)
$b/\text{Å}$	13.6083 (11)
$c/\text{Å}$	10.3487 (8)
$\alpha/\text{град}$	90.00
$\beta/\text{град}$	97.633 (6)
$\gamma/\text{град}$	90.00
Z	2
$\lambda/\text{Å}$	0.71073
$V/\text{Å}^3$	725.34 (10)
Интервал измерения индексов	$-7 \leq h \leq 6, -20 \leq k \leq 20, -15 \leq l \leq 13$
$d_{\text{calc}}/\text{Г} \cdot \text{см}^{-3}$	1.634
$\mu/\text{мм}^{-1}$	0.576
Число измеренных отражений	5788
Число независимых отражений	4419
R	0.0353
wR_2	0.0571
Число уточняемых параметров	223
GOOF	1.001
Остаточная электронная плотность/ $e \text{ E}^{-3}$ (min/max)	-0.219/0.184

Общая методика удаления пивалоилоксиметильной защитной группы.

Исходное соединение (**46a** или **46b**) растворяют в смеси раствора аммиака и метанола в соотношении 1 : 3 и оставляют при перемешивании при комнатной температуре на 3 часа. Реакционную массу упаривают, продукт (**52a** или **52b**) перекристаллизовывают из 65% спирта.

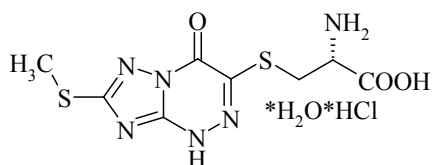


Гидрохлорид 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(1-(2-гидроксиэтокси)-метил-7-метил-сульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты дигидрат (50)

Выход 41 %, $T_{пл} = 228^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O)

спектр, δ , м.д.: 5.79 (2H, с, NCH_2), 4.89 (1H, дд, $J = 9.2, 4.7$, CH), 3.79 (8H, м, H_a в SCH_2 , CH_2 , CHNH_2 , 2CH_2), 3.36 (1H, дд, $J = 14.4, 9.4$, H_b в CH_2), 2.68 (3H, с, SCH_3), 2.53 (2H, м, CH_2), 2.14 (2H, м, CH_2); ^{13}C NMR (D_2O): 175.59 (COOH), 175.03 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 173.89 (COOH), 171.50 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 168.59 (C_2), 151.77 (C_{3a}), 147.49 (C_7), 143.79 (C_6), 83.11 (NCH_2), 71.44 (OCH_2), 60.23 (OCH_2), 54.10 ($\text{CH}(\text{NH}_2)$), 51.55 ($\text{CH}(\text{SCH}_2)$), 43.06 (CH_2COOH), 31.41 (CH_2), 31.19 (SCH_2), 26.19 ($\text{CH}_2(\text{CHNH})$), 13.32 (SCH_3);

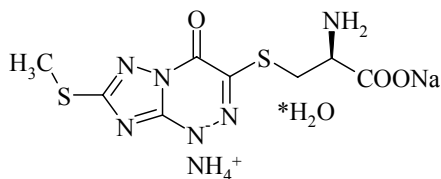
Найдено, %: C - 33.89, H - 4.84, N - 17.91; $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Вычислено, %: C - 34.04, H - 4.92, N - 17.64;



Гидрохлорид 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (51)

Выход 53 %, $T_{пл} = 218^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (DMSO-d_6) спектр, δ , м.д.: 8.66 (1H, уш.с, NH), 4.21 (1H, дд, $J = 7.2, 4.9$, CHN), 3.74 (1H, дд, $J = 14.4, 4.9$, H_a в SCH_2), 3.52 (1H, дд, $J = 14.4, 7.2$, H_b в SCH_2), 2.64 (3H, с, SCH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): 169.59 (COOH), 166.89 (C_2), 152.57 (C_{3a}), 147.48 (C_7), 141.59 (C_6), 51.30 (CH), 29.39 (SCH_2), 13.94 (SCH_3);

Данные РСА см. в Приложении 2



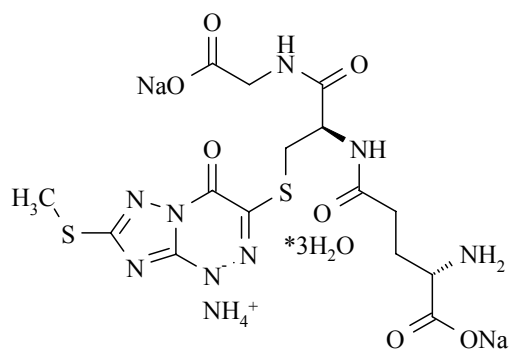
Мононатриевая, моноаммонийная соли 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она гидрат (52a)

Выход 53 %, $T_{пл} = 190^{\circ}\text{C}$, ^1H ЯМР (D_2O) спектр, δ , м.д.: 4.09 (1H, дд, $J = 7.8, 3.7$, CHN), 3.73 (1H, дд, $J = 15.1, 3.7$, H_a в SCH_2), 3.50 (1H, дд, $J = 15.1, 7.8$, H_b в SCH_2), 2.66 (3H, с, SCH_3); ^{13}C

NMR (DMSO- d_6): 169.59 (COONa), 166.89 (C_2), 152.57 (C_{3a}), 147.48 (C_7), 141.59 (C_6), 51.30 (CH), 29.39 (SCH₂), 13.94 (SCH₃);

$[\alpha]_D = -50.80$ ($c = 1.93$, H₂O);

Найдено, %: C - 26.76, H - 4.28, N - 27.01; C₈H₁₂N₇NaO₃S₂*H₂O; Вычислено, %: C - 26.74, H - 3.93, N - 27.28;



Динатриевая, моноаммонийная соли 2-амино-4-[1-(карбоксиметил-карбамоил)-2-(7-метилсульфанил-4-оксо-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-ил-сульфанил)-этилкарбамоил]-масляной кислоты (52b)

Выход 65 %, $T_{пл} = 256^\circ\text{C}$, ^1H ЯМР (D₂O)

спектр, δ , м.д.: 4.67 (1H, дд, $J = 8.6, 4.5$, CH), 3.70 (4H, м, H_a в SCH₂, CH₂, CHNH₂), 3.39 (1H, дд, $J = 14.4, 8.6$, H_b в SCH₂), 2.67 (3H, с, SCH₃), 2.48 (2H, м, CH₂), 2.13 (2H, м, CH₂); ^{13}C NMR (D₂O): 176.22 (COONa), 174.80 (COONa), 174.08 (C=O(NH)), 171.62 (C=O(CH₃)), 167.71 (C_2), 158.60 (C_{3a}), 149.39 (C_7), 138.25 (C_6), 54.11 (CH(NH₂)(COONa)), 53.31 (CH(NH)(C=O)), 43.33 (CH₂(COONa)), 32.99 (CH₂(CH)), 31.30 (CH₂(C=O)), 26.11 (SCH₂), 13.08 (SCH₃);

$[\alpha]_D = -1.71$ ($c = 2.00$, H₂O);

Найдено, %: C - 29.99, H - 4.48, N - 20.68; C₁₅H₂₁N₉Na₂O₇S₂*3H₂O; Вычислено, %: C - 29.85, H - 4.51, N - 20.89;

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

^1H ЯМР	ядерный магнитный резонанс на ядрах ^1H
^{13}C ЯМР	ядерный магнитный резонанс на ядрах ^{13}C
^{19}F ЯМР	ядерный магнитный резонанс на ядрах ^{19}F
РСА	рентгеноструктурный анализ
ИК	инфракрасный
ДМСО- d_6	гексадейтерированный диметилсульфоксид
CDCl_3	дейтерированный хлороформ
D_2O	дейтерированная вода
ТМС	тетраметилсилан
ИПС	<i>изо</i> -пропиловый спирт
ДМФА	диметилформамид
ТСХ	тонкослойная хроматография
Ph	фенил
Bn	бензил
Me	метил
Et	этил
Pr	пропил
<i>i</i> -Pr	<i>изо</i> -пропил
<i>t</i> -Bu	<i>трет</i> -бутил
Pu	пиридин
TEA	триэтиламин
TFA	трифторуксусная кислота
Cys	цистеин (остаток цистеина)
GSH	глутатион
SG	остаток глутатиона
ЦНС	центральная нервная система
РС вирус	респираторно-синтициальный вирус
ВЛЗН	вирус лихорадки Западного Нила
ВЛДР	вирус лихорадки долины Рифт
ВЭЛ	венесуэльский энцефаломиелит лошадей
ВБА	вирус болезни Ауески
ТОРС	тяжелый острый респираторный синдром
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота

PDE	фосфодиэстераза
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
МТД	минимальная токсическая доза
МПК	максимально переносимая концентрация
МЭД	минимальная эффективная доза
ХТИ	химиотерапевтический индекс
КИ	константа ингибирования
TZV	препарат «Триазавирин»
ПДИ	протеин дисульфид изомераза
НА	гемагглютинин
MALDI	матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
TOF MS	времяпролетная масс-спектрометрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rusinov V. L., Ulomskii E. N., Chupakhin O. N., Charushin V. N. Azolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazines as a new class of antiviral compounds // *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 2008. Vol. 57. P. 985-1014.
2. Чупахин О. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Чарушин В. Н., Петров А. Ю., Киселев О. И. Натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-7-оксо-[5,1-*c*]-1,2,4-триазин-7-(4H)-она, дигидрат, обладающая противовирусной активностью // Пат. RU 2294936, опубл. 10.03.2007.
3. Okamoto Y. Ring Transformation of 1,5-Benzoxazepines into Spirobenzoxazoles. Synthesis of Pyrazolo[1',5':3,4][1,2,4]triazino[5,6-*b*][1,5]benzoxazepines and Spiro[benzoxazole-2'(3H),4(1H)pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines] // *J. Het. Chem.* 1988. Vol. 25. No. 4. P.1259-1262.
4. Deeb A., El-Mariah F., Hosny M. Pyridazine derivatives and related compounds. Part 13: Synthesis and antimicrobial activity of some pyridazino[3',4':3,4]pyrazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazines // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2004. Vol. 14. P. 5013–5017.
5. El-Mariah F., Hosny M., Deeb A. Pyridazine derivatives and related compounds, part 17: the synthesis of some 3-substituted pyridazino[3',4':3,4]pyrazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazines and their antimicrobial activity // *Phosphorus Sulfur and Silicon.* 2006. Vol. 18. P. 809–818.
6. El-Mariah F., Hosny M., Deeb A. Pyridazine derivative and related compound, part 18: pyridazino[3',4':3,4]pyrazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazine-3-carboxylic acid: synthesis, reactions, and antimicrobial activity // *Phosphorus Sulfur and Silicon.* 2006. Vol. 18. P. 2505–2517.
7. Aly A. A. A synthetic approach and antimicrobial evaluation of annulated pyrimidine and triazine derivatives // *Curr. Org. Chem.* 2009. Vol. 13. P. 1758-1764.
8. Bondock S., Rabie R., Etman H. A., Fadda A. A. Synthesis and antimicrobial activity of some new heterocycles incorporating antipyrine moiety // *Eur. J. Med. Chem.* 2008. Vol. 43. P. 2122-2129.
9. Gouda M. A., Berghot M. A., Abd El-Ghani Ghada E., Khalil A. M. Synthesis and antimicrobial activities of some new thiazole and pyrazole derivatives based on 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophene moiety // *Eur. J. Med. Chem.* 2010. Vol. 45. P. 1338–1345.
10. Gouda M. A., Berghot M. A., Shoeib A. I., Khalil A. M. Synthesis and antimicrobial of new anthraquinone derivatives incorporating pyrazole moiety // *Eur. J. Med. Chem.* 2010. Vol. 45. P. 1843–1848.
11. Elneairy M. A. A., Attaby F. A., Elsayed M. S. Synthesis of thiazole, triazole, phenylthiourea, derivatives and their biological evaluation pyrazolo[3,4-*b*]-pyridinyl-3-aminopyrazolo[3,4-*b*]pyridine // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon.* 2000. Vol. 167. P. 161–179.

12. Abdel-Aziz H. A., Hamdy N. A., Farag A. M., Fakhr I. M. I. Synthesis of some novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine, pyrido[2,3-*d*]pyrimidine, pyrazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazine and 1,2,4-triazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazine derivatives incorporating a thiazolo[3,2-*a*]benzimidazole moiety // *J. Het. Chem.* 2008. Vol. 45. P. 1033-1037.
13. Hamdy N. A., Abdel-Aziz H. A., Farag A. M., Fakhr I. M. I. Synthesis of some 1,3-thiazole, 1,3,4-thiadiazole, pyrazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazine, and 1,2,4-triazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazine derivatives based on the thiazolo[3,2-*a*]benzimidazole moiety // *Monatsh. fur Chem.* 2007. Vol. 138. P. 1001–1010.
14. Kurasawa Y., Kanoh M., Kamigaki Y., Okiyama M., Takada A. Facile synthesis and antifungal activity of 3-substituted 4-amino-8-ethoxycarbonylpyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines and pyrazolo[1',5':3,4][1,2,4]triazino[5,6-*b*][1,5]benzodiazepine // *J. Het. Chem.* 1988. Vol. 25. P. 1015-1018.
15. Novinson T., Okabe T., Robins R. K., Matthews T. R. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Heterocycles. Azolo-as-triazines // *J. Med. Chem.* 1976. Vol. 19. No. 4. P.517-520.
16. Rusinov V. L., Myasnikov A. V., Pilicheva T. L., Chupakhin O. N., Kiprianova E. A., Garagulya A. D. Antimicrobial activity of nitro derivatives of azolo[1,5-*a*]pyrimidine and azolo[5,1-*c*][1,2,4]-triazine // *Pharm. Chem. J.* 1990. Vol. 24. No. 1. P. 52-54.
17. Hassan S. M., Abdel Aal M. M., El-Maghraby A. A., Bashandy M. S. Heteroaromatization with sulfonamido phenyl ethanone, part II: synthesis of novel thiazolyl acetonitriles and thiazolyl acrylonitriles and their derivatives containing dimethylsulfonamide moiety // *Phosphorus Sulfur and Silicon.* 2009. Vol. 184. P. 427–452.
18. Andreotti D., Arista L., Biondi S., Cardullo F., Damiani F., Lociuoro S., Marchioro C., Merlo G., Mingardi A., Niccolai D., Paio A., Piga E., Pozzan A., Seri C., Tarsi L., Terreni S., Tibasco J. Macrolide antibiotics // *Pat. WO 0250091*, опубли. 27.06.2002
19. Guerrini G., Ciciani G., Cambi G., Bruni F., Selleri S., Melani F., Montali M., Martini C., Ghelardini C., Norcini M., Costanzo A. Novel 3-arylpyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxides 8-substituted, ligands at GABA_A/benzodiazepine receptor complex: Synthesis, pharmacological and molecular modeling studies // *Bioorg. & Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 4471–4489.
20. Guerrini G., Costanzo A., Ciciani G., Bruni F., Selleri S., Costagli C., Besnard F., Costa B., Martini C., De Siena G., Malmberg-Aiello P. Benzodiazepine receptor ligands. 8: Synthesis and pharmacological evaluation of new pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxide 3- and 8-disubstituted: High affinity ligands endowed with inverse-agonist pharmacological efficacy // *Bioorg. & Med. Chem.* 2006. Vol. 14. P. 758–775.

21. Guerrini G., Ciciani G., Bruni F., Selleri S., Martini C., Daniele S., Ghelardini C., Di Cesare Mannelli L., Costanzo A. Development of ligands at γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor subtype as new agents for pain relief // *Bioorg. & Med. Chem.* 2011. Vol. 19. P. 7441–7452.

22. Guerrini G., Costanzo A., Bruni F., Selleri S., Casilli L., Giusti L., Martini C., Lucacchini A., Malmberg Aiello P., Ipponi A. Benzodiazepine receptor ligands. Synthesis and pharmacological evaluation of 3-, 7- and 8-substituted [5,1-*c*][1,2,4]benzotriazines and 5-oxide derivatives. Part I // *Eur. J. Med. Chem.* 1996. Vol. 31. P. 259-272.

23. Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Bruni F., Selleri S., Costa B., Martini C., Lucacchini A., Malmberg Aiello P., Ipponi A. Benzodiazepine receptor ligands. 4. Synthesis and pharmacological evaluation of 3-heteroaryl-8-chloropyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxides // *J. Med. Chem.* 1999. Vol. 42. P. 2218-2226.

24. Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Bruni F., Costagli C., Selleri S., Besnard F., Costa B., Martini C., Malmberg-Aiello P. Benzodiazepine receptor ligands. 7. Synthesis and pharmacological evaluation of new 3-esters of the 8-chloropyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxide. 3-(2-thienylmethoxycarbonyl) derivative: an anxiolytic agent in rodents // *J. Med. Chem.* 2002. Vol. 45. P. 5710-5720.

25. Guerrini G., Ciciani G., Cambi G., Bruni F., Selleri S., Guarino C., Melani F., Montali M., Martini C., Ghelardini C., Norcini M., Costanzo A. Synthesis, in vivo evaluation, and molecular modeling studies of new pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxide derivatives. identification of a bifunctional hydrogen bond area related to the inverse agonism // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52. P. 4668–4682.

26. Costanzo A., Guerrini G., Bruni F., Ciciani G., Selleri S., Cappelletti S., Costa B., Martini C., o Lucacchin A. Benzodiazepine receptor ligands - Part II. Synthesis and biological evaluation of pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 4-oxide // *Eur. J. Med. Chem.* 1998. Vol. 33. P. 237-244.

27. Ege G., Pros M. Arylmethyl-substituted pyrazolo-azines, especially 3-arylmethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines and process for the preparation of 8-arylmethylpyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines // *Pat. DE 4333705*, опубли. 06.04.1995.

28. Amer A. M., El-Faragy A. F., Yousif N. M., Fayed A. A. Synthesis and pharmacological activities of some dibenzopyrazolocinnolines and dibenzopyridazinoquinoxalines // *Chem. Het. Comp.* 2011. Vol. 47 No. 1. P. 101-107.

29. Betschart C., Cotesta S., Hintermann S., Wagner J., Roy B. L., Gerspacher M., Von Matt A. 4-Aryl-butane-1,3-diamides // *Pat. WO 2011073316*, опубли. 23.06.2011

30. Ciciani G., Coronello M., Guerrini G., Selleri S., Cantore M., Failli P., Mini E., Costanzo A. Synthesis of new pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazines, pyrazolo[5,1-*c*]pyrido[4,3-*e*][1,2,4] triazines and their open analogues as cytotoxic agents in normoxic and hypoxic conditions // *Bioorg. & Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 9409–9419.
31. Metwally M.A., Gouda M.A., Harmal Ammar N., Khalil A.M. Synthesis, antitumor, cytotoxic and antioxidant evaluation of some new pyrazolotriazines attached to antipyrine moiety // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. Vol. 56. P. 254-262.
32. Iwashita E., Williams H. E. L., Hutchinson I., Stevens M. F. G. Structural studies on bioactive compounds. 1 Heck reactions on 4-methylenepyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines // *J. Chem. Res.* 2008. Vol. 2. P. 115–120.
33. El Bialy S. A. A., Gouda M. A. Cyanoacetamide in heterocyclic chemistry: synthesis, antitumor and antioxidant activities of some new benzothiophenes // *J. Het. Chem.* 2011. Vol. 48. P. 1280-1286.
34. Partridge M. W., Stevens M. F. G. Pyrazolo-as-triazines. Part I // *J. Chem. Soc.* 1966. P. 1127-1131.
35. Baldwin R. W., Partridge M. W., Stevens M. F. G. Pyrazolotriazines : a new class of tumour-inhibitory agents // *J. Pharm. Pharmac.* 1966. Vol. 18. Suppl. P. 1S-4S.
36. Bloxham J., Borzillo G. V., Collington E. W., Sadiq S., Sambrook S., Colin P., Waller C. L., Wynne G. M. Integrin antagonists useful as anticancer agents // *Pat. WO 2006053342*, опубл. 18.05.2006.
37. Berger D. M, Dutia M. D, Hopper D. W, Torres N. Pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines, methods for preparation and use thereof // *Pat. WO 2009039387*, опубл. 26.03.2009.
38. Lardy C., Nioche J.-Y., Caputo L., Decerprit J., Ortholand J.-Y., Festal D., Guerrier D. Nitroso diphenylamine derivatives // *Pat. WO 0228820*, опубл. 11.04.2002.
39. Hamama W. S., Berghot M. A., Baz E. A., Gouda M. A. Synthesis and Antioxidant Evaluation of Some New 3-Substituted Coumarins // *Arch. Pharm. Chem.* 2011. Vol. 344. P. 710–718
40. Attaby F. A., Elghandour A. H., Ali M. A., Ibrahim Y. M. Synthesis, characterization, and antiviral activities of pyridopyrazolotriazines // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon.* 2007, Vol. 182. P. 133–149.
41. Attaby F. A., Elghandour A. H., Ali M. A., Ibrahim Y. M. Synthesis, reactions, and antiviral activity of 1-(1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-yl)ethanone and pyrido[2',3':3,4]pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazine derivatives // *Phosphorus, Sulfur and Silicon.* 2006. Vol. 181. P. 1087–1102.

42. Bravi G., Cheasty A. G., Corfield J. A., Grimes R. M., Harrison D., Hartley C. D., Howes P. D., Medhurst K. J., Meeson M. L., Mordaunt J. E., Shah P., Slater M. J., White G. V. 4-Carboxy pyrazole derivatives as anti-viral agents // Pat. WO 2007039146, опубли. 12.04.2007.
43. Ducrot P., Andrianjara C. R., Wrigglesworth R. CoMFA and CoMSIA 3D-quantitative structure-activity relationship model on benzodiazepine derivatives, inhibitors of phosphodiesterase IV // J. Comp.-Aided Mol. Des. 2001. Vol. 15. P. 767–785.
44. Pascal Y., Moodley I., Calvet A., Junien J.-L., Dahl S. G. Diazepino-indoles as phosphodiesterase IV inhibitors // Pat. WO 9611690, опубли. 25.04.1996.
45. Pascal Y., Jacobelli H., Calvet A., Payne A., Dahl S. G. Diazepino-indoles as phosphodiesterase IV inhibitors // Pat. WO 9736905, опубли. 09.10.1997.
46. Burnouf C., Auclair E., Avenel N., Bertin B., Bigot C., Calvet A., Chan K., Durand C., Fasquelle V., Feru F., Gilbertsen R., Jacobelli H., Keksi A., Lallier E., Maignel J., Martin B., Milano S., Ouagued M., Pascal Y., Pruniaux M.-P., Puaud J., Rocher M.-N., Terrasse C., Wrigglesworth R., Doherty A. M. Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacological profile of 9-amino-4-oxo-1-phenyl-3,4,6,7-tetrahydro[1,4]diazepino[6,7,1-*hi*]indoles: discovery of potent, selective phosphodiesterase type 4 inhibitors // J. Med. Chem. 2000. Vol. 43. P. 4850-4867.
47. Doherty A. Use of diazepinoindoles for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease // Pat. EP 1161949, опубли. 12.12.2001.
48. Sanganee H., Springthorpe B. Piperidine derivatives and their use as modulators of chemokine (especially CCR3) activity // Pat. WO 03024962, опубли. 27.03.2003.
49. Alcaraz L., Furber M., Purdie M., Springthorpe B. Chemical compounds // Pat. WO 03068743, опубли. 21.08.2003
50. Shiota T., Sudoh M., Yokoyama T., Muroga Y., Kamimura T., Nakanishi A. Cyclic amine CCR3 antagonists // Pat. EP 1201239, опубли. 02.05.2002
51. Leban J., Seifert M. H.-J., Lemstra S. Benzimidazole NF- κ B inhibitors // Pat. WO 2009037357, опубли. 26.03.2009.
52. Leban J., Baierl M., Mies J., Trentinaglia V., Rath S., Kronthaler K., Wolf K., Gotschlich A., Seifert M. H. J. A novel class of potent NF- κ B signaling inhibitors // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2007. Vol. 17. P. 5858–5862.
53. Leban J., Schmitt H., Wolf K. Novel piperidin-4-yl-thiazole-carboxamide analogues as inhibitors of T-cell proliferation and uses thereof // Pat. EP 1637529, опубли. 22.03.2006.
54. Leban J., Schmitt H., Wolf K., Pegoraro S., Wuzik A. Novel Heterocyclic NF- κ B Inhibitors // Pat. US 20100267717, опубли. 21.10.2010

55. Leban J., Schmitt H., Wolf K., Pegoraro S., Wuzik A. Novel heterocyclic NF- κ B inhibitors // Pat. US 20060247253, опубли. 02.11.2006.
56. Alper P., Azimioara M., Cow C., Epple R., Lelais G., Mutnick D., Nikulin V. Compounds and compositions as modulators of GPR119 activity // Pat. WO 2011014520, опубли. 03.02.2011.
57. Al-masri I. M., Mohammad M. K., Taha M. O. Discovery of DPP IV inhibitors by pharmacophore modeling and QSAR analysis followed by in silico screening // Chem. Med. Chem. 2008. Vol. 3. P. 1763–1779.
58. Almansa C., de Arriba A. F., Cavalcanti F. L., Gomez L. A., Miralles A., Merlos M., Garcia-Rafanell J., Forn J. Synthesis and SAR of a new series of COX-2-selective inhibitors: pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines // J. Med. Chem. 2001. Vol. 44. P. 350-361.
59. Shiota T., Yokoyama T., Kamimura T. Cycloamine CCR5 receptor antagonists // Pat. EP 1238970, опубли. 11.09.2002.
60. Astles P. C., Eastwood P. R., Houille O., Levell J., Pauls H., Czekaj M., Liang G., Gong Y., Pribish J., Neuenschwander K. Arylmethylamine derivatives for use as tryptase inhibitors // Pat. WO 0190101, опубли. 29.11.2001.
61. Gilligan P. J., Wilde R. G. Pyrazolotriazines as CRF antagonists // Pat. WO 0059907, опубли. 12.10.2000.
62. Bondinell W. E., Desjarlais R. L., Veber D. F., Yamashita D. S. Protease inhibitors // Pat. WO 9959526, опубли. 25.11.1999.
63. Bondinell W. E., Hall R. F., Jin Q., Kerns J. K., Nie H., Widdowson K. L. Protease inhibitors // Pat. WO 2004017911, опубли. 04.03.2004.
64. Knox P., O'Sullivan M., Lentfer H. Piperidinyl-thiazole carboxylic acid derivatives as angiogenesis inhibitors // Pat. WO 2004058750, опубли. 15.07.2004.
65. Knox P., Pappa H., Lam W. Piperidinyl-thiazole carboxamide derivatives for altering vascular tone // Pat. WO 2004058751, опубли. 15.07.2004.
66. Andrews M. D., Bagal S. K., Gibson K. R., Omoto K., Ryckmans T., Skerratt S. E., Stuppel P. A. Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives as inhibitors of tropomyosin-related kinases // Pat. WO 2012137089, опубли. 11.10.2012.
67. Malamas M. S., Stange H., Schindler R., Lankau H.-J., Grunwald C., Langen B., Egerland U., Hage T., Ni Y., Erdei J., Fan K. Y., Parris K., Marquis K. L., Grauer S., Brennan J., Navarra R., Graf R., Harrison B. L., Robichaud A., Kronbach T., Pangalos M. N., Brandon N. J., Hoefgen N. Novel triazines as potent and selective phosphodiesterase 10A inhibitors // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2012. Vol. 22. P. 5876–5884.

68. Stange H., Langen B., Egerland U., Hoefgen N., Priebes M., Malamas M. S., Erdei J. J., Ni Y. Triazine derivatives as inhibitors of phosphodiesterases // Pat. WO 2010054253, опублик. 14.05.2010.
69. Stange H., Langen B., Egerland U., Hoefgen N., Priebes M., Malamas M. S., Erdei J. J., Ni Y. Imidazo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine derivatives as inhibitors of phosphodiesterases // Pat. WO 2010054260, опублик. 14.05.2010.
70. Sheridan J. M., Heal J. R., Hamilton W. D. O., Pike I. Casein kinase 1 δ (ck1 δ) inhibitors // Pat. WO 2012080729, опублик. 21.06.2012.
71. Fedorova G. V., Ivanov E. I., Konup L. A., Mazepa A. V., Lobach A. V. Synthesis and antimicrobial activity of crown-containing purines // Pharm. Chem. J. 1995. Vol. 29. No. 4. P. 274-276.
72. Русинов В. Л., Сидорова Л. П., Пиличева Т. Л., Чупахин О. Н. Соли 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина и 4,7-дигидро-6-нитро-7-оксо-[1,2,4]-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]-триазинов, обладающие бактерицидной активностью в отношении возбудителя микоплазмоза // Пат. RU 2058307, опублик. 20.04.1996.
73. Abdelall M. M. A convenient route to 1,3,4-thiadiazoles, thiazolidinone, thiazoles, pyridones, coumarins, triazolo[5,1-*c*]triazines, and pyrazolo[5,1-*c*]triazines incorporating pyrazolone moiety and their use as antimicrobial agents // Phosphorus, Sulfur, and Silicon. 2009. Vol. 184. P. 2208–2226.
74. Rusinov V. L., Uiomskii E. N., Chupakhin O. N., Zubairov M. M., Kapustin A. B., Mitin N. I., Zhiravetskii M. I., Vinograd I. A. Synthesis and antiviral activity of 6-nitro-7-оксо-4,7-дигидроазоло-[5,1-*c*][1,2,4]-триазинов // Pharm. Chem. J. 1990. Vol. 24. No. 9. P. 646-650.
75. Чупахин О. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Березина Л. К. Аммониевая соль 2-(4-пиридил)-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4] триазина, обладающая противовирусной активностью // Пат. SU 1473303, опублик. 15.06.1994.
76. Rusinov V. L., Chupakhin O. N., Deev S. L., Shestakova T. S., Ulomskii E. N., Rusinova L. I., Kiselev O. I., Deeva E. G. Synthesis and antiviral activity of nucleoside analogs based on 1,2,4-triazolo[3,2-*c*][1,2,4]triazin-7-ones // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. 2010. Vol. 59. No. 1. P. 136-143.
77. Deev S. L., Yasko M. V., Karpenko I. L., Korovina A. N., Khandazhinskaya A. L., Andronova V. L., Galegov G. A., Shestakova T. S., Ulomskii E. N., Rusinov V. L., Chupakhin O. N., Kukhanova M. K. 1,2,4-Triazoloazine derivatives as a new type of herpes simplex virus inhibitors // Bioorg. Chem. 2010. Vol. 38. P. 265-270.
78. Cooke A., Bonnert R., Cage P., Donald D., Furber M., Withnall J. Novel compounds // Pat. WO 9902528, опублик. 21.01.1999.

79. Органические реакции. Пер. с англ. под ред. И. Ф. Луценко // Издательство иностранной литературы. Москва, 1963. С. 555.
80. Gray E. J., Stevens M. F. G., Tennant G., Vevers R. J. S. Cyclisation Reactions of Azofylhydrazones Derived from Ethyl Cyanoacetate and Malononitrile. Formation of Azolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines // Chem. Soc. Perkin 1. 1976. No. 14. P. 1496-1504.
81. Уломский Е. Н.. Азаиндолизины. Синтез, химические свойства, биологическая активность // Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук. Екатеринбург. 2003.
82. Rusinov V. L., Ulomskii E. N., Chupakhin O. N., Petrov A. Yu., Sharonov E. A. Nitroazines. 9. Characteristic features of nucleophilic substitution of the nitro group in dihydroazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines // Chem. Het. Comp. 1989. Vol. 25. P. 209-213.
83. Rusinov V. L., Ulomskii E. N., Chupakhin O. N., Rusinov G. L., Chernyshev A. I., Aleksandrov G. G. Nitroazines. 7. Alkylation of 6-nitro-7-oxo-4,7-dihydroazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines and identification of the products // Chem. Het. Comp. 1987. Vol. 23. P. 1236-1243.
84. Denicola A., Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity // Toxicology. 2005. Vol. 208. P. 273-288.
85. Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. Vol. 6. P. 662-680.
86. Niles J. C., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation // Nitric Oxide. 2006. Vol. 14. P.109-121.
87. Jinglin L., Qun D., Zhonglin W., Hengbin Zh., Xu B. Parallel Solution-Phase Synthesis of a 2,6,8,9-Tetrasubstituted Purine Library via a Sulfur Intermediate// J. Comb. Chem. 2005. Vol. 7. P. 627-636.
88. Ojha L. M., Gulati D., Seth N., Bhakuni D. S., Pratap R., Agarwal K. C. A Simple Method for Synthesis of Spongosine, Azaspongosine, and Their Antiplatelet Effects // Nucleosides & Nucleotides. 1995. Vol. 14. P. 1889-1900.
89. Volonenko Yu. M., Blyumin E. V. Nucleophilic substitution in a series of 2-methylsulfonyl-5-chloropyrimidine-4-carboxylic acid derivatives // Chem. Het. Comp. 1998. Vol. 34. P. 324-328.
90. Green T. W., Wuts P. G. M. Protective groups in organic synthesis // John Wiley & Sons, Inc. 1999. P. 747.
91. Dhanak D., Reese C. B. Studies in the protection of pyrrole and indole derivatives. J. Chem. Soc., Perkin Trans I. 1986. P.2181-2186.

92. Rasmussen M., Leonard N. J. Synthesis of 3-(2'-deoxy-D-erythro-pentofuranosyl)adenine. Application of a new protecting group, pivaloyloxymethyl(Pom) // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. No. 21. P. 5439.

93. Sawa T., Zaki M. H., Okamoto T., Akuta T., Tokutomi Y., Kim-Mitsuyama S., Ihara H., Kobayashi A., Yamamoto M., Fujii S., Arimoto H., Akaike T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate // *Nat. Chem. Biol.* 2007/ Vol. 3, P. 727-735.

94. Akaike T., Fujii S., Sawa T., Ihara H. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide // *Nitric Oxide.* 2010. Vol. 23, P. 166-174.

95. Kersteen E. A., Raines R. T. Catalysis of Protein Folding by Protein Disulfide Isomerase and Small-Molecule Mimics // *Antioxid. Redox Signal.* 2003. Vol. 5. P. 413-424.

96. Tavender T. J., Bulleid N. J. Molecular Mechanisms Regulating Oxidative Activity of the Ero1 Family in the Endoplasmic Reticulum // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 13. P. 1177-1187.

97. Nishiyama A., Masutani H., Nakamura H., Nishinaka Y., Yodoi J. Redox Regulation by Thioredoxin and Thioredoxin-Binding Proteins // *IUBMB Life.* 2001. Vol. 52. P. 29-33.

98. Sgarbanti R., Nencioni L., Amatore D., Coluccio P., Fraternali A., Sale P., Mammola C. L., Carpino G., Gaudio E., Magnani M., Ciriolo M. R., Garaci E., Palamara A. T. Redox Regulation of the Influenza Hemagglutinin Maturation Process: A New Cell-Mediated Strategy for Anti-Influenza Therapy // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15. P. 593-606.

99. Ulomskii E. N., Tsoi E. V., Rusinov V. L., Chupakhin O. N., Kalb G. L., Sosonkin I. M. Reduction of nitro derivatives of azolo[5,1-*c*][1,2,4]triazines // *Chem. Het. Comp.* 1992. Vol. 28. P. 570-573.

100. Chakravarthi S., Jessop C. E., Bulleid N. J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress // *EMBO Rep.* 2006. Vol. 7. P. 271-275.

101. Chakravarthi S., Bulleid N. J. Glutathione Is Required to Regulate the Formation of Native Disulfide Bonds within Proteins Entering the Secretory Pathway // *J. Biol.Chem.* 2004. Vol. 279. P. 39872-39879.

102. Lappi A.-K., Ruddock L. W. Reexamination of the Role of Interplay between Glutathione and Protein Disulfide Isomerase // *J. Mol. Biol.* 2011. Vol. 409. P. 238-249.

103. Sheldrick G.M. SHELXS-97, A Program for automatic the solution of crystal structures // University of Göttingen. Germany. 1997.

104. Sheldrick G.M. SHELXL-97, A Program for crystal structures refinement // University of Göttingen. Germany. 1997.

105. Reed L. J., Muench L. H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Am. J. Hyg.* 1938. Vol. 27. P. 493–497.
106. Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests // *Toxicol. In Vitro.* 1988. Vol. 2, P. 1-6.
107. Watanabe W., Konno K., Ijichi K., Yokota T., Shigeta S. MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents // *J. Virol. Methods.* 1994. Vol. 48. P. 257-265.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 - Длины связей и валентные углы для соединения (35d)

Таблица 26

Связь	d, Å	Связь	d, Å
C(81)-H(84)	0,9600	C(34)-H(35)	0,9690
C(81)-H(83)	0,9600	C(34)-C(41)	1,5049
C(81)-H(82)	0,9602	N(33)-C(47)	1,4723
C(77)-H(80)	0,9601	N(33)-C(34)	1,4632
C(77)-H(79)	0,9605	C(29)-H(32)	0,9603
C(77)-H(78)	0,9612	C(29)-H(31)	0,9604
C(73)-H(76)	0,9596	C(29)-H(30)	0,9606
C(73)-H(75)	0,9599	C(24)-H(27)	0,9596
C(73)-H(74)	0,9597	C(24)-H(26)	0,9599
C(69)-H(72)	0,9596	C(24)-H(25)	0,9603
C(69)-H(71)	0,9604	C(22)-N(37)	1,3900
C(69)-H(70)	0,9602	C(22)-N(28)	1,2982
C(65)-H(68)	0,9603	N(21)-C(60)	1,5089
C(65)-H(67)	0,9597	N(21)-N(28)	1,3601
C(65)-H(66)	0,9598	C(20)-N(33)	1,3975
C(61)-H(64)	0,9593	C(20)-N(23)	1,2969
C(61)-H(63)	0,9597	N(19)-C(59)	1,5109
C(61)-H(62)	0,9589	N(19)-N(23)	1,3578
C(60)-C(81)	1,5256	C(17)-C(22)	1,4755
C(60)-C(73)	1,5258	C(16)-C(20)	1,4712
C(60)-C(65)	1,5114	C(14)-N(18)	1,3647
C(59)-C(61)	1,5243	N(13)-C(14)	1,3214
C(59)-C(77)	1,5185	O(12)-C(56)	1,4146
C(59)-C(69)	1,5166	O(12)-C(44)	1,4114
C(56)-H(58)	0,9699	C(11)-N(15)	1,3690
C(56)-H(57)	0,9693	O(10)-C(53)	1,4169
C(53)-H(55)	0,9707	O(10)-C(41)	1,4144
C(53)-H(54)	0,9700	N(9)-C(11)	1,3225
C(50)-H(52)	0,9699	C(8)-N(21)	1,3492
C(50)-H(51)	0,9697	C(8)-N(18)	1,3191
C(50)-C(56)	1,5074	N(7)-N(13)	1,3833
C(47)-H(49)	0,9699	N(7)-C(17)	1,3811
C(47)-H(48)	0,9700	N(7)-C(8)	1,3652
C(47)-C(53)	1,5043	O(6)-C(17)	1,2079
C(44)-H(46)	0,9693	S(5)-C(29)	1,7921
C(44)-H(45)	0,9694	S(5)-C(14)	1,7411
C(41)-H(43)	0,9699	C(4)-N(19)	1,3497
C(41)-H(42)	0,9698	C(4)-N(15)	1,3193
C(38)-H(40)	0,9691	O(3)-C(16)	1,2066
C(38)-H(39)	0,9693	N(2)-C(16)	1,3886

Таблица 26 (продолжение)

C(38)-C(44)	1,5057	N(2)-N(9)	1,3829
N(37)-C(38)	1,4739	N(2)-C(4)	1,3667
N(37)-C(50)	1,4619	S(1)-C(24)	1,7894
C(34)-H(36)	0,9701	S(1)-C(11)	1,7381
Угол	w, град	Угол	w, град
H(84)-C(81)-H(83)	109,45	H(43)-C(41)-O(10)	109,24
H(84)-C(81)-H(82)	109,49	H(42)-C(41)-C(34)	109,18
H(84)-C(81)-C(60)	109,45	H(42)-C(41)-O(10)	109,20
H(83)-C(81)-H(82)	109,51	C(34)-C(41)-O(10)	112,14
H(83)-C(81)-C(60)	109,47	H(40)-C(38)-H(39)	108,30
H(82)-C(81)-C(60)	109,46	H(40)-C(38)-C(44)	109,78
H(80)-C(77)-H(79)	109,43	H(40)-C(38)-N(37)	109,75
H(80)-C(77)-H(78)	109,50	H(39)-C(38)-C(44)	109,68
H(80)-C(77)-C(59)	109,48	H(39)-C(38)-N(37)	109,74
H(79)-C(77)-H(78)	109,54	C(44)-C(38)-N(37)	109,57
H(79)-C(77)-C(59)	109,44	C(38)-N(37)-C(50)	110,60
H(78)-C(77)-C(59)	109,44	C(38)-N(37)-C(22)	117,06
H(76)-C(73)-H(75)	109,50	C(50)-N(37)-C(22)	115,82
H(76)-C(73)-H(74)	109,52	H(36)-C(34)-H(35)	108,19
H(76)-C(73)-C(60)	109,41	H(36)-C(34)-C(41)	109,82
H(75)-C(73)-H(74)	109,53	H(36)-C(34)-N(33)	109,73
H(75)-C(73)-C(60)	109,45	H(35)-C(34)-C(41)	109,87
H(74)-C(73)-C(60)	109,41	H(35)-C(34)-N(33)	109,74
H(72)-C(69)-H(71)	109,51	C(41)-C(34)-N(33)	109,48
H(72)-C(69)-H(70)	109,48	C(47)-N(33)-C(34)	110,48
H(72)-C(69)-C(59)	109,50	C(47)-N(33)-C(20)	116,09
H(71)-C(69)-H(70)	109,41	C(34)-N(33)-C(20)	115,40
H(71)-C(69)-C(59)	109,47	H(32)-C(29)-H(31)	109,46
H(70)-C(69)-C(59)	109,46	H(32)-C(29)-H(30)	109,42
H(68)-C(65)-H(67)	109,39	H(32)-C(29)-S(5)	109,51
H(68)-C(65)-H(66)	109,55	H(31)-C(29)-H(30)	109,48
H(68)-C(65)-C(60)	109,49	H(31)-C(29)-S(5)	109,46
H(67)-C(65)-H(66)	109,44	H(30)-C(29)-S(5)	109,50
H(67)-C(65)-C(60)	109,47	C(22)-N(28)-N(21)	121,10
H(66)-C(65)-C(60)	109,49	H(27)-C(24)-H(26)	109,40
H(64)-C(61)-H(63)	109,49	H(27)-C(24)-H(25)	109,50
H(64)-C(61)-H(62)	109,56	H(27)-C(24)-S(1)	109,50
H(64)-C(61)-C(59)	109,38	H(26)-C(24)-H(25)	109,55
H(63)-C(61)-H(62)	109,48	H(26)-C(24)-S(1)	109,49
H(63)-C(61)-C(59)	109,46	H(25)-C(24)-S(1)	109,39
H(62)-C(61)-C(59)	109,46	C(20)-N(23)-N(19)	120,80
C(81)-C(60)-C(73)	110,64	N(37)-C(22)-N(28)	118,21
C(81)-C(60)-C(65)	110,93	N(37)-C(22)-C(17)	117,50

Таблица 26 (продолжение)

C(81)-C(60)-N(21)	108,64	N(28)-C(22)-C(17)	124,17
C(73)-C(60)-C(65)	109,47	C(60)-N(21)-N(28)	117,19
C(73)-C(60)-N(21)	108,05	C(60)-N(21)-C(8)	123,05
C(65)-C(60)-N(21)	109,04	N(28)-N(21)-C(8)	119,72
C(61)-C(59)-C(77)	111,06	N(33)-C(20)-N(23)	118,04
C(61)-C(59)-C(69)	109,82	N(33)-C(20)-C(16)	117,14
C(61)-C(59)-N(19)	108,25	N(23)-C(20)-C(16)	124,73
C(77)-C(59)-C(69)	110,63	C(59)-N(19)-N(23)	116,89
C(77)-C(59)-N(19)	108,05	C(59)-N(19)-C(4)	122,67
C(69)-C(59)-N(19)	108,97	N(23)-N(19)-C(4)	120,00
H(58)-C(56)-H(57)	107,82	C(14)-N(18)-C(8)	101,81
H(58)-C(56)-C(50)	109,05	C(22)-C(17)-N(7)	109,61
H(58)-C(56)-O(12)	109,16	C(22)-C(17)-O(6)	127,70
H(57)-C(56)-C(50)	109,17	N(7)-C(17)-O(6)	122,69
H(57)-C(56)-O(12)	109,10	C(20)-C(16)-O(3)	128,18
C(50)-C(56)-O(12)	112,42	C(20)-C(16)-N(2)	109,45
H(55)-C(53)-H(54)	108,04	O(3)-C(16)-N(2)	122,37
H(55)-C(53)-C(47)	109,49	C(11)-N(15)-C(4)	101,61
H(55)-C(53)-O(10)	109,42	N(18)-C(14)-N(13)	117,41
H(54)-C(53)-C(47)	109,49	N(18)-C(14)-S(5)	120,28
H(54)-C(53)-O(10)	109,41	N(13)-C(14)-S(5)	122,31
C(47)-C(53)-O(10)	110,93	C(14)-N(13)-N(7)	100,53
H(52)-C(50)-H(51)	108,18	C(56)-O(12)-C(44)	109,22
H(52)-C(50)-C(56)	109,77	N(15)-C(11)-N(9)	117,45
H(52)-C(50)-N(37)	109,70	N(15)-C(11)-S(1)	119,53
H(51)-C(50)-C(56)	109,81	N(9)-C(11)-S(1)	123,01
H(51)-C(50)-N(37)	109,70	C(53)-O(10)-C(41)	109,36
C(56)-C(50)-N(37)	109,65	C(11)-N(9)-N(2)	100,51
H(49)-C(47)-H(48)	108,26	N(21)-C(8)-N(18)	130,84
H(49)-C(47)-C(53)	109,69	N(21)-C(8)-N(7)	118,52
H(49)-C(47)-N(33)	109,68	N(18)-C(8)-N(7)	110,63
H(48)-C(47)-C(53)	109,72	N(13)-N(7)-C(17)	123,99
H(48)-C(47)-N(33)	109,75	N(13)-N(7)-C(8)	109,61
C(53)-C(47)-N(33)	109,72	C(17)-N(7)-C(8)	126,40
H(46)-C(44)-H(45)	108,05	C(29)-S(5)-C(14)	99,73
H(46)-C(44)-C(38)	109,39	N(19)-C(4)-N(15)	130,72
H(46)-C(44)-O(12)	109,41	N(19)-C(4)-N(2)	118,49
H(45)-C(44)-C(38)	109,43	N(15)-C(4)-N(2)	110,77
H(45)-C(44)-O(12)	109,39	C(16)-N(2)-N(9)	124,22
C(38)-C(44)-O(12)	111,10	C(16)-N(2)-C(4)	126,14
H(43)-C(41)-H(42)	107,88	N(9)-N(2)-C(4)	109,64

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 - Длины связей и валентные углы для соединения (51)

Таблица 27

Связь	d, Å	Связь	d, Å
S(1)-C(3)	1.731(1)	O(3)-C(6)	1.324(2)
S(1)-C(1)	1.790(2)	O(3)-H(3D)	0.73(2)
O(1)-C(8)	1.221(2)	N(3)-C(5)	1.485(2)
N(1)-N(2)	1.383(2)	N(3)-H(3A)	0.81(2)
N(1)-C(2)	1.376(2)	N(3)-H(3B)	0.89(2)
N(1)-C(8)	1.367(2)	N(3)-H(3C)	0.83(3)
C(4)-H(4A)	0.970(1)	N(5)-N(6)	1.348(2)
C(4)-H(4B)	0.970(2)	N(5)-H(5)	0.78(2)
C(4)-S(2)	1.812(2)	C(5)-C(6)	1.523(2)
C(4)-C(5)	1.520(2)	C(5)-H(5A)	0.99(2)
S(2)-C(7)	1.756(2)	N(6)-C(7)	1.293(2)
N(2)-C(3)	1.329(2)	C(7)-C(8)	1.469(2)
C(2)-N(4)	1.315(2)	C(1)-H(1A)	0.960(2)
C(2)-N(5)	1.332(2)	C(1)-H(1B)	0.961(2)
O(2)-C(6)	1.193(2)	C(1)-H(1C)	0.960(2)
C(3)-N(4)	1.374(2)		
Угол	w, град	Угол	w, град
C(3)-S(1)-C(1)	100.26(8)	C(2)-N(5)-N(6)	122.5(1)
N(2)-N(1)-C(2)	109.5(1)	C(2)-N(5)-H(5)	125(1)
N(2)-N(1)-C(8)	126.3(1)	N(6)-N(5)-H(5)	112(1)
C(2)-N(1)-C(8)	124.2(1)	C(4)-C(5)-N(3)	112.2(1)
H(4A)-C(4)-H(4B)	107.7(1)	C(4)-C(5)-C(6)	112.8(1)
H(4A)-C(4)-S(2)	108.9(1)	C(4)-C(5)-H(5A)	108(1)
H(4A)-C(4)-C(5)	108.8(1)	N(3)-C(5)-C(6)	108.1(1)
H(4B)-C(4)-S(2)	108.8(1)	N(3)-C(5)-H(5A)	107(1)
H(4B)-C(4)-C(5)	108.9(1)	C(6)-C(5)-H(5A)	108(1)
S(2)-C(4)-C(5)	113.6(1)	N(5)-N(6)-C(7)	118.2(1)
C(4)-S(2)-C(7)	102.81(7)	O(2)-C(6)-O(3)	125.5(2)
N(1)-N(2)-C(3)	100.8(1)	O(2)-C(6)-C(5)	123.4(1)
N(1)-C(2)-N(4)	110.7(1)	O(3)-C(6)-C(5)	111.2(1)
N(1)-C(2)-N(5)	118.7(1)	S(2)-C(7)-N(6)	122.1(1)
N(4)-C(2)-N(5)	130.6(1)	S(2)-C(7)-C(8)	112.3(1)
S(1)-C(3)-N(2)	124.5(1)	N(6)-C(7)-C(8)	125.5(1)
S(1)-C(3)-N(4)	118.6(1)	O(1)-C(8)-N(1)	124.2(1)
N(2)-C(3)-N(4)	116.9(1)	O(1)-C(8)-C(7)	124.9(1)
C(6)-O(3)-H(3D)	106(2)	N(1)-C(8)-C(7)	110.9(1)
C(2)-N(4)-C(3)	102.1(1)	S(1)-C(1)-H(1A)-	109.5(1)
C(5)-N(3)-H(3A)	107(2)	S(1)-C(1)-H(1B)	109.5(1)
C(5)-N(3)-H(3B)	116(1)	S(1)-C(1)-H(1C)	109.5(1)
C(5)-N(3)-H(3C)	111(2)	H(1A)-C(1)-H(1B)	109.4(2)
H(3A)-N(3)-H(3B)	110(2)	H(1A)-C(1)-H(1C)	109.5(2)

Таблица 27 (продолжение)

H(3A)-N(3)-H(3C)	110(2)	H(1B)-C(1)-H(1C)	109.5(2)
H(3B)-N(3)-H(3C)	104(2)		