



Синтез алкилирующих агентов (V)—(VII) осуществляли размыканием соответствующих пяти-, шести- и семичленных циклических ацеталей формальдегида уксусным ангидридом в присутствии ZnCl_2 . Конденсация триметилсилильного производного этилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты с ацетатами (V)—(VII) в присутствии SnCl_4 с последующим дезацетилированием приводила к ациклическим аналогам рибавирина. Структурные изомеры разделяли хроматографией на колонке с силикагелем. Выходы, температуры плавления и УФ-спектры полученных соединений приведены в табл. 1, спектры ПМР — в табл. 2.

В табл. 3 представлены результаты изучения противоаденовирусной активности аналогов рибавирина (Ia, б)—(IVa, б). В качестве контрольного препарата использовали рибамидил — отечественный аналог рибавирина, влияние которого на экспрессию аденовирусного генома было исследовано ранее [2].

Таблица 1

Синтез и свойства ациклических аналогов рибавирина

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	УФ-спектр (в воде): $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ε)
1-(2-Гидроксиэтоксиметил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (Ia)	29	152–153	204 (10 880)
1-(2-Гидроксиэтоксиметил)-1,2,4-триазол-5-карбоксамид (Iб)	10	112–114	205 (8600), 216 (8600) *
1-(3-Гидроксипропoxиметил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (IIa)	29	152–154	204 (10 890)
1-(3-Гидроксипропoxиметил)-1,2,4-триазол-5-карбоксамид (IIб)	25	101–103	203 (8920), 211 (8360) *
1-(4-Гидроксипропoxиметил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (IIIa)	35	118–120	204 (10 560)
1-(4-Гидроксипропoxиметил)-1,2,4-триазол-5-карбоксамид (IIIб)	8	104–106	204 (7330) *, 215 (7600)

* Перегиб спектральной кривой.

Таблица 2

Спектры ПМР в $\text{DMSO}-d_6$ ациклических аналогов рибавирина *

Соединение	Химический сдвиг, м. д. (КССВ, Гц)				
	H3	H5	CONH ₂	OH	1'-CH ₂
(Ia)		8,69 с	7,52 с, 7,73 с	4,65 т (5,6)	5,54 с
(Iб)	8,07 с	—	7,91 с, 8,12 с	4,59 т (5,5)	5,89 с
(IIa)	—	8,72 с	7,71 с, 7,50 с	4,35 т (5,6)	5,69 с
(IIб)	8,06 с	—	7,89 с, 8,11 с	4,37 т (5,6)	5,83 с
(IIIa)	—	8,72 с	7,50 с, 7,70 с	4,28 т (6,0)	5,52 с
(IIIб)	8,06 с	—	7,89 с, 8,12 с	4,34 т (5,6)	5,84 с

* Приведены наиболее характерные сигналы.

Влияние аналогов рибавирина на репродукцию аденовируса человека типа 2 в культуре клеток Нер-2

Препарат	Концентрация, мкг/мл	Количество инфицированных клеток, % (опыт/контроль)	Ингибирование, %
(Ia)	500	31/51	39
	250	24/51	53
	125	43/51	16
(Iб)	500	53/63	18
	250	49/63	22
(IIa)	500	55/63	13
	250	52/63	18
(IIб)	500	43/63	32
(IIIa)	500	37/63	40
	250	42/63	33
(IIIб)	500	35/63	45
	250	50/63	21
(IVa)	500	54/51	0
	250	51/51	0
	125	57/51	0
(IVб)	500	45/51	12
	250	45/51	12
Рибамидил	500	0/63	100
	250	0/63	100
	125	11/63	83

Важно отметить, что изученные препараты не были токсичны для клеток перевиваемой линии Нер-2 в концентрации 1000 мкг/мл при учете цитоморфологическим методом через 48 ч после обработки ими клеток. Структура монослоя и морфология клеток практически не изменялись.

Как видно из табл. 3, все изученные аналоги рибавирина обладают существенно меньшей в сравнении с рибавирином (рибамидил в табл. 3) противовирусной активностью по отношению к аденовирусу человека типа 2. Причем 1-(2,3-дигидроксипропил)-1,2,4-триазол-3- и -5-карбоксамида (IVa) и (IVб), гидроксикальцийный заместитель которых имитирует С1'—С2'—С3'-фрагмент рибозного цикла, вообще не оказывают влияния на репродукцию аденовируса человека. Все соединения, содержащие эфирный кислород, имитирующий О4' углеводного цикла, обладают противовирусной активностью. В парах структурных изомеров (3-карбоксамида «а» и 5-карбоксамида «б») большей активностью обладают изомеры типа «а», структурно подобные рибавирину. Наконец, из всех изученных соединений наиболее сильно подавляет репродукцию аденовируса 1-(2-гидроксиэтоксиметил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (Ia), гидроксигруппа которого структурно соответствует 5'-гидроксилу рибозы.

Интересно отметить, что его структурный изомер (Iб), обладающий весьма слабой противoadеновирусной активностью, оказывает значительно больший, чем рибавирин, ингибирующий эффект на репродукцию вируса простого герпеса [4].

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что для проявления противoadеновирусной активности аналогами рибавирина в изученной модельной системе необходимо наличие эфирного кислорода, имитирующего О4' фуранозного цикла, и геометрическое соответствие гидроксильной группы 5'-гидроксигруппе рибозы.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР снимали на приборе XL-100 (Varian, США). Для обозначения мультиплетности сигналов приняты сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, кв — квартет, м — мультиплет. УФ-спектры записывали на спектрофотометре Spect.

ronik 2000 (Bausch Lomb, Франция). Элементные анализы полученных соединений отличались от вычисленных не более чем на 0,2%.

1-(2,3-Дигидроксипропил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (IVa) и 1-(2,3-дигидроксипропил)-1,2,4-триазол-5-карбоксамид (IVб) получали по описанному ранее методу [5].

1,4-Диацетокси-2-оксабутан (V), 1,5-диацетокси-2-оксапентан (VI), 1,6-диацетокси-2-оксагексан (VII). К 60 ммоль 1,3-диоксолава (или 1,3-диоксоана, или 1,3-диоксопана) при перемешивании добавляли 180 ммоль уксусного ангидрида и 2—5 г $ZnCl_2$. Реакционная смесь при этом разогревается. После охлаждения смесь перемешивали еще 6 ч, избыток уксусного ангидрида отгоняли в вакууме, а остаток выливали в 450 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$. После прекращения выделения CO_2 смесь экстрагировали хлороформом (4 × 50 мл), хлороформные экстракты промывали водой и сушили Na_2SO_4 . Растворитель упаривали в вакууме и остаток перегоняли в вакууме. Температура кипения ацетата (V) 106—108° С, ацетата (VI) — 98—100° С, ацетата (VII) — 110—112° С (все при 2 мм рт. ст.); выход 60, 53 и 79% соответственно. ПМР ($CDCl_3$) ацетата (V): 5,23 (2H, с, 1- CH_2), 4,17 (2H, т, J 5,0 Гц, 4- CH_2), 3,78 (2H, т, J 5,0 Гц, 3- CH_2), 2,06 (3H, с, 4- CH_3CO_2), 2,04 м. д. (3H, с, 1- CH_3CO_2); ацетата (VI): 5,23 (2H, с, 1- CH_2), 4,13 (2H, т, J 6,0 Гц, 5- CH_2), 3,68 (2H, т, J 6,0 Гц, 3- CH_2), 2,09 (3H, с, 5- CH_3CO_2), 2,03 (3H, с, 1- CH_3CO_2), 1,90 м. д. (2H, кв, J 6,0 Гц, 4- CH_2); ацетата (VII): 5,24 (2H, с, 1- CH_2), 4,06 (2H, т, J 6,5 Гц, 6- CH_2), 3,64 (2H, т, J 6,0 Гц, 3- CH_2), 2,08 (3H, с, 6- CH_3CO_2), 2,04 (3H, с, 1- CH_3CO_2), 1,68 м. д. (4H, м, 4- CH_2 и 5- CH_2).

Алкилирование этилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты. Смесь 10 ммоль этилового эфира 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты и 6 мл гексаметилдисилазана кипятили 1 ч, охлаждали и избыток гексаметилдисилазана упаривали в вакууме. К остатку добавляли 26 мл абсолютного ацетонитрила, 10 ммоль ацетата (V) (или (VI), или (VII)), 1,25 мл $SnCl_4$ и оставляли при комнатной температуре на 1 сут. Реакционную смесь выливали в 100 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$, экстрагировали хлороформом (4 × 50 мл), объединенные хлороформные экстракты промывали водой и сушили Na_2SO_4 . Хлороформ упаривали, остаток растворяли в 50 мл полунасыщенного при 0° С метанольного раствора аммиака и выдерживали при комнатной температуре 2 сут. Метанол упаривали, а остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (40—100 мкм). Элюировали смесью хлороформ — этанол (линейный градиент концентрации этанола от 0 до 30%). Выходы, температуры плавления и УФ-спектры полученных аналогов рибавирин (Ia, б) — (IIa, б) приведены в табл. 1, ПМР-спектры — в табл. 2.

Антиаденовирусную активность препаратов оценивали с помощью разработанного ранее [2] цитоморфологического метода, основанного на выявлении числа инфицированных клеток по наличию в них характерных внутриядерных включений, являющихся местом накопления вирусных компонентов и формирования вирионов. Использовали аденовирус человека типа 2 и культуру клеток Нер-2. Клетки выращивали в пробирках из полосках покровных стекол. В качестве ростовой среды использовали среду Игла, содержащую 10% прогретой сыворотки крупного рогатого скота. Через 2 сут клетки заражали аденовирусом (титр $6 \cdot 10^8$ ВОЕ*/мл, множественность инфицирования 10 ВОЕ/клетка). После адсорбции вируса в течение 60 мин при комнатной температуре клетки отмывали раствором Хенкса и в пробирки вносили среду Игла, содержащую препарат в определенной концентрации. Контролем служили инфицированные клетки, в которых проводили замену ростовой среды на поддерживающую (среда Игла без сыворотки), не содержащую препарата. Результаты учитывали через 48 ч. С целью выявления внутриядерных ДНК-содержащих включений клетки фиксировали 96% этиловым спиртом, отмывали раствором Хенкса и флуорохромировали 0,01% раствором акридинового оражевого. Препараты исследовали в люминесцентном микроскопе МЛ-2. Определяли число клеток, содержащих внутриядерные включения, анализируя по 500 клеток в каждом из трех стекол. Антиаденовирусное действие препарата оценивали по снижению числа клеток с включениями в опыте по отношению к контролю и выражали в процентах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галегов Г. А., Львов Н. Д., Петрова И. Г., Флорентьев В. Л. // *Вопр. мед. химии*. 1986. № 1. С. 10—19.
2. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Тарасишин Л. А., Жовноватая В. Л., Лидак М. Ю., Машкооский Н. Н., Алексеева И. В. // *Мол. генетика, микробиология и вирусология*. 1984. Т. 11. № 1. С. 41—45.
3. Кривцын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. // *Молекуляр. биология*. 1975. Т. 9. № 1. С. 121—124.
4. Галегов Г. А., Лишицкая Г. Л., Кройча Ю. Г., Цилевич Т. Л., Загородний С. Г., Флорентьев В. Л. 1-(2-Оксиэтоксиметил)-1,2,4-триазол-5-карбоксамид, обладающий активностью против вируса герпеса: А. с. 1124559 СССР // *Б. И.* 1986. № 25. С. 277.
5. Цилевич Т. Л., Загородний С. Г., Маркс У., Ионов Л. В., Флорентьев В. Л. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. № 6. С. 819—827.

Поступила в редакцию
7.IX.1987

* ВОЕ — включенияобразующие единицы.

ACYCLIC ANALOGUES OF RIBAVIRINE. SYNTHESIS
AND ANTIVIRAL ACTIVITY

TSULEVICH T. L., SHCHAVELEVA I. L., NOSACH L. N.*, ZHOVNOVATAYA V. L.*,
SMIRNOV I. P., KOCHETKOVA S. V., GOTTIKH B. P., FLORENTIEV V. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow:*

** D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Activity of several ribavirine analogues, viz. 1-(2-hydroxyethoxymethyl)-, 1-(3-hydroxypropoxymethyl)-, 1-(4-hydroxybutoxymethyl)- and 1-(2,3-dihydroxypropyl)-1,2,4-triazole 5- and 3-carboxamides, against human adenovirus type 2 in the Hep-2 cell culture has been studied. The ether oxygen atom imitating the ribose O4' was shown to be essential for the antiviral activity. 1-(2-Hydroxyethoxymethyl)-1,2,4-triazole 3-carboxamide, a structural analogue of ribavirine in which the hydroxyl group is apparently equivalent to the ribose 5'-OH, possesses the highest activity among the compounds studied. Lengthening of the alkyl side chain reduces essentially the antiviral activity.