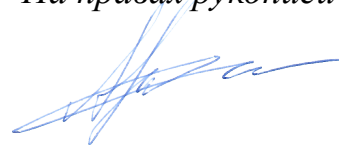


Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
Институт биохимии им. А. Н. Баха

На правах рукописи



ЦЕДИЛИН
Андрей Михайлович

**Синтез и исследование оригинальных N-гетероциклических
производных как ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ
и нейраминидазы вируса гриппа**

Специальность 1.4.3. Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.фарм.н., к.х.н. В. А. Макаров

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Препараты против вируса иммунодефицита человека	14
1.1.1 Общие сведения.....	14
1.1.2 Жизненный цикл ВИЧ и мишени для противовирусных препаратов	15
1.1.3 Ингибиторы протеазы.....	16
1.1.4 Ингибиторы интегразы	21
1.1.5 Ингибиторы слияния.....	27
1.1.6 Ингибиторы обратной транскриптазы	33
1.2 Препараты против вируса гриппа.....	39
1.2.1 Общие сведения.....	39
1.2.2 Строение и жизненный цикл вируса гриппа	39
1.2.2 Ингибиторы гемагглютинаина.....	40
1.2.3 Ингибиторы нейраминидазы	43
1.2.4 Ингибиторы нуклеокапсидного белка	46
1.2.5 Ингибиторы ионного канала M2	47
1.2.6 Ингибиторы РНК-полимеразы.....	48
1.2.7 Прочие ингибиторы	56
1.3 Выводы по главе 1	57
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	58
2.1 Новый класс ингибиторов обратной транскриптазы N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амины	58
2.1.1 Синтез	58

2.1.2 Анализ зависимости «структура – активность».....	60
2.1.3 Расширенный противовирусный скрининг	67
2.1.4 Тест на ингибирование ОТ	69
2.1.5 <i>In vitro</i> ADME-Tox для 3.30	71
2.1.6 <i>In vitro</i> нейротоксичность.....	72
2.1.7 <i>In vivo</i> исследования для 3.30.....	75
2.1.7 Докинг	79
2.1.8 Визуализация по алгоритму t-SNE	80
2.1.9 Выводы по разделу 2.1	81
2.2 Новый класс ингибиторов нейраминидазы пирроло[2,3- <i>e</i>]индазол	83
2.2.1 Синтез	83
2.2.2 Рентгеноструктурный анализ.....	85
2.2.3 Противовирусный скрининг	86
2.2.4 Тесты на ингибирование нейраминидазы	90
2.2.5 Докинг	92
2.2.6 Ингибирование планктонного роста и образования биопленок	93
2.2.7 Выводы по разделу 2.2	94
2.3 Ингибиторы нейраминидазы на основе 3-индолинонового ядра, использующие в качестве мишени полость-430	96
2.3.1 Общая стратегия исследования	97
2.3.2 Синтез	98
2.3.3 Анализ зависимости «структура – активность».....	101
2.3.4 Докинг	109
2.3.5 Активность против вируса гриппа А в клеточной культуре	110

2.3.6 Сравнение 5.10 и 5.30 на модели вирусной пневмонии на мышах.....	111
2.3.7 Выводы по разделу 2.3	112
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	114
3.1 Общие инструментальные и методические аспекты.....	114
3.2 К разделу 2.1	115
3.2.1 Синтетические процедуры	115
3.2.2 Аналитические данные синтезированных соединений.....	117
3.2.3 Клеточные и вирусные культуры	143
3.2.3 Тесты на ингибирование и токсичность	143
3.2.4 Тесты на ингибирование ОТ	144
3.2.5 <i>In vitro</i> ADME-Tox	145
3.2.6 <i>In vitro</i> нейротоксичность.....	149
3.2.7 <i>In vivo</i> исследования.....	151
3.2.8 Докинг	153
3.2.9 Визуализация по алгоритму t-SNE	154
3.3 К разделу 2.2	154
3.3.1 Синтетические процедуры	154
3.3.2 Аналитические данные синтезированных соединений.....	156
3.3.3 Рентгеноструктурный анализ.....	172
3.3.4 Клеточные и вирусные культуры	173
3.3.5 Цитотоксичность	173
3.3.6 Ингибирование цитопатического эффекта вируса гриппа А	174
3.3.7 Ингибирование вирусной нейраминидазы по гемагглютинации	174
3.3.8 Ингибирование нейраминидазы <i>S. Pneumoniae</i> по гемагглютинации .	175

3.3.9 Докинг	176
3.3.10 Антибактериальные исследования	176
3.4 К разделу 2.3	177
3.4.1 Синтетические процедуры	177
3.4.2 Аналитические данные синтезированных соединений.....	178
3.4.3 Клеточные и вирусные культуры	198
3.4.4 Скрининг противовирусной активности	198
3.4.5 Цитотоксичность	198
3.4.6 Ингибирование вирусной нейраминидазы по гемагглютинации	199
3.4.7 Оценка эффективности <i>in vivo</i>	199
3.3.8 Докинг	200
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	201
БЛАГОДАРНОСТИ	202
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	203
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	207

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В основе противодействия вирусным эпидемиям лежат три основных подхода: меры, основанные на изменении общественных и поведенческих принципов (изоляция, карантин и т. п.), профилактика с использованием вакцин (для снижения темпов передачи и, в итоге, ликвидации вируса в популяции) и терапия с использованием низкомолекулярных соединений и моноклональных антител (для непосредственно лечения заболевания и снижения смертности у инфицированных пациентов). При этом меры общественного регулирования, несмотря на свою изначальную эффективность, в долгосрочной перспективе могут привести к серьезным экономическим и социальным последствиям, в то время как создание универсальных и эффективных вакцин от ряда вирусов, отличающихся высокой изменчивостью (таких как ВИЧ, грипп и др.), затруднительно или в принципе практически невозможно. Таким образом, одним из наиболее актуальных направлений современной органической химии является разработка новых эффективных и безопасных терапевтических средств, при этом существенное внимание уделяется разработке низкомолекулярных соединений с противовирусной активностью.

Несмотря на развитие в фармакологии в последние годы методов рационального дизайна, фенотипический скрининг остается доминирующим подходом к поиску новых лекарственных препаратов. В ходе фенотипического скрининга обширной лабораторной базы органических соединений было обнаружено три новых потенциальных класса противовирусных препаратов: N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амины (активность против ВИЧ), пирроло[2,3-*e*]индазолы и 3-индолинолы (активность против гриппа).

Цель работы. 1) Разработать эффективный ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ на основе обнаруженного в ходе скрининга лабораторной библиотеки химических соединений N-фенил-1-

(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминового ядра. 2) Разработать эффективные ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа на основе обнаруженных в ходе скрининга лабораторной библиотеки химических соединений пирроло[2,3-*e*]индазольного и 3-индолинонового ядер.

Задачи. Для достижения поставленных целей было необходимо решить следующие задачи:

- 1) Синтезировать широкий ряд соединений с заместителями различной природы на основе N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминового, пирроло[2,3-*e*]индазольного и 3-индолинонового ядер.
- 2) Провести анализ «структура-свойства» в отношении противовирусной активности для синтезированных соединений.
- 3) Для наиболее перспективных соединений оценить релевантные параметры, такие как цитотоксичность, ADME-характеристики и др.
- 4) Провести для наиболее перспективных соединений моделирование методами молекулярной динамики с целью подтверждения предполагаемых механизмов ингибирования.

Научная новизна. В ходе выполнения работы впервые охарактеризованы с точки зрения противовирусной активности три класса низкомолекулярных соединений, при этом суммарно синтезировано и охарактеризовано более 100 индивидуальных соединений, подавляющее большинство из которых получено впервые.

Практическая значимость. Проведенное определение ингибирующей активности, цитотоксичности и ряда других фармакологически релевантных параметров для соединений-лидеров позволяет сделать вывод о том, что они не уступают, а в некоторых случаях существенно превосходят имеющиеся на рынке соответствующие аналоги. Таким образом, все три изученные класса

соединений имеют высокий потенциал для дальнейшей разработки и применения в терапии ВИЧ и гриппа.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Синтез ряда замещенных N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминов и исследования их противовирусной (ВИЧ) активности и фармакологических свойств.
- 2) Синтез ряда замещенных пирроло[2,3-*e*]индазолов и исследования их противовирусной (грипп) и антибактериальной (*S. Pneumoniae*) активности и цитотоксичности.
- 3) Синтез ряда замещенных 3-индолинонов и исследования их противовирусной (грипп) активности и цитотоксичности.

Степень достоверности. Все эксперименты проведены на современном уровне и с соблюдением соответствующих этических норм. Состав и структура полученных соединений подтверждены с использованием комплекса физико-химических методов анализа (^1H , ^{13}C спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрия высокого разрешения, высокоэффективная жидкостная хроматография и рентгеноструктурный анализ). *In vitro* исследования проведены с использованием хорошо зарекомендовавших себя протоколов в нескольких повторениях. *In vivo* исследования проведены строго в соответствии с утвержденными стандартами. Все полученные для различных методов результаты хорошо согласуются между собой.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования доложены на Международной конференции по химии «Байкальские чтения – 2023» (Иркутск, Россия, 2023), Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии (АПОХ-2024)» (Новосибирск, Россия, 2024).

Публикации. Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК, и 2 тезисах докладов. Публикации по теме диссертационного исследования:

- 1) Lane T., Makarov V., Nelson J. A. E., Meeker R. B., Sanna G., Riabova O., Kazakova E., Monakhova N., **Tsedilin A.**, Urbina F., Jones T., Suchy A., Ekins S. *N*-Phenyl-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol-3-amine as a New Class of HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor // J. Med. Chem. 2023. Т. 66, № 9. С. 6193–6217. **IF = 7.3 (Q1)**
- 2) Egorova A., Richter M., Khrenova M., Dietrich E., **Tsedilin A.**, Kazakove E., Lepioshkin A., Jahn B., Chernyshev V., Schmidtke M., Makarov V. Pyrrolo[2,3-*e*]indazole as a novel chemotype for both influenza A virus and pneumococcal neuraminidase inhibitors // RSC Adv. 2023. Т. 13, № 27. С. 18253–18261. **IF = 3.9 (Q2)**
- 3) **Tsedilin A.**, Schmidtke M., Monakhova N., Leneva I., Falynskova I., Khrenova M., Lane T., Ekins S., Makarov V. Indole-Core Inhibitors of Influenza A Neuraminidase: Iterative Medicinal Chemistry and Molecular Modeling // Eur. J. Med. Chem. 2024. Т. 277. С. 116768. **IF = 6.0 (Q1)**
- 4) Young M., Lane T., Raman R., Nelson J., Riabova O., Kazakova E., Monakhova N., **Tsedilin A.**, Rees S., Quinnell D., Makarov V., Chang G., Ekins S. Cryo-EM Structure of HIV-1 Reverse Transcriptase with *N*-Phenyl-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol-3-amine: A New HIV-1 Non-nucleoside Inhibitor // ACS Infectious Diseases. 2025. Т. 11, № 5. С. 1257-1267. **IF = 4.1 (Q1)**

Личный вклад автора состоял в поиске, анализе и систематизации литературных данных, планировании и проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций по теме диссертационного исследования.

Структура и объем работы. Представленная диссертационная работа изложена на 244 страницах машинописного текста, включает 12 рисунков,

28 схем и 18 таблиц и состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы, включающего 371 источник.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Вирусы являются одними из важнейших патогенов, вызывающих различные серьезные заболевания у человека, животных и растений. За время существования человеческой цивилизации вирусные инфекции привели к миллионам человеческих жертв по всему миру, что вызвало острую необходимость в разработке противовирусных препаратов [1,2]. На сегодняшний день вирусные инфекции занимают существенную долю в причинах смертности и потери трудоспособности, при этом стабильно высокий вклад в статистику вносят вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)*, грипп и коронавирус (табл. 1.1).

Таблица 1.1 Число зарегистрированных случаев вирусных заболеваний
(на 100 000 чел.) в России по годам [3,4].

	2005	2010	2015	2020	2021	2022
вирусные гепатиты	92.8	65.5	56.3	44.1	23.2	32.2
из них острый гепатит С	4.5	2.1	1.4	1.0	0.6	0.7
корь	0.29	0.09	0.6	3.0	0.001	0.07
краснуха	101	0.4	0.02	0.02	0.001	0.001
эпидемический паротит	2.1	0.4	0.1	0.7	0.2	0.4
ветряная оспа	448.8	472.4	559.6	555.1	355.1	440.7
грипп	639.5	19.1	33.9	37	14.8	60.2
геморрагические лихорадки	5.2	3.6	6.5	10.1	1.6	4.8
клещевой энцефалит	3.2	2.2	1.6	1.2	0.7	1.3
ВИЧ	21.2	34.9	60.1	55.3	41.4	42.9
коронавирусная инфекция				3362.5	8028.2	8553.5

Среди одобренных к клиническому применению противовирусных препаратов подавляющую часть составляют низкомолекулярные соединения

* здесь и далее по тексту, если не указано особо, под ВИЧ подразумевается ВИЧ-1

(табл. 1.2), при этом большинство из них используют в качестве мишени вирусные белки.

Таблица 1.2. Белки, используемые в качестве мишеней, и их некоторые клинически применяемые ингибиторы.

Вирус	Мишень	Ингибитор
ВИЧ	протеаза	лопинавир, дарунавир
	интеграза	ралтегравир, долутегравир
	gp41/gp120/CCR5	энфувиртид, маравирок
	обратная транскриптаза	зидовудин, эфавиренз
грипп	гемагглютенин	натазоксанид, умифеновир
	нейраминидаза	занамивир, озельтамивир
	нуклеокапсидный белок	нуклеозин, ингавирин
	M2	ремантадин, мопиридон
	полимераза	фавипиравир, балоксавир
	<i>неизвестно</i>	триазаверин
гепатит В	полимераза	энтекавир, тенофовир, клевудин
	протеаза	симепревир, глекапревир
гепатит С	NS5A	даклатасвир, велпатасвир
	полимераза	софосбувир, дасабувир
РСВ	полимераза	рибавирин
	гликопротеин F	паливизумаб
герпес	полимераза	бривудин, ацикловир
	вирусная оболочка	докозано́л
цитомегаловирус	полимераза	фоскарнет, ганцикловир
	терминаза	летермовир
ветряная оспа	полимераза	ацикловир, алафенамид
натуральная оспа	VP37	тековиримат

Вирус иммунодефицита человека — лентивирус семейства *Retroviridae*, вызывающий синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Геном ВИЧ характеризуется высоким уровнем изменчивости, что делает этот вирус одним из самых быстроэволюционирующих организмов [5], с нуклеотидным разнообразием, достигающим 50% между ВИЧ-1 и ВИЧ-2, и до 37,5 % между группами ВИЧ [6]. Такая высокая скорость мутаций ВИЧ приводит к образованию заметной резистентности к применяемым противовирусным препаратам несмотря на широкое разнообразие последних. За последние четыре десятилетия ВИЧ нанес колоссальный ущерб мировому благосостоянию и здоровью населения. По данным ВОЗ, от 32,9 до 51,3 млн человек были заражены ВИЧ, что привело в 2022 г. к 630 тыс. смертей.

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Первая известная пандемия гриппа была зарегистрирована летом 1510 г. [7], а сам вирус был впервые выделен в 1933 г. [8]. Вирус гриппа способен вызывать серьезные пандемии (например, испанский грипп 1918 г., азиатский грипп 1957 г., гонконгский грипп 1968 г.). Отличительной особенностью вируса гриппа типа А является наличие, наряду с антигенным дрейфом, сильно выраженного антигенного сдвига — процесса, при котором несколько различных штаммов вируса объединяются с образованием нового подтипа, содержащего смесь поверхностных антигенов исходных штаммов [9]. Это способствует радикальному изменению фенотипа, что может приводить к резкому несоответствию применяющейся в текущем сезоне вакцины циркулирующему вирусу, вызывая таким образом пандемию. По данным ВОЗ, около миллиарда человек ежегодно заболевают сезонным гриппом, включая 3–5 млн тяжело протекающих случаев, что приводит к 290–650 тыс. смертей.

Исходя из вышеперечисленного, данная работа была сфокусирована на вирусах иммунодефицита человека и гриппа. В рамках данного литературного обзора будут кратко разобраны применяемые на сегодняшний день в клинической практике препараты для терапии этих заболеваний.

1.1 Препараты против вируса иммунодефицита человека

1.1.1 Общие сведения

С момента первого зарегистрированного случая СПИДа в 1981 г. разработка антиретровирусной терапии вируса иммунодефицита человека [10,11] идет с уникально высокой для медицинской науки скоростью [12]. Первый препарат против СПИДа — зидовудин — был разработан и применен на практике в течение первых 10 лет после идентификации вируса [13,14]. Все препараты против ВИЧ первого поколения являются ингибиторами обратной транскриптазы (ИОТ). В последствии были открыты новые мишени для противовирусной терапии, в частности вирусная протеаза и вирусная интеграза [15,16]. В середине 90-х годов прошлого века существенный прорыв в терапии ВИЧ был связан с разработкой ингибиторов вирусной протеазы ВИЧ (ИВП) и внедрением в практику комбинационной антиретровирусной терапии (АРВТ). Применение АРВТ позволяет существенно подавить репликацию вируса и снизить вирусную нагрузку в плазме крови, вследствие чего происходит значительное восстановление иммунной системы [17–19]. Начиная с 1996 г. продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов, проходящих АРВТ, существенно увеличилась, и к настоящему времени показатели смертности для ВИЧ-инфицированных приближаются к уровню общей смертности [20–22].

Однако, на ранних этапах развития АРВТ был выявлен ряд проблем, таких как токсичность препаратов и возникновение резистентности к применяемым в то время схемам лечения. Это привело к разработке более сильных и менее токсичных препаратов против ВИЧ, таких как новое поколение ИОТ (тенофовир дисопроксил фумарат и др.) и ИВТ (дарунавир и др.). Кроме того, были разработаны новые схемы лечения, направленные на другие мишени — ингибиторы вирусной интегразы (ИВИ) и ингибиторы проникновения (ИПР) [23–26]. В настоящее время наиболее успешной

является схема АРВТ с использованием основы из двух ИОТ в сочетании с «ключевым» препаратом (ИВТ или ИВИ).

1.1.2 Жизненный цикл ВИЧ и мишени для противовирусных препаратов

Жизненный цикл ВИЧ начинается с присоединения вирусной частицы к клетке-хозяину путем образования прочного комплекса между гликопротеином gp120 оболочки вируса и рецептором CD4 клеточной мембраны, после чего следует связывание вируса с хемокиновыми рецепторами CXCR4 или CCR5 [27–36]. Это, в свою очередь, вызывает активацию вирусного гликопротеина gp41, конформационные изменения в котором приводят к слиянию вирусной и клеточной мембран [37–40]. После высвобождения содержимого вириона в цитоплазму происходит транскрипция вирусной РНК в двухцепочечную ДНК на обратной транскриптазе ВИЧ и интеграция вирусной ДНК в хромосому клетки-хозяина; синтез вирусных белков осуществляется собственными механизмами клетки. Полипротеин вирусной оболочки gp160 транспортируется в аппарат Гольджи и расщепляется клеточным фурином на gp41 и gp120 [41], которые, в свою очередь, транспортируются и прикрепляются к клеточной мембране вместе с вирусными ферментами, полипротеинами Gag (p55), Gag-Pol (p160) и геномной РНК вируса, после чего формирующийся вирион начинает отпочковываться от клетки-хозяина. Внутри формирующегося вириона происходит расщепление вирусной протеазой полипротеинов Gag на матриксный, капсидный и нуклеокапсидный белки, после чего следует окончательная сборка структурных компонентов вируса в зрелый вирион ВИЧ, способный заразить другую клетку.

Таким образом, препараты против ВИЧ должны быть нацелены либо на вирусные, либо на клеточные белки, связанные с циклом репликации вируса. Кроме того, взаимодействие таких малых молекул с целевыми белками в идеальном случае должно обеспечивать ВИЧ-специфический ингибирующий эффект с низкой токсичностью [2,42,43].

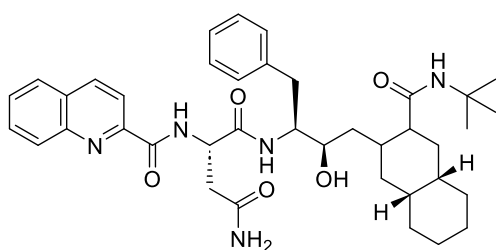
1.1.3 Ингибиторы протеазы

Протеаза ВИЧ — аспаргиновая протеаза, расщепляющая полипротеины ВИЧ Gag и Gag-pol на структурные белки и ферменты вируса. Этот процесс происходит на поздней стадии жизненного цикла ВИЧ во время сборки и отделения вириона от инфицированной клетки, что является ключевой стадией формирования зрелых вирусных частиц. Протеаза состоит из двух идентичных субъединиц размером в 99 аминокислотных остатков, ее активный центр находится в месте сцепления мономеров, каждый из которых предоставляет по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты (D25 и D25'). Два гибких β -листа с консервативным остатком глицина образуют подвижную заслонку над активным центром, достаточно гибкую, чтобы обеспечить вход и выход субстрата, вызывая конформационный сдвиг к закрытию активного центра при связывании фермента с субстратом. Субстраты связываются с ферментом в расширенной конформации с минимум семью аминокислотными остатками [44,45].

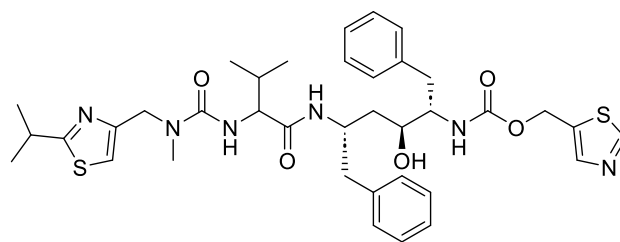
Все применяемые в настоящее время ИВП действуют по конкурентному механизму, связываясь с активным центром протеазы. Большинство из них, в особенности, относящиеся к первому поколению (саквинавир **1.3.1**, ритонавир **1.3.2**, индинавир **1.3.3**, нелфинавир **1.3.4**), имеют относительно схожие химические структуры (схема 1.1.3.1), что приводит к часто наблюдаемой кросс-резистентности. Первичные мутации, обеспечивающие резистентность, располагаются внутри сайта связывания субстрата/ингибитора (D30N, G48V, I50V, V82A, I84V), что, в свою очередь, отрицательно влияет на репликативную пригодность.

В то же время, мутации за пределами активного центра (вторичные) не влияют на связывание ингибитора и служат для компенсации снижения ферментативной активности, вызванного первичными мутациями [46–48]. Подобные вторичные мутации были найдены не только в самой протеазе, но и рядом с сайтами расщепления в вирусных субстратах [49–52]. Таким образом,

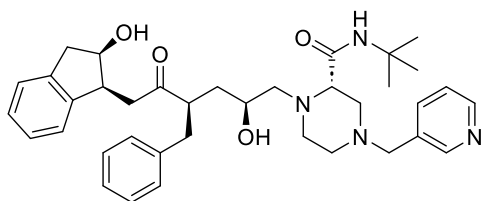
создание высокого уровня устойчивости к ИВП требует поэтапного накопления различных мутаций для создания протеазы, способной эффективно различать ингибитор и естественный субстрат, сохраняя при этом необходимый для репликации уровень каталитической активности [46,53].



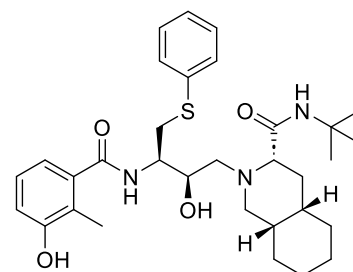
1.3.1



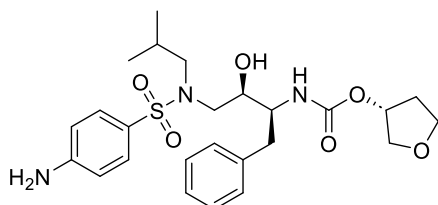
1.3.2



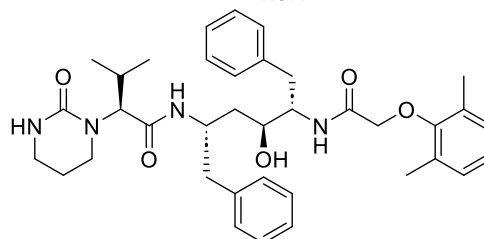
1.3.3



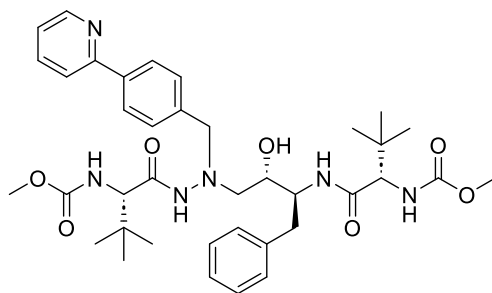
1.3.4



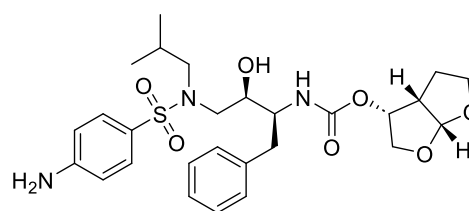
1.3.5



1.3.6



1.3.7



1.3.8

Схема 1.1.3.1 Ингибиторы протеазы.

Другим существенным недостатком ИВП 1-го поколения является их пептидная природа, обуславливающая их относительно короткий период полураспада и плохую оральную биодоступность. Появившиеся в 2000-х гг.

такие ИВП как лопинавир **1.3.5**, ампенавир **1.3.6** и атазанавир **1.3.7** (схема 1.1.3.1) обладают улучшенным фармакокинетическим профилем с точки зрения оральной дозировки (один раз в день) и большим генетическим барьером к образованию резистентности.

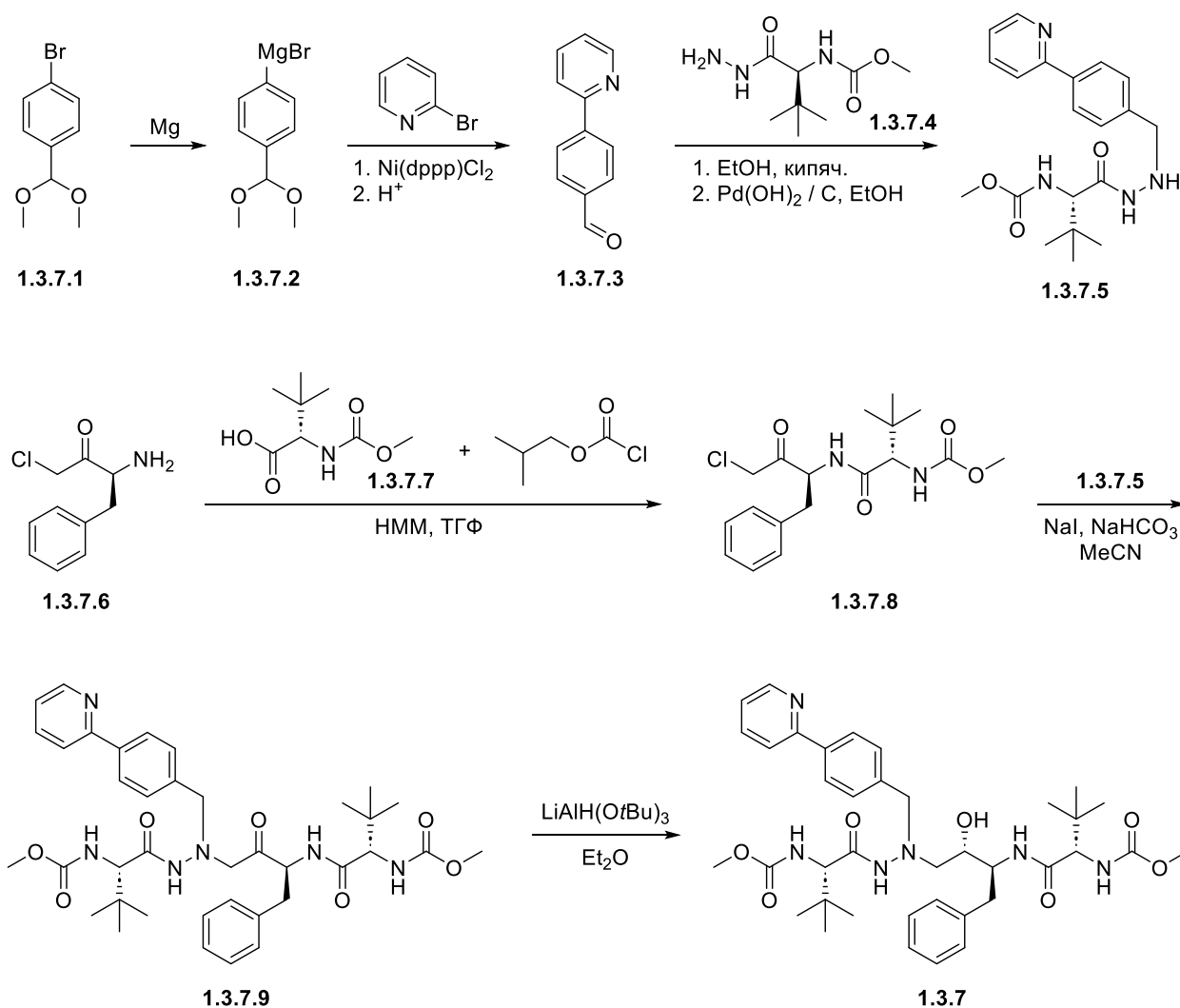


Схема 1.1.3.2 Синтез атазенавира.

Эффективный и практичный синтез атазенавира в качестве ключевого и заключительного этапа использует диастереоселективное восстановление кетометиленового аза-дипептида **1.3.7.9**, собираемый из двух ключевых интермедиатов: гидразина **1.3.7.5** и производного 1-амино-3-хлорпропан-2-она **1.3.7.8**. На первой стадии полученный из диметилацетата 4-бромбензальдегида **1.3.7.1** реактив Гриньяра **1.3.7.2** сочетают с 2-

бромпиридином в условиях реакции Кумады с образованием 4-(пиридин-2-ил)бензальдегида **1.3.7.3**, который затем подвергают конденсации с N-(метоксикарбонил)-L-*трет*-лейцинилгидразином **1.3.7.4** в этаноле. Полученная реакционная смесь без предварительной очистки гидрируется на гидроксиде палладия на угле с образованием гидразина **1.3.7.5** с высоким выходом и чистотой. На второй стадии синтеза реакцией (S)-3-амино-1-хлор-4-фенилбутан-2-она **1.3.7.6** с приготовленным из N-(метоксикарбонил)-L-*трет*-лейцина **1.3.7.7** и изобутилхлорформиата смешанным ангидридом получают хлорметилкетон **1.3.7.8**. Затем сочетанием гидразина **1.3.7.5** и хлорметилкетона **1.3.7.8** в присутствии йодида натрия и гидрокарбоната натрия в ацетонитриле получают кетон **1.3.7.9**, который восстанавливают три(*трет*-бутокси)аллюмогидридом лития в диэтиловом эфире с получением искомого атазенавира **1.3.7** в качестве единственного продукта (схема 1.1.3.2) [54].

Наиболее современным ИВП является дарунавир **1.3.8** (схема 1.1.3.1), допущенный к применению в 2006 г. у взрослых пациентов с опытом лечения в 2006 и в 2008 г. у не получавших лечение пациентов [55–59]. Будучи высокоактивным непептидным препаратом, в ходе доклинических исследований дарунавир сохранял ингибирующий эффект в отношении штаммов ВИЧ с мультипрепаратной резистентностью и показал наличие высокого генетического барьера для развития резистентности [55,60]. Тем не менее, в ходе клинических испытаний было выявлено образование мультипрепаратной резистентности, обусловленной 11 мутациями вирусной протеазы (V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V и L89V), связанными со снижением вирусологического ответа на дарунавир. Несмотря на это стоит отметить, что дарунавир демонстрирует значительно более высокую эффективность по сравнению с другими ИВП у пациентов с опытом лечения независимо от исходного вирусного генотипа и фенотипа, обладая при этом высоким генетическим барьером к развитию резистентности [57,61–63].

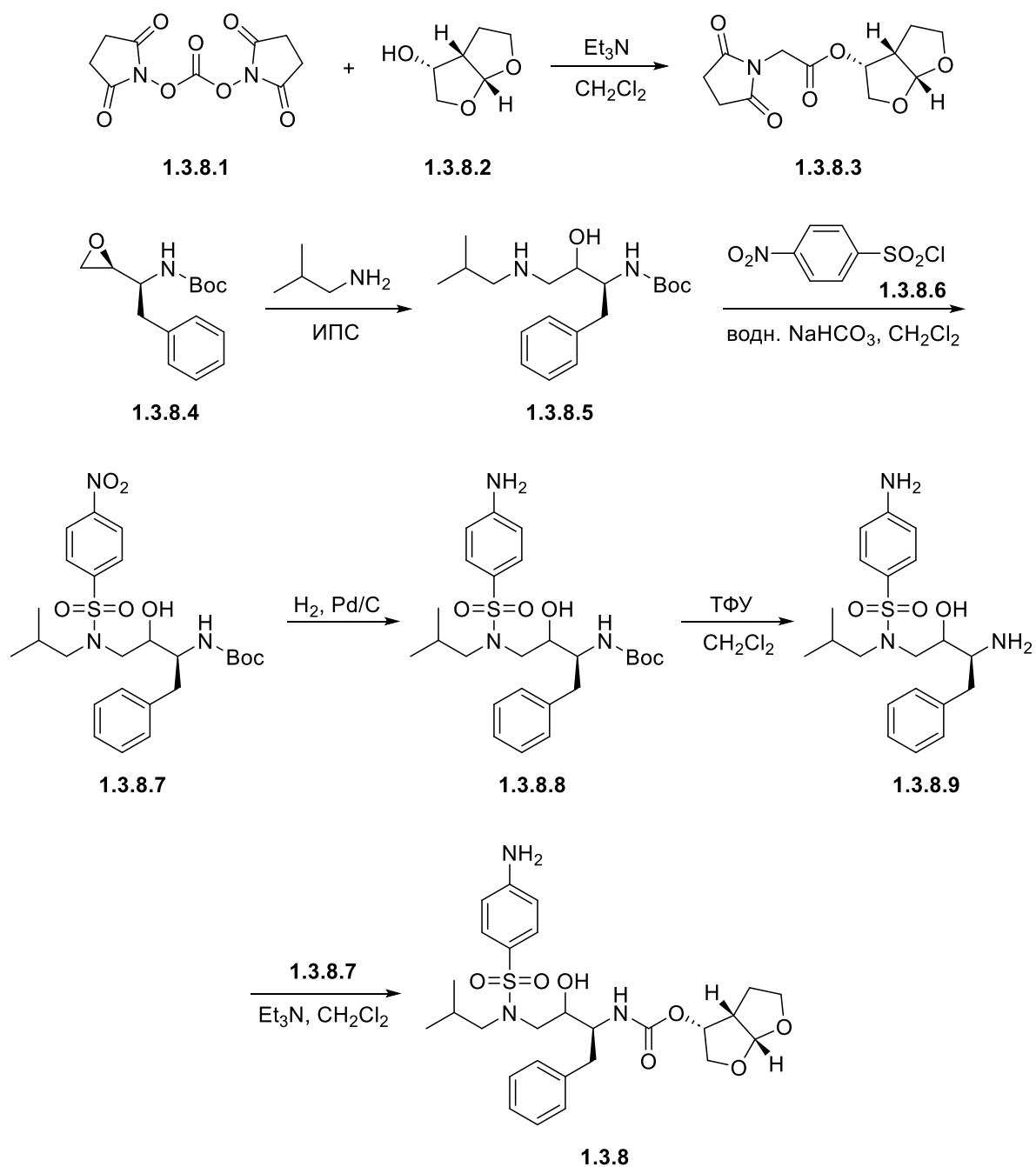


Схема 1.1.3.3 Синтез дарунавира.

Структурный анализ *in vitro* показывает, что ключевым для активности дарунавира против мультирезистентных к ИВП штаммов ВИЧ является его тесный контакт с остатками D29 и D30 активного центра протеазы [55]. Кроме того, было показано, что дарунавир сильно подавляет димеризацию протеазы [64]. Поскольку димеризация мономеров протеазы необходима для обеспечения ее каталитической функции, ингибирование этого процесса

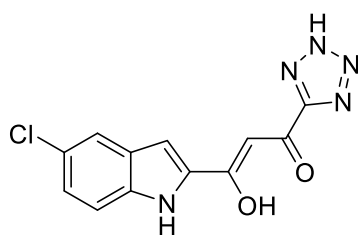
может дать новый эффективный подход к терапии ВИЧ, обладающий высоким генетическим барьером к резистентности [56,64].

Синтез даруновира осуществляется сочетанием смешанного карбоната **1.3.8.3** с производным бензолсульфонамида **1.3.8.9**. На первой стадии реакцией N,N'-дисукцинимидил карбоната **1.3.8.1** с оптически активным *бис*-тетрагидрафуранолом **1.3.8.2** в присутствии триэтиламина в хлористом метиле получают смешанный карбонат **1.3.8.3**. На второй стадии коммерчески доступный (S)-1((S)-оксиран-2-ил)-2-фенилэтил-1-амин **1.3.8.4** вводили в реакцию с изобутиламином кипячением в изопропанол с образованием аминспирта **1.3.8.5**, реакцией которого с *n*-нитробензолсульфонил хлоридом **1.3.8.6** в присутствии водного гидрокарбоната натрия получали сульфонамидное производное **1.3.8.7**. Затем каталитическим гидрированием полученного продукта на 10% палладии на угле в этилацетате восстанавливали нитрогруппу с получением соответствующего амина **1.3.8.8**. Снятие БОК-защиты проводили с использованием трифторуксусной кислоты с образованием диамина **1.3.8.9**, реакцией которого со смешанным карбонатом **1.3.8.3** в присутствии триэтиламина получали искомый дарунавир **1.3.8** с высоким выходом [65,66].

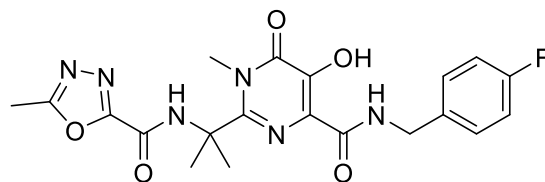
1.1.4 Ингибиторы интегразы

Интеграза ВИЧ — энзим, катализирующий внедрение провирусной кДНК, синтезированной из вирусной РНК, в геном инфицированной клетки. Интеграция вирусной ДНК состоит из двух стадий: 3'-концевой процессинг и перенос цепи ДНК. На первой стадии провирусная ДНК подготавливается к интеграции с помощью отщепления интегразой 3'-концов. Интеграза остается связанной с провирусной ДНК в виде мультимерного преинтеграционного комплекса (ПИК), состоящего из обратной транскриптазы, матрицы, нуклеокапсида и вспомогательного белка Vpr, способствующего проникновению ПИК в клеточное ядро. Находясь в ядре, интеграза катализирует внедрение провирусной ДНК в хромосомы клетки-хозяина.

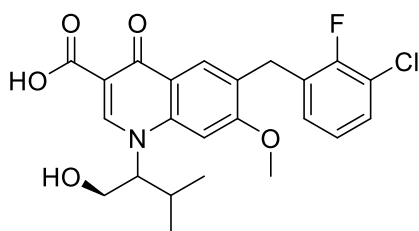
Перенос цепи ДНК состоит в лигировании 3'-ОН концов провирусной ДНК с 5'-фосфатами хромосомной ДНК, после чего клеточные ферменты завершают процесс интеграции восстановлением одноцепочечных разрывов между нитями, сшивая несцепленные 5'-концы вирусной ДНК, образуя таким образом стабильный провирус. Все ингибиторы протеаз нацелены на блокировку стадии переноса цепи путем распознавания и связывания со специфическим комплексом между интегразой и вирусной ДНК [67–74].



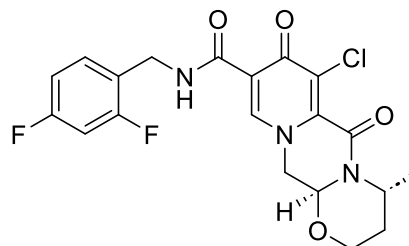
1.4.1



1.4.2



1.4.5



1.4.4

Схема 1.2.4.1 Ингибиторы интегразы.

Первые экспериментальные ингибиторы интегразы были разработаны в начале 1990-х годов, но их внедрение в клиническую практику заняло более десятилетия [75,76]. Дикетокислотоподобное (ДКА) соединение 5CITEP **1.4.1** (схема 1.1.4.1), синтезированное учеными из Shinogi, содержит тетразольную группу вместо карбоксила в ДКА. 5CITEP способен ингибировать как 3'-концевой процессинг, так и перенос цепи ДНК. Также был выделен комплекс 5CITEP с доменом каталитического ядра, что позволило получить первую кристаллическую структуру интегразы ВИЧ [77]. Впоследствии исследователями из Merck была открыта группа сильных ингибиторов

интегразы, наиболее активные из которых содержали ДКА-мотив, способный координировать ионы металлов к активному центру интегразы [23].

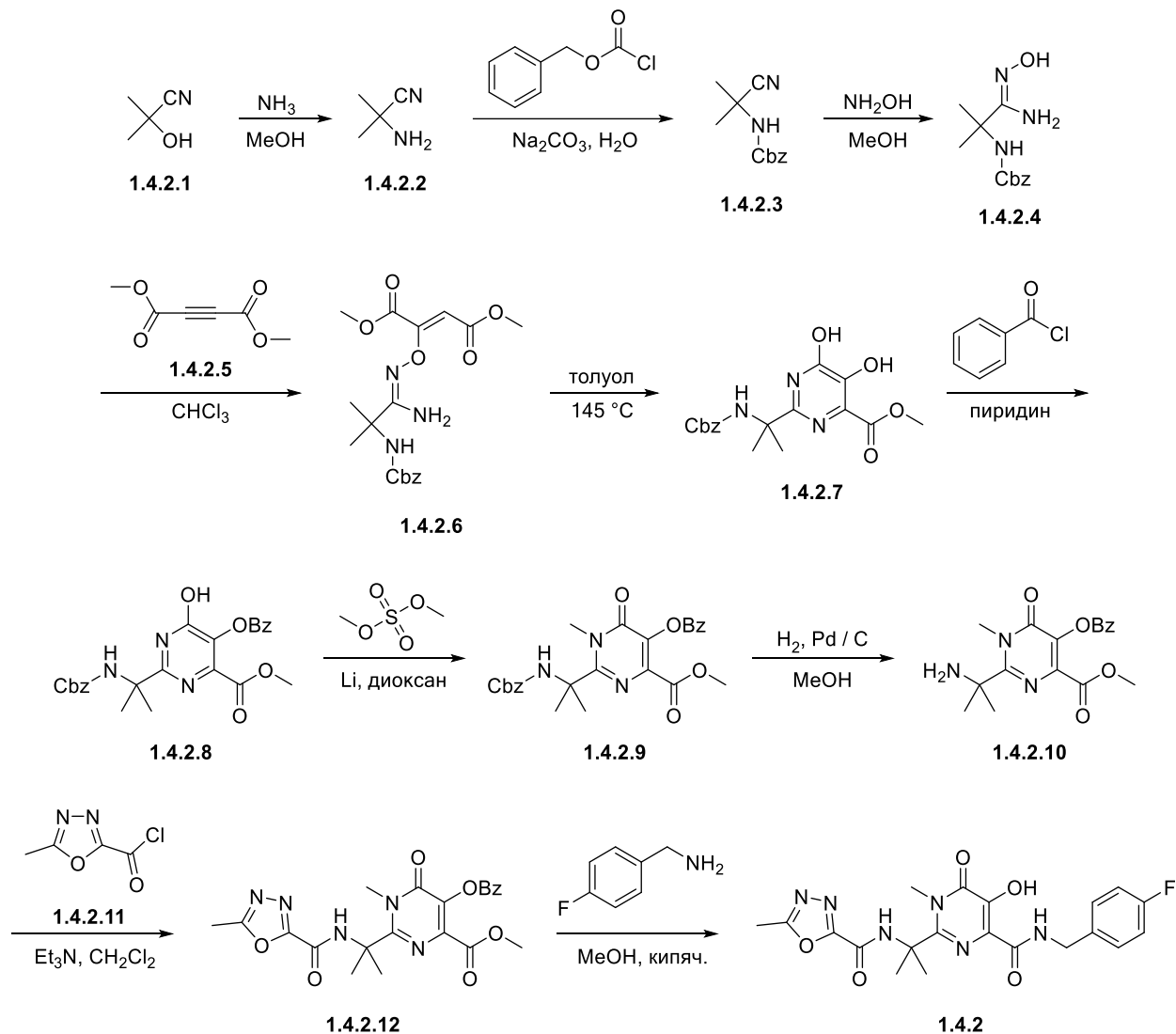


Схема 1.1.4.2 Синтез ралтегравира.

Ралтегравир **1.4.2** (схема 1.1.4.1) — первый одобренный к клиническому применению ИВИ. Он является селективным ингибитором переноса цепи и так же содержит в себе ДКА-мотив. В ходе проведенных клинических исследований было выявлено, что ралтегравир в сочетании с оптимизированной фоновой терапией обеспечивает к 48 неделе лучшую вирусную супрессию, чем одна только фоновая терапия [78]. В 2007 г. ралтегравир был одобрен для применения пациентам с резистентностью к

другим препаратам, а в 2009 г. — пациентам, не получающим других лекарственных средств.

Общий путь синтеза ралтегравира начинается с превращения цианогидрина ацетона **1.4.2.1** в аминонитрил **1.4.2.2** в условиях реакции Штреккера, который преобразуется в N-Cbz-защищенный интермедиат **1.4.2.3** под действием бензил хлорформиата в водном растворе карбоната натрия. Для получения амидоксима **1.4.2.4** к раствору **1.4.2.3** и гидроксида калия в метаноле прибавляют гидрохлорид гидроксиламина. Амидоксим **1.4.2.4** обрабатывают диметилацетиленодикарбоксилатом **1.4.2.5** в хлороформе с образованием **1.4.2.6**, который переносят в ксилол и нагревают при 145 °С в течение 48 ч для его циклизации в пиримидин-4-карбоксилат **1.4.2.7**. Полученное соединение бензоилируют бензоил хлоридом в пиридине с образованием **1.4.2.8**, который очищают флэш-хроматографией и N-метируют диметилсульфатом в диоксане с гидридом лития в качестве основания с образованием **1.4.2.9**. Соединение **1.4.2.9** затем гидрируют на 10% Pd/C с образованием N-незащищенного **1.4.2.10**, который ацилируют свежеприготовленным 5-метил-1,3,4,-оксодиазол-2-карбонил хлоридом **1.4.2.11** в присутствии триэтиламина в дихлорметане с образованием **1.4.2.12**. Наконец, кипячением **1.4.2.12** над *n*-фторбензиламином в метаноле в течение 16 ч получают искомый ралтегравир **1.4.2** (схема 1.1.4.2) [79–81].

Другим представителем ДКА-подобных ИВИ является элвитегравир **1.4.3** (схема 1.1.4.1), разработанный в Japan Tobacco и Gilead Sciences и одобренный к применению в 2012 г. Благодаря удачному фармакокинетическому профилю, схожему с таковым у ритонавира, стало возможным их совместное применение в однократной ежедневной дозировке, что значительно улучшает соблюдение пациентами режима приёма [82,83].

После начала активного применения ралтегравира было показано, что у пациентов, получавших содержащие его препараты, стали появляться

устойчивые мутации каталитического домена интегразы ВИЧ, включающие такие как Q148(H/R/K), E138(A/K), G140(A/S), T66A, Y143(C/R) и N155H, при этом Y143, N155 и Q148 определены как сигнатурные мутации. К примеру, наличие мутации Q148K совместно с E138K и G140A снижает восприимчивость к ралтегравирu более чем в 100 раз [68,84–86]. Хотя элвитегравир обеспечивает умеренный генетический барьер к появлению у интегразы резистентности, он также способен вызывать мутации T66I, E92Q и Q146P. Кроме того, были выявлены и другие мутации, обусловленные неудачным лечением препаратами на основе ралтегравира, которые приводят к перекрестной резистентности между ралтегравиром и элвитегравиром [87,88]. Подобная резистентность потребовала разработки нового поколения ИВИ.

Долутегравир **1.4.4** (схема 1.1.4.1) был разработан Shionogi & Co. Ltd. Совместно с ViiV Healthcare и вышел на рынок в 2013 г. Он продемонстрировал высокую противовирусную активность против устойчивых к ралтегравирu штаммов ВИЧ, выделенных из пациентов с вирусологической недостаточностью на фоне приема ралтегравира. Кроме того, фармакокинетические характеристики долутегравира поддерживают однократный ежедневный прием без дополнительного усиления ритонавиром [24,89]. Карбонильная группа при C5 карбоксамида делает структуру долутегравира более подвижной, позволяя ему лучше встраиваться в гидрофобный карман активного центра интегразы. Кроме того, сообщалось, что долутегравир способен перестраивать свое положение и конформацию в ответ на структурные изменения, вызванные мутациями в активном центре, обуславливающими резистентность к ралтегравирu [73,74,90,91].

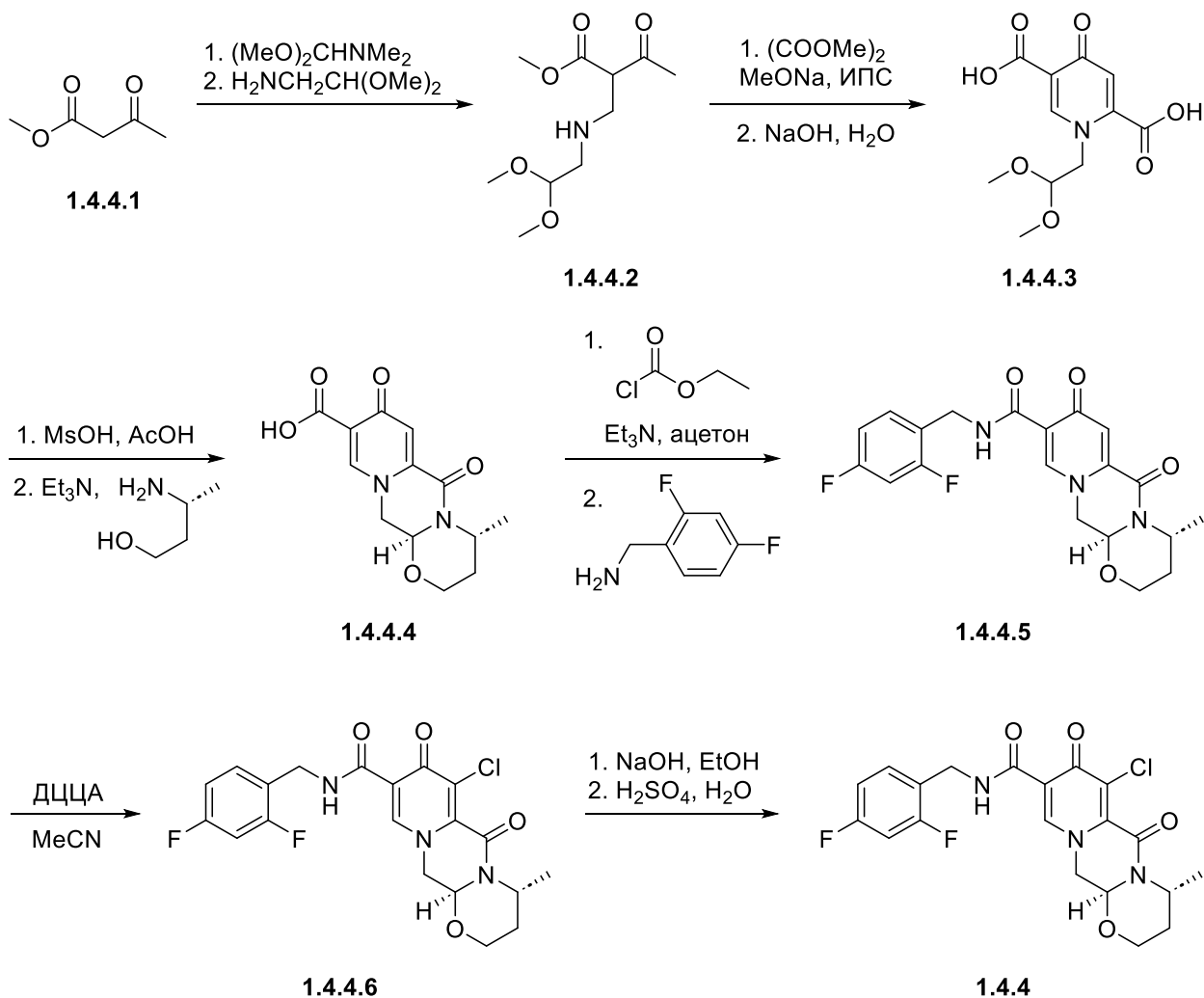


Схема 1.1.4.3 Синтез долутегавира.

Оптимальный путь синтеза долутегавира начинается с ацетоацетата **1.4.4.1**, который переводят в твердый интермедиат **1.4.4.2** «*one-pot*» реакцией с диметилацеталем ДМФА с последующим замещением диметилацеталем аминоацетальдегида. Полученный таким образом аминпропеноат **1.4.4.2** подвергают «*one-pot*» циклоприсоединению с диметил оксалатом в присутствии метилата натрия в изопропанол с последующим гидролизом водным гидроксидом натрия. Полученная таким образом кристаллическая карбоновая кислота **1.4.4.3** подвергается «*one-pot*» кислотнo-катализируемому деацетилированию и циклоклоприсоединению с (R)-3-аминобутанолом с образованием кристаллической трициклической карбоновой кислоты **1.4.4.4**. Амидирование **1.4.4.4** 2,4-дифторбензиламином с использованием

этилхлорформиата дает кристаллический **1.4.4.5**, который затем хлорируют ТХЦК в ацетонитриле с образованием кристаллического хлорпроизводного **1.4.4.6**. Последнее вводится в реакцию с гидроксидом натрия в этаноле, при этом выпадает нерастворимая в воде натриевая соль долутегравира, которая может быть выделена фильтрацией и использована в качестве активной субстанции. Альтернативно, долутегравир **1.4.4** может быть выделен из реакционной смеси в свободной форме обработкой водной кислотой (схема 1.1.4.3) [92]. В последние годы было предложено несколько альтернативных методов синтеза долутегравира в 6 и 3 стадии [93,94].

1.1.5 Ингибиторы слияния

Механизм прикрепления ВИЧ к клетке изучен достаточно подробно. Гликопротеин оболочки ВИЧ gp120 взаимодействует с белком оболочки клетки CD4 с изменением конформации, приводящим к дополнительному связыванию со вторым клеточным рецептором — хемокиновым CCR5 [31–35] или CXCR4 [36]. Параллельно с этим, конформационные изменения в gp120 высвобождают гликопротеин оболочки gp41, который проникает своим N-концом в клеточную мембрану, после чего конформационно переходит в пучок, образованный тримером N-концевой спиральной области (HR1), окруженным С-концевыми спиральными областями (HR2), ориентированными антипараллельно. Образование такой структуры приводит к сближению и последующему слиянию вирусной и клеточной мембран [40]. Расшифровка молекулярного механизма слияния побудило к разработке ингибиторов слияния (ИС), блокирующих проникновение ВИЧ воздействием на клеточные рецепторы CD4, CCR5, CXCR4 и вирусные белки gp120 и gp41.

К настоящему времени изучено несколько пептидов, ингибирующих конформационный переход gp41 в пучок путем связывания с областью HR1 [95]. Так, фрагмент HR2 области С34 (34-мер из нативной последовательности gp41 штамма NL4-3 ВИЧ) показал высокую ингибирующую активность к слиянию мембран [39].

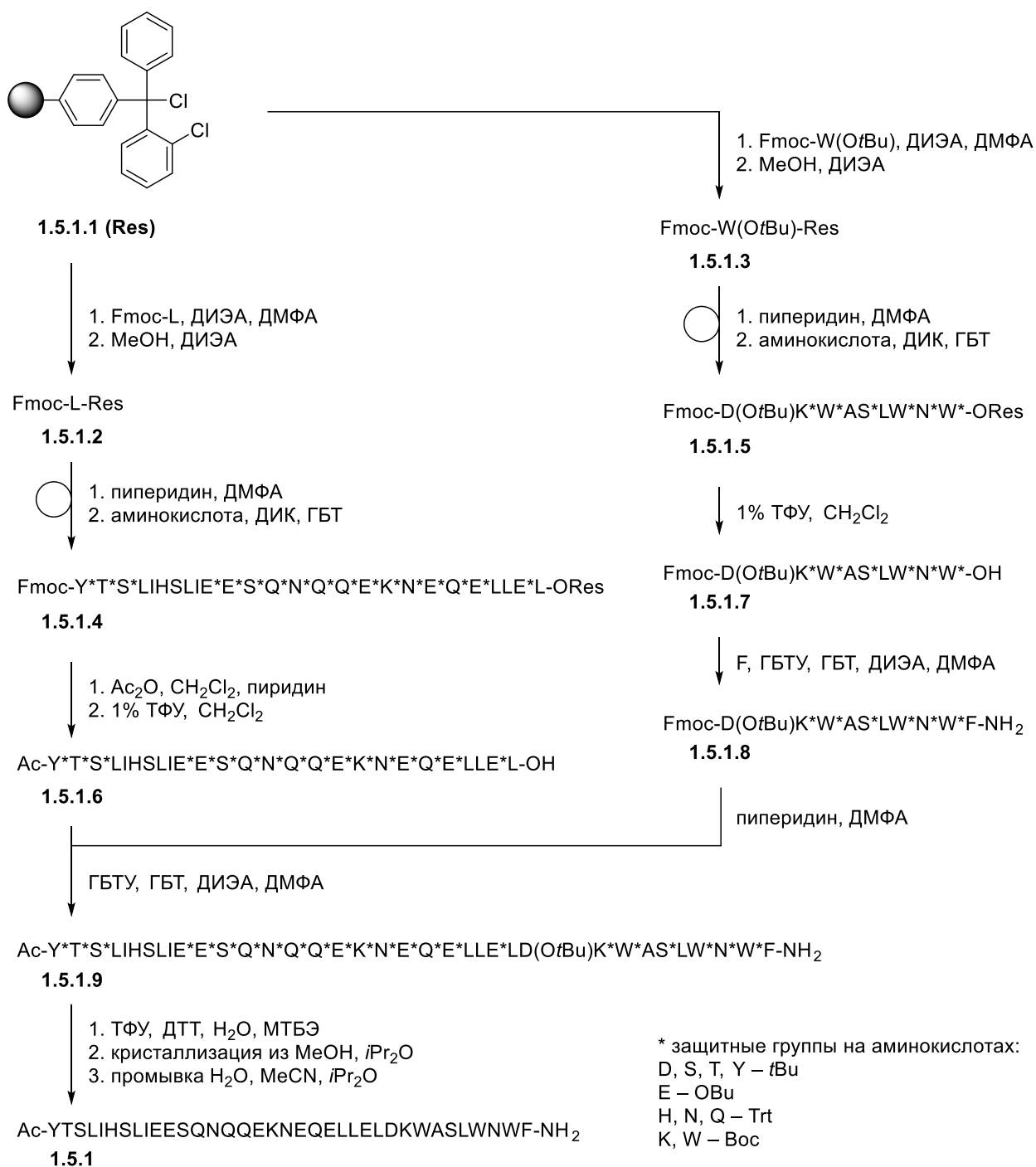


Схема 1.3.5.1 Синтез энфувертида.

Первый клинически используемый ИС Т20 (энфувертид) **1.5.1**, состоящий из 36 аминокислотных остатков, имеет общие 24 остатка с С34. Комбинированная терапия энфувиртидом с другими антиретровирусными препаратами была одобрена для лечения прогрессирующего заболевания ВИЧ у пациентов старше 6 лет с признаками репликации ВИЧ несмотря на текущую

терапию и резистентность к другим препаратам. Успех энфувертида подтолкнул к разработке ИС как целого нового класса препаратов против ВИЧ как пептидной [96–98], так и низкомолекулярной [99–101] природы.

В настоящее время энфувертид промышленно получают твердофазным пептидным синтезом (схема 1.1.5.1). На первой стадии к предварительно выдержанной в дихлорметане 2-хлортритилхлоридной смоле **1.5.1.1** добавляют Fmoc-защищенную аминокислоту и основание Хунига в диметилформамиде, перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре, фильтруют и промывают диметилформамидом и дихлорметаном, добавляют смесь основания Хунига и метанола в дихлорметане, перемешивают в течение 30 мин, промывают диметилформамидом и дихлорметаном и высушивают в вакууме, получая загруженную смолу **1.5.1.2** и **1.5.1.3**. На второй стадии загруженную смолу выдерживают в диметилформамиде, снимают защитную Fmoc-группу раствором пипиридина в диметилформамиде, проводят сочетание с Fmoc-защищенной аминокислотой в присутствии диизопропилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола и тщательно промывают диметилформамидом. Вторую стадию повторяют до получения нанесенных на смолу пептидов требуемой последовательности **1.5.1.4** и **1.5.1.5**. В нанесенном пептиде **1.5.1.4** производят замену защитной группы уксусным ангидридом в смеси хлористого метилена и пиридина, после чего оба нанесенных пептида снимают со смолы раствором трифторуксусной кислоты в дихлорметане с получением свободных пептидов **1.5.1.6** и **1.5.1.7**. Затем реакцией **1.5.1.7** с фенилаланином в присутствии (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфата, диизопропилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола в диметилформамиде получают пептид **1.5.1.8**, который после снятия защитной Fmoc-группы раствором пипиридина в диметилформамиде сочетают с пептидом **1.5.1.6** в присутствии (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфата, диизопропилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола в

диметилформамиде с образованием защищенного энфувертида **1.5.1.9**, который после снятия защитных групп с аминокислотных остатков смесью трифторуксусной кислоты, воды и дитиотриэтола, промывки изопропиловым эфиром, водой, ацетонитрилом и изопропиловым эфиром и последующей сушки дает искомый энфувертид **1.5.1** [102]. Вследствие трудоемкости, низкого выхода и высокой стоимости твердофазного синтеза энфувертида, более перспективным выглядит его биохимический синтез, например в виде фузеонного белка, экспрессируемого в *e. coli*, с его последующим гидролизом бромцианом [103].

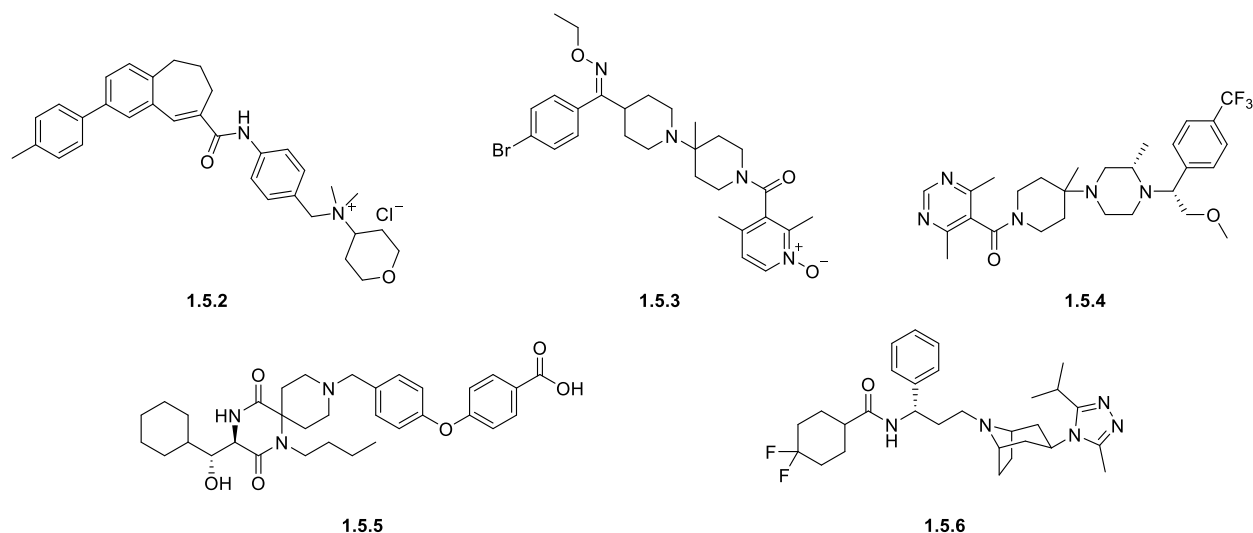


Схема 1.4.5.2 Низкомолекулярные ингибиторы слияния.

Трансмембранные белки CCR5 и CXCR4 относятся к классу рецепторов, сопряженных с G-белком (так же известных как семиспиральные рецепторы). CCR5 служит в качестве одного из двух основных корецепторов для проникновения ВИЧ в CD4-положительные лимфоциты [28,29,31,32,35,36], представляя таким образом привлекательную мишень для потенциального предотвращения инфицирования.

Низкомолекулярный ИС связывается с самой большой гидрофобной полостью между внеклеточными петлями и верхними трансмембранными доменами CCR5. Изначально предполагалось, что подобное связывание низкомолекулярного ингибитора с CCR5 вызовет в последнем

аллостерические изменения, приводящие к потере связывания с gp120 ВИЧ. Однако недавние исследования с использованием криоэлектронной микроскопии показали, что петля V3 gp120 взаимодействует непосредственно с аминокислотными остатками в полости связывания ингибитора CCR5, расположенной внутри трансмембранной области. Таким образом, механизм действия низкомолекулярных ИС на CCR5 предполагает конкурентное ингибирование [27].

Первый экспериментальный низкомолекулярный ингибитор CCR5 — ТАК779 **1.5.2** (схема 1.1.5.2) — был синтезирован в 1999 году [25]. Впоследствии несколько соединений были разработаны в качестве противовирусных препаратов [26,104–106]. SCH-C **1.5.3** и викривирок **1.5.4** (схема 1.5.2) являются пероральными биодоступными ингибиторами CCR5 с существенной противовирусной активностью [104,105]. Викривирок, обладающий большей по сравнению с SCH-C *in vitro* активностью, был направлен на клинические исследования. Несмотря на снижение на 1.5 порядка вирусной нагрузки в плазме крови во время IIb фазы клинических исследований, в исследованиях III фазы, в которых принимали участие лица без опыта лечения, не наблюдалось статистически значимой разницы между группами викривирока и плацебо по прошествии 48 недель, вследствие чего дальнейшая его разработка была прекращена в 2010 г.

Производное спиродикетопиперазина аплавирок **1.5.5** (схема 1.1.5.2), разработанный в 2004 г. [106], обладает высоким сродством к CCR5 ($K_D \approx 3 \text{ нМ}$), блокирует связывание gp150 с CCR5 и проявляет *in vivo* выраженную активность против широкого спектра изолятов R5-тропных ВИЧ, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. Однако, после возникновения у нескольких пациентов идиосинкразической гепатотоксичности 4 класса его клинические испытания были вскоре прекращены [107–109].

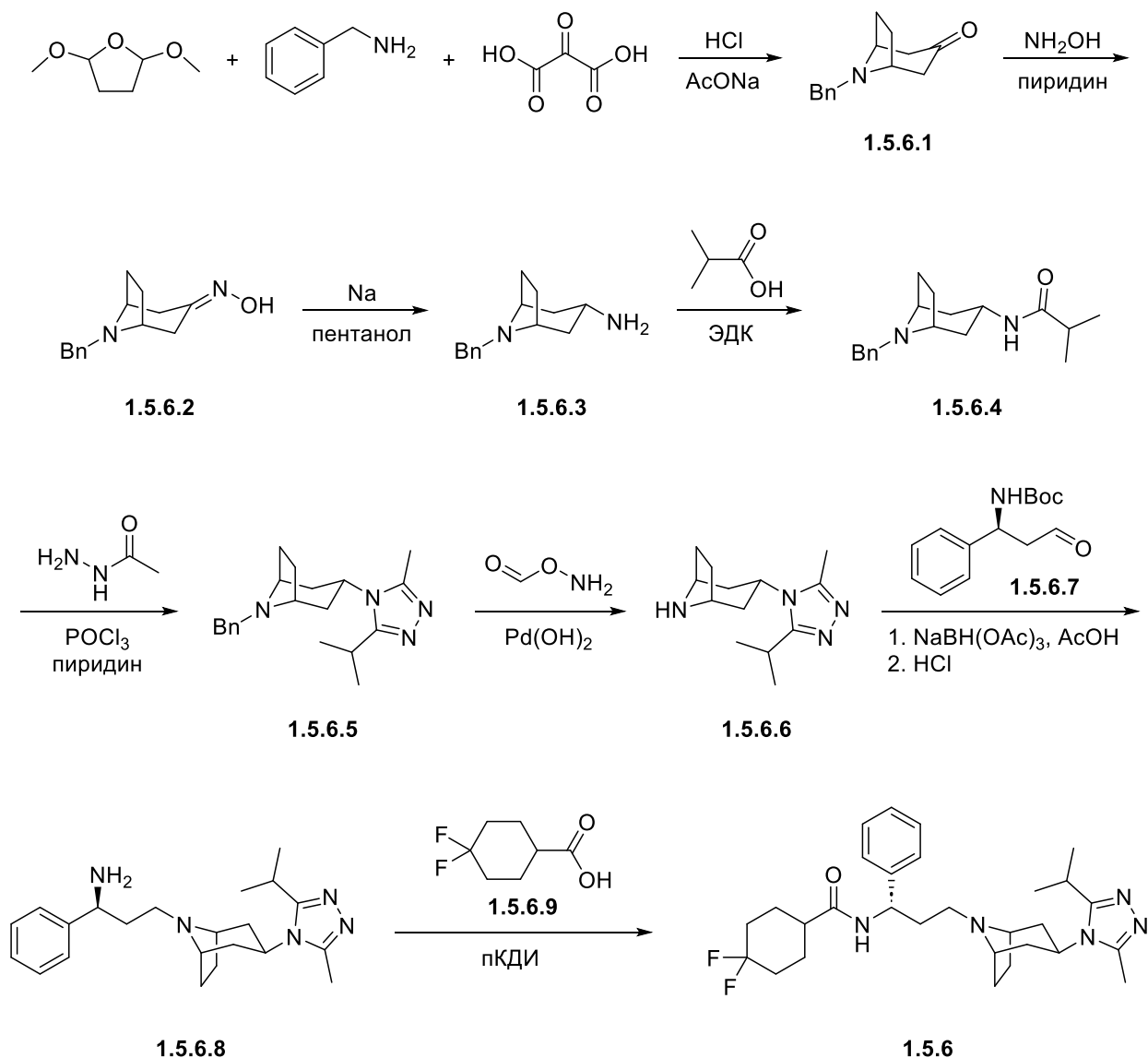


Схема 1.1.5.3 Синтез маравирока.

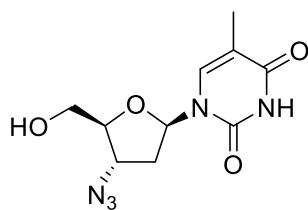
Первым одобренным к применению низкомолекулярным ингибитором CCR5 стал маравирик **1.5.6** (схема 1.1.5.2), показавший в ходе клинических испытаний превосходный вирусологический ответ на R5 штаммы [110,111]. Кроме того, было показано, что к нему не развивается существенной резистентности, а наблюдаемая у группы пациентов в ходе клинических исследований вирусологическая недостаточность была вызвана главным образом распространением уже ранее существовавшего у пациентов X4-штама, который не был выявлен в результате анализа тропизма [112].

На первой стадии синтеза маравирока реакцией Робинсона-Шепфа получают тропинон **1.5.6.1**, реакция которого с гидроксиламином в пиридине дает оксим **1.5.6.2**. Его восстановление натрием в пентаноле при кипячении приводит к селективному образованию первичного *экзо*-амин **1.5.6.3**, на котором в две стадии формируют 1,2,4-триазольный цикл с образованием **1.5.6.5** и последующим снятием защитной бензильной группы в условиях трансферного гидрирования. Полученный таким образом тропинонтриазол **1.5.6.6** вводят в реакцию восстановительного аминирования с альдегидом **1.5.6.7** с последующим снятием *трет*-бутильной защитной группы с образованием амина **1.5.6.8**, который ацилируют 4,4-дифторциклогексилкарбоновой кислотой **1.5.6.9** в присутствии полимерного карбодиимида, получая искомый маравирик **1.5.6** (схема 1.1.5.3) [113].

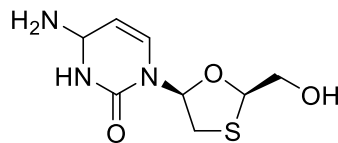
В настоящее время маравирик и энфувертид являются единственными одобренными к клиническому применению ИС. Разработка других ИС, к примеру, использующих CXCR4 в качестве мишени, должна повысить полезность ингибиторов CCR5 как для лечения, так и для профилактики ВИЧ.

1.1.6 Ингибиторы обратной транскриптазы

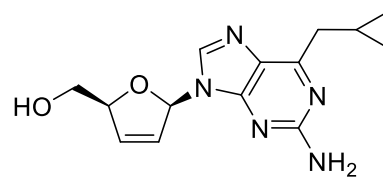
Обратная транскриптаза ВИЧ — ДНК-полимераза, преобразующая одноцепочечную вирусную РНК в двуцепочечную провирусную ДНК, которая затем встраивается в геном клетки-хозяина. ОТ представляет из себя гетеродимер, состоящий из двух субъединиц размером 51 кДа (p51) и 66 кДа (p66). Структурно ОТ можно сравнить с человеческой кистью. Домен «ладони» содержит в себе каталитический центр, на котором происходит полимеризация ДНК. Гибкие домены «пальцев» при этом складываются вокруг нуклеиновой кислоты, образуя полость, в которой размещается праймер-шаблон для синтеза ДНК. Соединительный домен в субъединице p66 связывает активный центр ОТ с доменом рибонуклеазы Н [114,115].



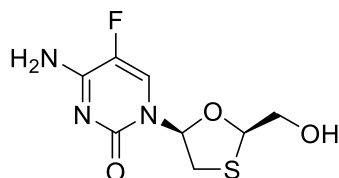
1.6.1



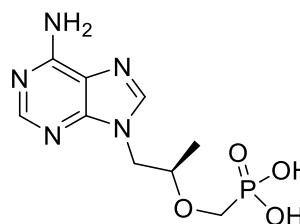
1.6.2



1.6.3



1.6.4



1.6.5

Схема 1.1.6.1 Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

Первый в истории одобренный препарат против ВИЧ зидовудин **1.6.1** [13] является синтетическим аналогом нуклеозидов так же, как и ряд других ранних препаратов [42,116] (схема 1.1.6.1). В подобных нуклеозидных аналогах отсутствует 3' гидроксил в рибозном фрагменте, что позволяет ОТ отличать их от физиологических дезоксинуклеотидтрифосфатов. Таким образом, механизм действия нуклеозидных ИОТ сочетает в себе как конкурентное ингибирование, так и терминацию полимеризации после встраивания препарата в синтезируемую ДНК [43,117–119]. Как правило, нуклеозидные ОТ переходят в активную фосфорилированную форму уже после проникновения в клетку.

Резистентность к нуклеозидным ИОТ развивается по двум механизмам:

(I) увеличение дискриминации между нативными дезоксинуклеотидтрифосфатами и ингибитором, что приводит к снижению инкорпорирования последнего и (II) АТФ-опосредованное отщепление инкорпорированного ингибитора, что приводит к обратимости терминации реакции полимеризации.

К примеру, связываемая с первым механизмом мутация Q151M приводит к образованию стойкой перекрестной резистентности к нуклеозидным ИОТ [120]. Штаммы, резистентные к нуклеозидным ИОТ, часто

одновременно с Q151M содержат мутации по A62, V75, F77 и F116. Потеря амидной группы вследствие Q151M приводит к разрушению цепи водородных связей, необходимых для позиционирования 3' гидроксила инкорпорируемого субстрата. Однако, нуклеозидные ОТ, не содержащие 3' гидроксил, более чувствительны к изменениям в сети водородных связей, вследствие чего селективность инкорпорирования смещается в сторону нативных дезоксинуклеотидтрифосфатов [121]. К другим значимым мутациям относятся M184V/I, обеспечивающая высокую резистентность к ламивудину **1.6.2** и эмтрицитабину **1.6.4** [122–127], и K65R, обеспечивающая резистентность к ламивудину **1.6.2**, абакавиру **1.6.3** и тенофовиру **1.6.5** [128–132].

АТФ-опосредованное отщепление инкорпорированного ингибитора представляет собой еще один механизм, реализуемый вследствие комбинации мутаций тимидиновых аналогов M41L, D67N, K70R, T215Y/F и K219Q/E/N [133] и приводящий к развитию сильно выраженной резистентности к абакавиру **1.6.3** и слабой перекрестной резистентности [134–136].

Одним из наиболее часто используемых антиретровирусных препаратов является тенофовир **1.6.5** (в пролекарственном виде его дизопроксила), применяемый, как правило, в сочетании с эмтрицитабином **1.6.4**. Его промышленный синтез основан на конденсации аденина **1.6.5.1** с *R*-пропиленкарбонатом в ДМФА в присутствии гидроксида натрия в качестве основания, в ходе которой образуется (*R*)-9-(2-гидроксипропил)-аденин **1.6.5.2**, который затем сочетают с тозилированным гидроксиметилфосфанатом **1.6.5.3** под действием *трет*-бутилата лития в ТГФ, получая после остановки реакции уксусной кислотой в смеси хлористого метилена и воды диэтилфосфанатový эфир **1.6.5.4**. Последний под действием избытка триметилсилилбромиды в ацетонитриле при кипячении дает искомый тенофовир **1.6.5** (схема 1.1.6.2) [137,138].

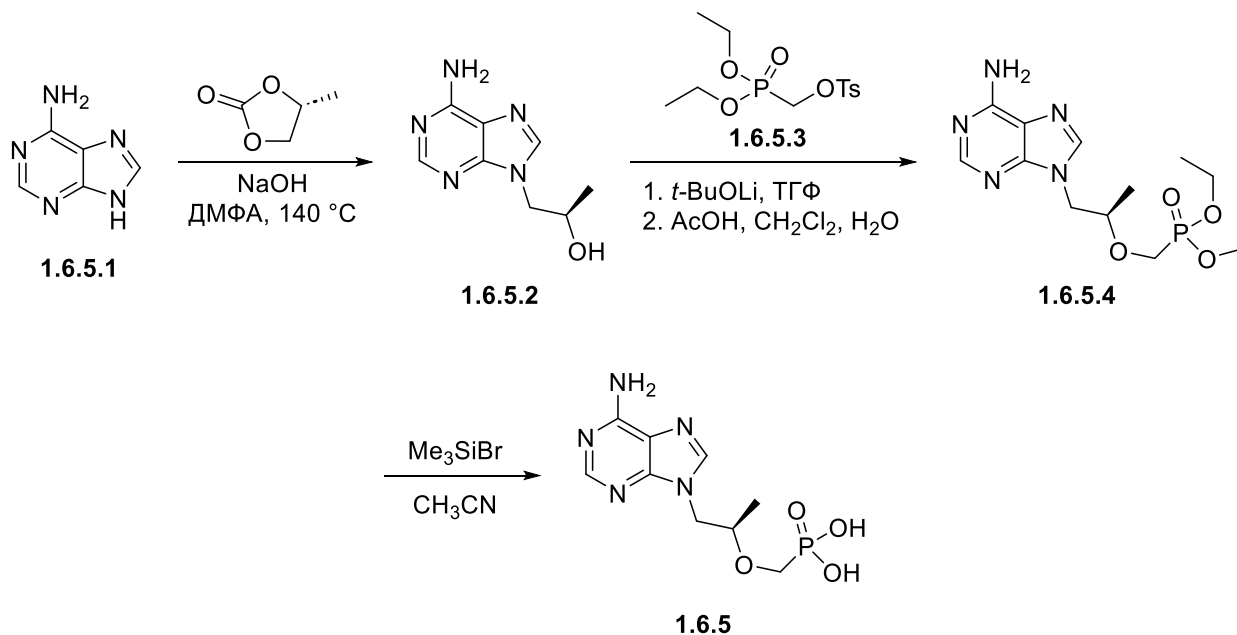


Схема 1.1.6.2 Синтез тенофовира.

Альтернативный подход реализуется в ненуклеозидных ИОТ (схема 1.1.6.3), представляющих из себя химически многообразный набор соединений, связывающихся с гидрофобным карманом, расположенным в 10 Å от полимеразного активного центра ОТ [139]. Ненуклеозидные ИОТ не блокируют связывание праймера или дезоксинуклеотидтрифосфата с ОТ напрямую, а изменяют геометрию ОТ, вызывая смещение праймера относительно активного центра, предотвращая таким образом инкорпорацию дезоксинуклеотидтрифосфата [140,141]. В отличие от нуклеозидных, ненуклеозидные ИОТ не способны ингибировать ОТ других лентивирусов, таких как ВИЧ-2 и вирус иммунодефицита обезьян [114,142].

К первому поколению ненуклеозидных ИОТ относятся такие препараты как невирапин **1.6.6**, эфавиренз **1.6.7** и доравирин **1.6.8**. Гидрофобный карман, с которым связываются эти соединения, образуется из гидрофобных остатков, таких как Y181 и Y188, и гидрофильных остатков, таких как K101, K103 и D192 субъединицы р66 и E138 субъединицы р51 [143]. Соответственно, мутации Y181C и K103N часто приводят к перекрестной резистентности ко многим ненуклеозидным ИОТ [144]. Для решения этой

проблемы с применением методов молекулярного моделирования продолжают разрабатываться ненуклеозидные ИОТ второго поколения, такие как этравирин **1.6.9** и рилпивирин **1.6.10**.

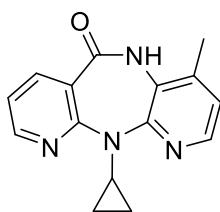
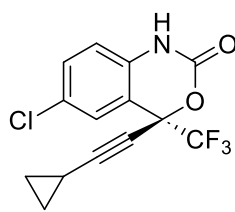
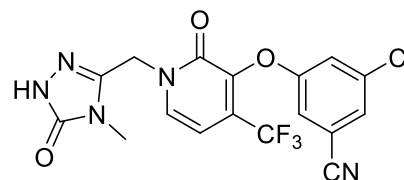
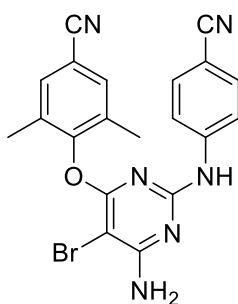
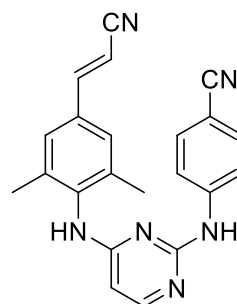
**1.6.6****1.6.7****1.6.8****1.6.9****1.6.10**

Схема 1.1.6.3 Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

Последний обладает высоким генетическим барьером для формирования резистентности, так как для обеспечения значимой вирусной устойчивости к нему требуется несколько одновременных мутаций [145–147].

Синтез рилпивирина осуществляется сочетанием аминодиметилфенилакрилонитрила **1.6.10.4** с производным аминопиримидина **1.6.10.7**. На первой стадии в условиях инертной атмосферы проводят реакцию Хека между 4-бром-2,6-диметиланилином **1.6.10.1** и акриламидом с образованием (2*E*)-3-(4-амино-3,5-диметилфенил)проп-2-енамида **1.6.10.2**, дегидрированием которого оксихлоридом фосфора получают соответствующий нитрил **1.6.10.3**. Обработкой последнего соляной кислотой в диизопропиловом эфире в условиях инертной атмосферы получают первый полупродукт **1.6.10.4** с общим выходом 51%.

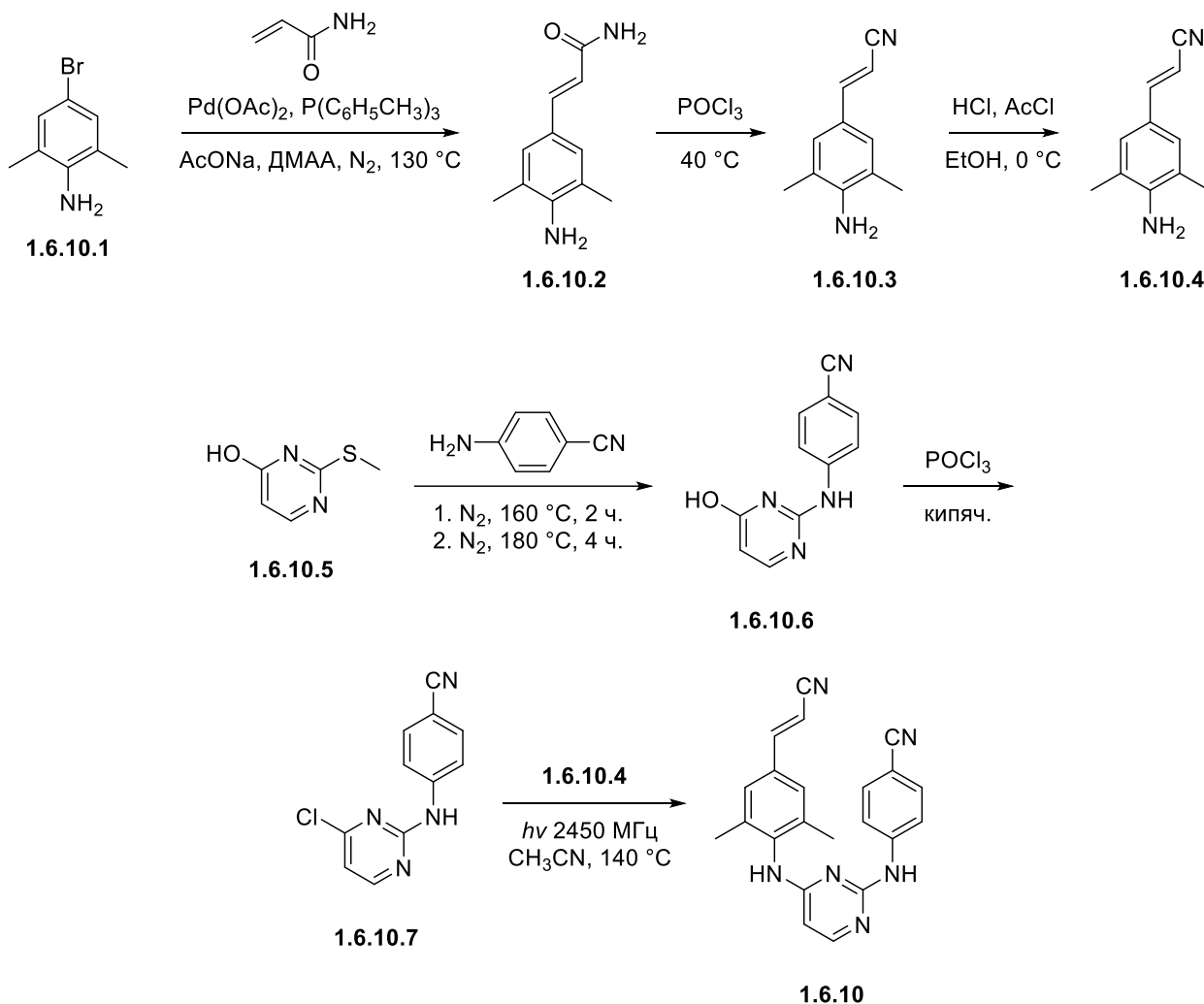


Схема 1.1.6.4 Синтез рилпивирина.

На второй стадии сочетанием в расплаве в инертной атмосфере 2-(метилтио)-4(3Н)-пиримидинона **1.6.10.5** с *n*-аминобензонитрилом получают гидроксиаминопиримидин **1.6.10.6**, который переводят во второй полупродукт **1.6.10.7** кипячением с оксихлоридом фосфора с общим выходом 62%. Наконец, реакцией нуклеофильного замещения между полупродуктами **1.6.10.4** и **1.6.10.7**, осуществляемой через микроволновое облучение в ацетонитриле, получают искомый рилпивирин **1.6.10** с выходом 71% и общим выходом 21% (схема 1.1.6.4) [148].

1.2 Препараты против вируса гриппа

1.2.1 Общие сведения

Несмотря на множество успешных противовирусных исследований, вирус гриппа продолжает представлять серьезную угрозу здоровью населения вследствие своей высокой заболеваемости и смертности [149–152]. По данным Всемирной организации здравоохранения сезонные эпидемии гриппа затрагивают 3–5 млн человек, приводя к 290–650 тыс. смертей [153]. Появление в последние годы агрессивные штаммы H1N1, H5N1 и H7N9 лишь подчеркивает необходимость разработки новых терапевтических стратегий для борьбы с этим патогеном [154]. Вакцины и противовирусные препараты необходимы для ослабления негативного влияния вируса гриппа [155,156]. Вследствие высокой вариативности гриппа представляется, что противовирусные препараты будут эффективнее вакцин для предотвращения высококонтагиозного инфицирования и лечения эпидемий.

Вирус гриппа — антисмысловой одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к семейству *Orthomyxoviridae* [157] и в зависимости от его нуклеопротеинов и антигенных детерминантов матричных белков подразделяется на четыре отличительных типа: А, В, С и D (последний не инфицирует человека [158]). Типы А и В высокоинфекционны, в то время как тип С, по-видимому, не вызывает значительной заболеваемости [150]. Пандемические вспышки вызываются типом А, поэтому им уделяется больше внимания.

1.2.2 Строение и жизненный цикл вируса гриппа

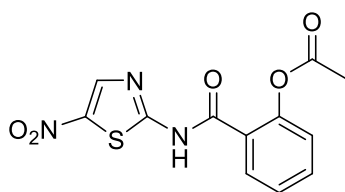
Вирион гриппа имеет сферическую форму и состоит из трех мотивов: ядра, матричного белка и вирусной оболочки [159]. Тип А состоит из белков, кодируемых 8 сегментами антисмысловой одноцепочечной РНК [157,160]: гемагглютинаина (НА), нейраминидазы (НА), нуклеокапсидного белка (NP), РНК-полимеразы (комплекс из PA, PB1, PB2), матричного протеина (M1), протонного канала (M2), белка ядерного экспорта (NEP) и др. [157,161–163]. В

зависимости от вариаций в составе НА (Н1–Н18) и NA (N1–N11) тип А классифицируется на 162 подтипа [164].

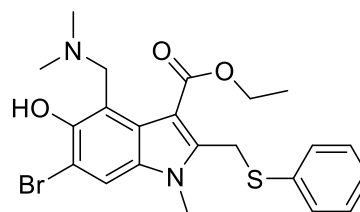
Жизненный цикл вируса гриппа может быть разделен на следующие этапы: прикрепление вириона к клеточной мембране; эндосомальная интернализация вируса в клетку; раскрытие вируса, цитоплазматический транспорт и внедрение вирусных рибонуклеопротеинов в ядро; транскрипция и репликация вирусной РНК; ядерный экспорт и синтез вирусных белков; сборка новых вирионов, их отпочковывание и высвобождение из клеточной мембраны. Вирусные белки и белки клетки-хозяина, непосредственно участвующие в жизненном цикле вируса, являются привлекательными противовирусными мишенями [157,165,166].

1.2.2 Ингибиторы гемагглютенина

Гемагглютенин (НА) состоит из трех идентичных структурных субъединиц [150] и выполняет две важные функции во внедрении вируса. Во-первых, НА обеспечивает связывание между вирусом и поверхностью целевой клетки-хозяина. Во-вторых, НА запускает интернелизацию вируса через слияние вирусной оболочки с эндосомальной мембраной клетки-хозяина. В качестве мишени НА использует сиаловую кислоту — типичный терминальный остаток гликанов мембраны клеток верхних дыхательных путей и легких [150].



2.2.1



2.2.2

Схема 1.2.2.1 Ингибиторы гемагглютенина.

Нитазоксанид **2.2.1** (схема 1.2.2.1), первоначально разработанный и поступивший в продажу как противопротозойное средство, впоследствии был признан противовирусным препаратом широкого спектра действия и был

перепрофилирован для лечения гриппа. Он способен ингибировать широкий спектр вирусов типов А и В, включая H1N1 и H7N9, в том числе штаммы, устойчивые к ингибиторам нейраминидазы. Нитазоксанид также подавляет репликацию широкого спектра других РНК- и ДНК-вирусов, включая респираторно-синцитиальный вирус, парагрипп, коронавирус, ротавирус, норовирус, гепатит В, гепатит С, денге, желтую лихорадку, вирус японского энцефалита и ВИЧ в клеточных культурах. Его механизм действия против вирусов гриппа заключается в блокировании созревания гемагглютенина на посттрансляционной стадии [167,168].

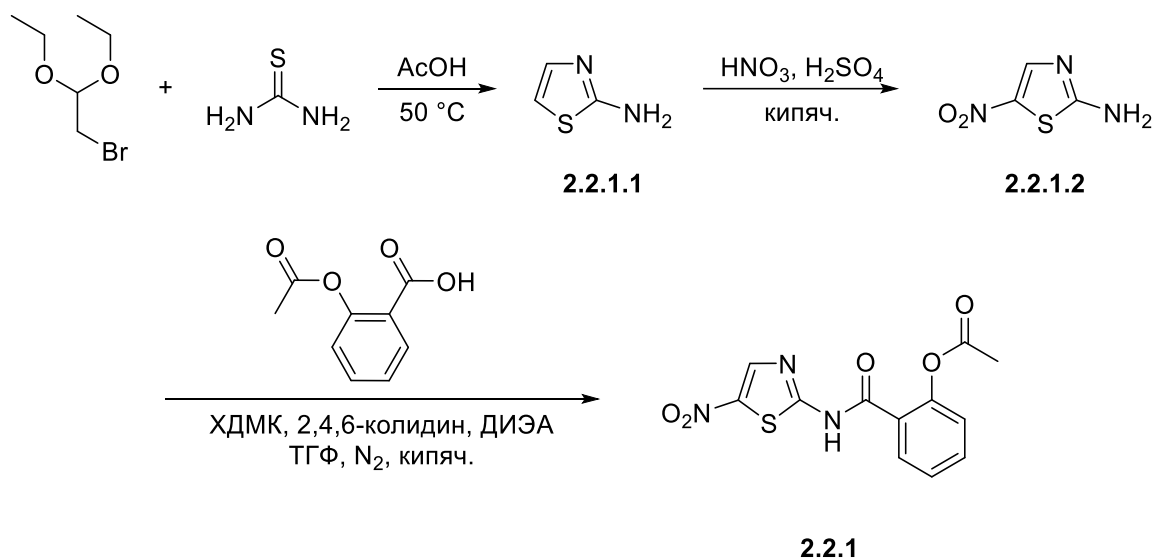


Схема 1.2.2.2 Синтез нитазоксанида.

Синтез нитазоксанида (схема 1.2.2.2) начинается с приготовления замещенного триазола **2.2.1.1** по Ганчу из диэтилацеталь бромацетальдегида и тиомочевины с выходом 86% и его дальнейшим нитрованием по методу Дикеля [169] с образованием нитропроизводного **2.2.1.2** с выходом 56%. На последней стадии производят сочетание последнего с ацетилсалициловой кислотой в присутствии трифосгена, колидина и основания Хунига в тетрагидрофуране при кипячении в инертной атмосфере с образованием искомого нитазоксанида **2.2.1** с выходом 54% [170].

Умифеновир **2.2.2** (схема 1.2.2.1) считается ингибитором различных оболочечных и необолочечных РНК-вирусов, включая штаммы гриппа. Предполагаемый способ действия действия умифеновира основан на его встраивании в мембранные липиды, что приводит к ингибированию слияния мембран между вирусными частицами и плазматическими мембранами, а также препятствует слияния вирусных частиц с мембранами эндосом. В штаммах гриппа умифеновир взаимодействует с гемагглютинином, повышая его стабильность и предотвращая его переход в состояние слияния [171,172].

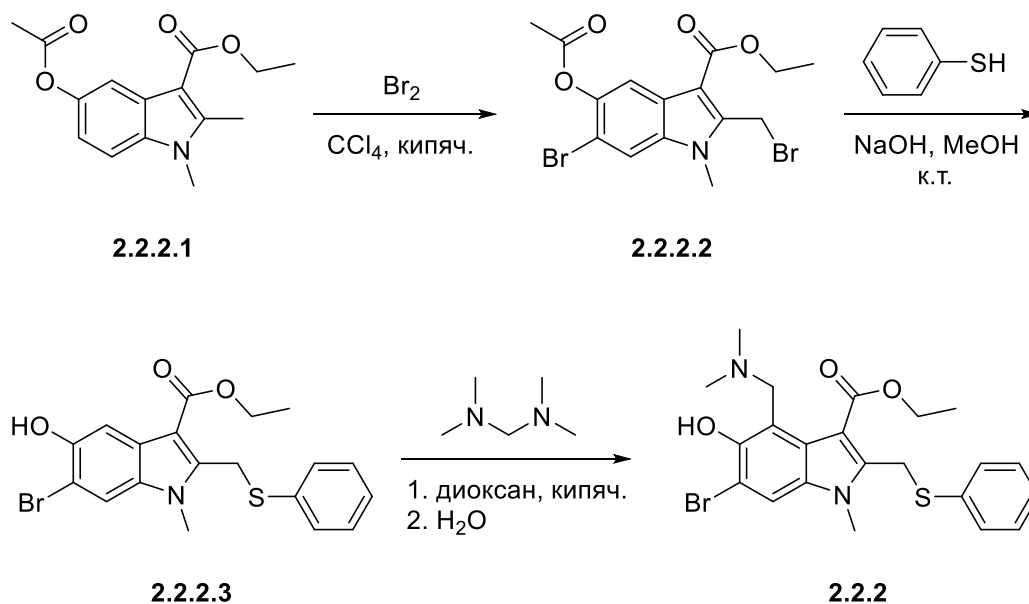


Схема 1.2.2.3 Синтез умифеновира.

На первой стадии синтеза умифеновира (схема 1.2.2.3) этиловый эфир замещенной индолкарбоновой кислоты **2.2.2.1** бродируют в четыреххлористом углероде с образованием бромида **2.2.2.2** с выходом 87%, который затем конденсируют с получаемым *in situ* тиофенолятом натрия (с параллельным снятием ацетильной защиты в условиях щелочного гидролиза), получая соединение **2.2.2.3** с выходом 96%. Последнее подвергают аминометилированию бис-диметиламинометаном с образованием искомого умифеновира **2.2.2** с выходом 70% [173].

1.2.3 Ингибиторы нейраминидазы

Нейраминидаза (NA) состоит из четырех идентичных субъединиц и закреплена на поверхности вирусной оболочки [174]. Функция NA состоит в отщеплении терминальной сialовой кислоты гликана, за который новосформировавшийся вирион прикреплен к клеточной мембране. Таким образом, ингибирование NA приводит к предотвращению высвобождения вируса из инфицированной клетки [175,176].

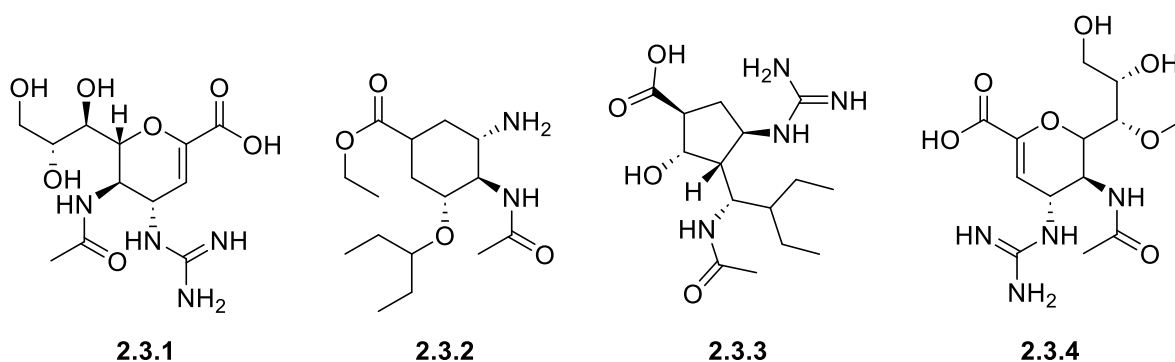


Схема 1.2.3.1 Ингибиторы нейраминидазы.

Первым одобренным для клинического применения ингибитором NA является Занамивир **2.3.1** (схема 1.2.3.1) [177]. Он эффективен как против типа А (Сингапур/1/57), так и против типа В (Виктория/102/85) со значениями IC₅₀ 14 и 5 нМ соответственно, но отличается крайне низкой (2–3 %) биодоступностью.

На первой стадии синтеза занамивира δ-глюконолактон последовательно обрабатывают метанолом в присутствии ПТСК и 2,2-диметоксипропаном с образованием соединения **2.3.1.1** с выходом 86%. Эфирная группа в **2.3.1.1** затем восстанавливается алюмогидридом лития, после чего образовавшийся диол окислительно расщепляют периодатом натрия с образованием альдегидного интермедиата, который, в свою очередь, вводят в реакцию с (R)-*трет*-бутилсульфинамидом в присутствии тетраэтилата титана с образованием хирального сульфинилимина **2.3.1.2** с общим выходом 80% после хроматографической очистки. Ассиметрическая

реакция аза-Анри с нитрометаном в присутствии ТБАФ в качестве катализатора приводит к образованию продукта присоединения **2.3.1.3** с количественным выходом исключительно в (5R)-конфигурации, который затем алкилируют этил 2-(бромметил)акрилатом в присутствии избытка триэтиламина в ТГФ с образованием эквимольной смеси **2.3.1.4a** (4S, 5R) и **2.3.1.4b** (4R, 5R) диастереомеров с общим выходом 96%, экстракцией из которой н-гексаном получают чистый **2.3.1.4a**, при этом длительное нагревание **2.3.1.4b** с избытком триэтиламина в ТГФ приводит к существенной эпимеризации, что позволяет повысить общий выход **2.3.1.4a**.

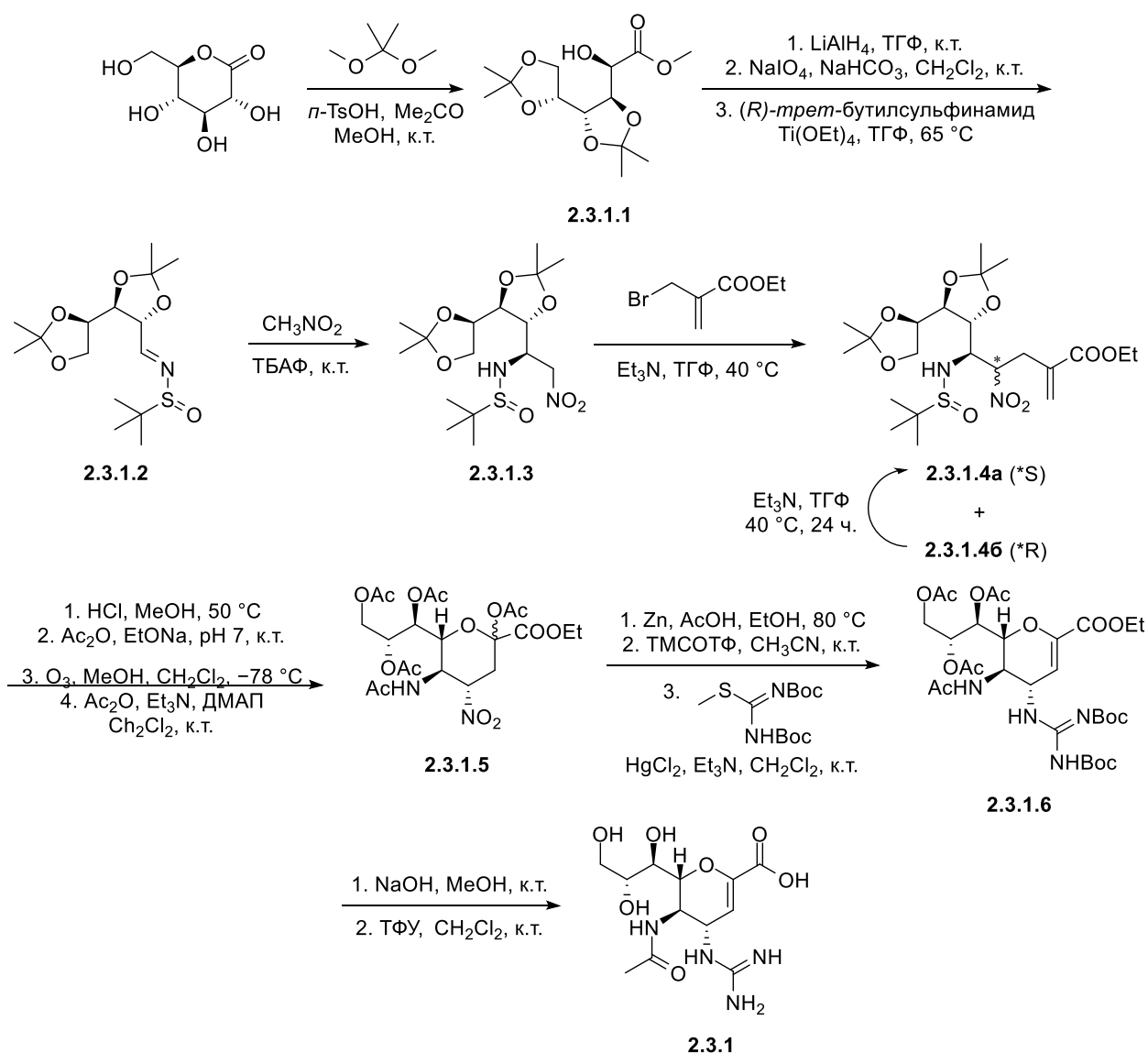


Схема 1.2.3.2 Синтез занамивира.

Затем ацетальная и сульфиниминовая группы в **2.3.1.4a** подвергаются кислотному гидролизу в 12М соляной кислоте в метаноле, свободная аминогруппа ацетируется уксусным ангидридом в присутствии этилата натрия, после чего продукт реакции без предварительной очистки подвергается озонолизу, образующаяся в ходе которого α -оксо эфирная группа подвергается атаке со стороны гидроксила при C6 с образованием тетрагидрофуранового кольца, после чего оставшиеся свободные гидроксилы ацетируются уксусным ангидридом в дихлорметане в присутствии триэтиламина и ДМАП с образованием сохраняющего 4S-конфигурацию защищенного сиалозида **2.3.1.5** с общим выходом 55%. Затем нитрогруппа в **2.3.1.5** восстанавливается активированным цинком в горячей уксусной кислоте в этаноле с последующим элиминированием уксусной кислоты при помощи ТМСОТФ с образованием дигидропиранового ядра, после чего проводят гуанидинирование 1,3-бис(*трет*-бутоксикарбонил)-2-метилтиопсевдо- мочевиной в присутствии хлорида ртути (II) с образованием **2.3.1.6** с выходом 67%. Омылением **2.3.1.6** с последующим удалением защитных групп ТФУ дает искомым занамивир **2.3.1** с выходом 95% (схема 1.2.3.2) [178].

Синтезированный на основе анализа трехмерной структуры комплекса занамивира с NA (N9) [179] озельтамивир **2.3.2** (схема 1.2.3.1) отличается увеличенной биодоступностью [180]. Его активность по отношению к репрезентативным NA (N3–N9) варьируется в пределах от 0,3 нМ до 1,5 нМ. Озельтамивир на сегодняшний день является наиболее популярным ингибитором NA. Следует так же отметить, что занамивир и озельтамивир эффективны к штаммам, обладающим резистентностью к препаратам на основе адамантана. Перамивир **2.3.3** (схема 1.2.3.1) [181], вследствие низкой биодоступности [182], применяется исключительно внутривенно. Ланинамивир **2.3.4** (схема 1.2.3.1) [183,184] – ингибитор NA, допущенный к клиническому применению в Японии. Он показал значительную активность против 11 штаммов вирусов H1N1, 15 штаммов H3N2 и 23 штаммов вирусов

типа В с IC_{50} в диапазонах 1,29–5,97 нМ, 7,09–38,8 нМ и 10,4–31,4 нМ соответственно и сохраняет эффективность у пациентов с резистентностью к озельтамивиру [185–188]. Последние успехи в исследовании ингибиторов НА в основном были сосредоточены на оптимизации структур занамивира и озельтамивира [189–196].

1.2.4 Ингибиторы нуклеокапсидного белка

Нуклеокапсидный белок (NP) составляет 30% от общего количества белков вируса и, будучи структурным белком, образует вирусный рибонуклеопротеин [197,198]. NP участвует в репликации вируса, формировании специфичности по отношению к хозяину и обладает другими функциями [156,199]. Недавние исследования привели к обнаружению нескольких потенциальных ингибиторов NP. Так, было показано, что карман связывания хвостовой петли в NP у вирусов типа А может быть потенциальной мишенью для противовирусных препаратов [200].

Нуклеозин **2.4.1** (схема 1.2.4.1) и его структурные аналоги [201,202] могут подавлять инфекцию, вызванную штаммами H1N1, H3N2 и H5N1, так как они способны инициировать агрегацию NP, блокируя его накопление в ядре. Напроксен **2.4.2** (схема 1.2.4.1) — популярный нестероидный противовоспалительный препарат. Было показано, что он способен эффективно предотвращать полимеризацию мономеров NP [203]. Лицензированный в России Ингавирин **2.4.3** (схема 1.2.4.1) напрямую взаимодействует с NP, блокируя его транспорт в ядро [204–210].

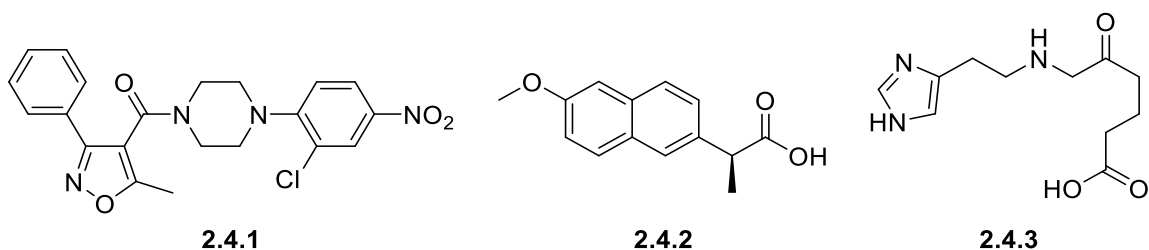


Схема 1.2.4.1 Ингибиторы нуклеокапсидного белка.

1.2.5 Ингибиторы ионного канала M2

M2 — трансмембранный белок, обладающий активностью типичных ионных каналов [211–214]. У вируса гриппа типа В отсутствует белок M2, вместо него специфический белок В/М2 выполняет эту функцию в процессе сборки вируса [214]. Белки M2 и В/М2 играют важную роль в инкорпорировании рибонуклеопротеина в вирус во время его сборки. Ингибиторы M2 можно структурно классифицировать на две группы.

К первой группе относятся соединения, построенные на адамантановом ядре: амантадин **2.5.1**, ремантадин **2.5.2** (схема 1.2.5.1) и их структурные аналоги [214–220]. Адамантановые ингибиторы M2 — первые противогриппозные препараты, одобренные к клиническому применению, но выработанная резистентность к ним [221] в сочетании с сильными нейротоксическими эффектами привели к отказу от их использования в клинической практике. Вторая группа — неадамантановые производные. Полиамины, такие как спермин **2.5.3** и спермидин **2.5.4** (схема 1.2.5.1), эффективны против вируса гриппа, так как связываются с M2 по сайту, отличному от сайта связывания адамантанов [222–224], чем привлекли большое внимание для разработки новых препаратов [225,226]. Однако стоит отметить, что почти ни один из ингибиторов M2 не эффективен против вирусов типа В [214].

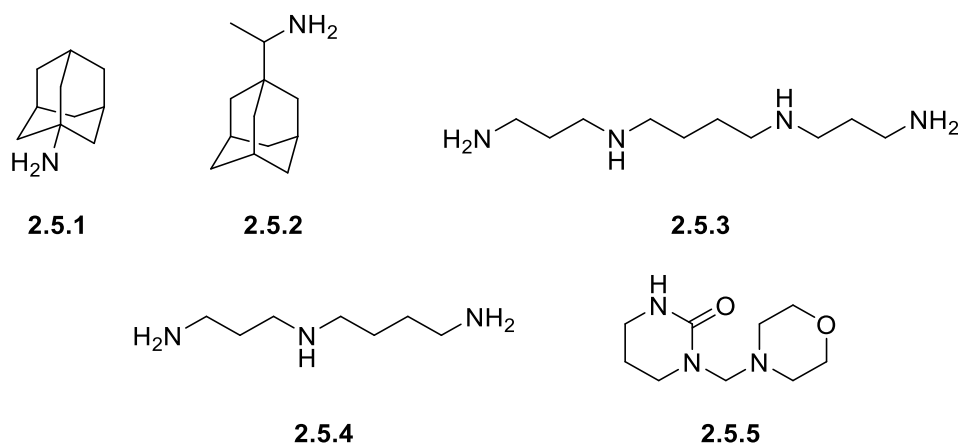


Схема 1.2.5.1 Ингибиторы ионного канала M2.

Мопиридон **2.5.5** (схема 1.2.5.1) продемонстрировал широкий спектр *in vitro* и *in vivo* действия на штаммы А1Н1, АН2Н2, АН3Н3 и В-типа [227–229]. Особенно примечательно то, что он является единственным противогриппозным препаратом, для которого доказано использование М2 в качестве мишени [230], а дальнейшие исследования показали его низкую острую токсичность на мышах [231].

1.2.6 Ингибиторы РНК-полимеразы

РНК-зависимая РНК-полимераза (РЗРП) вируса гриппа является высоко консервативной [232]. Она состоит из трех структурных субъединиц: двух основных (РВ1 и РВ2) и одной кислотной (РА) [232–235].

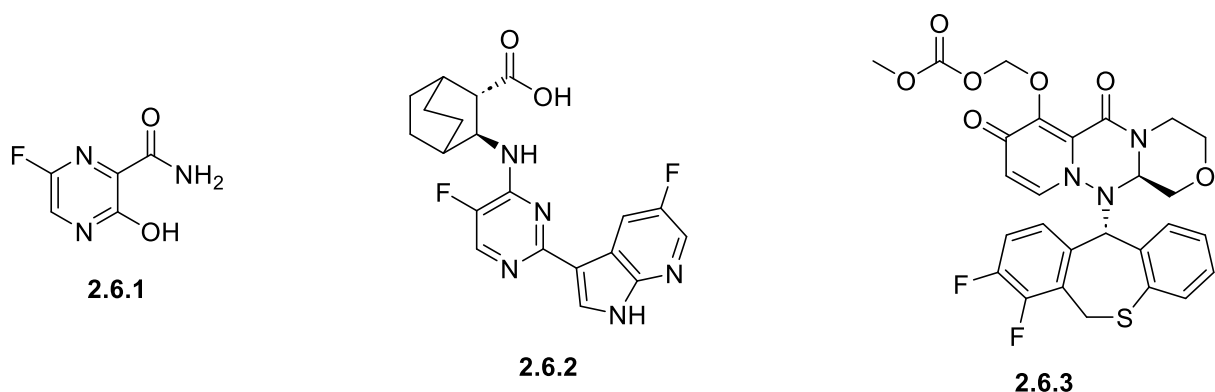


Схема 1.2.6.1 Ингибиторы РНК-полимеразы.

РЗРП играет неотъемлемую роль в цикле репликации вируса, включая транскрипцию и синтез вирусных белков, а также репликацию вирусного генома [236]. Первичная транскрипция вирусной геномной РНК в мРНК начинается с реакции кэп-захвата, в ходе которой 5'-концевая кэп-структура мРНК хозяина захватывается кэп-связывающим доменом субъединицы РВ2 с последующим расщеплением кэп-зависимой эндонуклеазой РА на расстоянии 10-13 нуклеотидов от кэпа для получения праймеров для синтеза вирусной мРНК, после чего происходит репликация вирусной РНК с получением полноразмерной кРНК. При этом как во время транскрипции, так и во время репликации, удлинение РНК происходит на РВ1. Активные центры

связывания, расщепления и элонгации РНК консервативны среди различных типов вируса гриппа, вследствие чего РЗРП часто рассматривается в качестве мишени для противовирусных препаратов.

Разработанный в Японии фавипиравир **2.6.1** (схема 1.2.6.1) [237] повышает риск развития тератогенности, поэтому его клиническое применение строго регулируется [238], и он доступен только пациентам с новым или возобновляющимся пандемическим вирусом гриппа, против которого альтернативные противовирусные препараты недостаточно эффективны. Являясь производным пиразина, фавипиравир претерпевает фосфорилирование с последующим фосфорилированием в инфицированных клетках [239] и действует как терминатор цепи или мутаген [240,241]. Он распознается РЭРП как аналог пурина и эффективно встраивается в формирующуюся РНК вместо гуанидина или аденозина [242,243], конкурентно ингибируя элонгацию РНК. Кроме того, фавипиравир способен вызывать летальный мутагенез, повышая частоту мутаций G в A и C в U, создавая таким образом нежизнеспособное вирусное потомство [244]. При этом он не обладает активностью по отношению к ДНК-зависимым РНК- и ДНК-полимеразами человека [245]. Кроме того, было продемонстрировано синергическое действие фавипиравира совместно с ингибиторами NA [246–254].

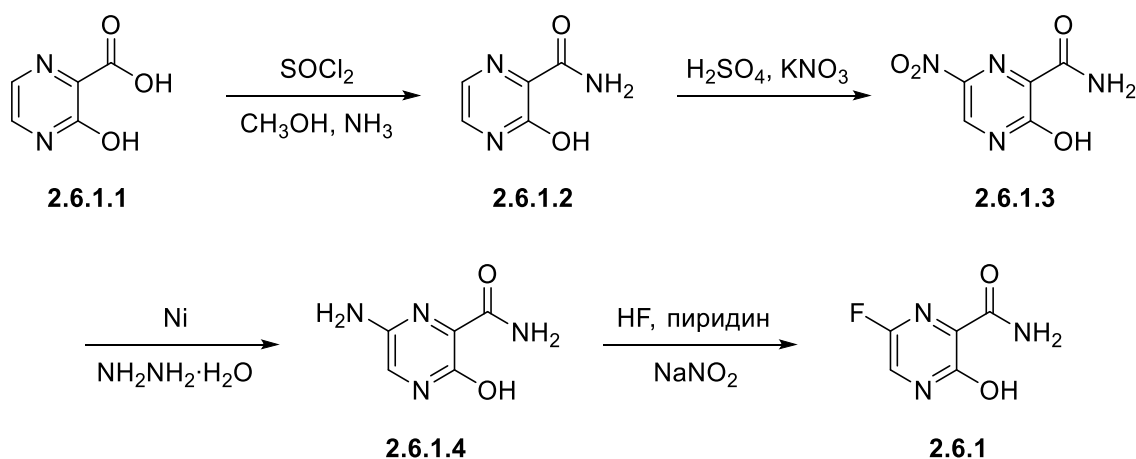


Схема 1.2.6.2 Синтез фавипиравира.

Изначально предложенный синтез фавипиравира [255] использует достаточно дорогие катализаторы, но при этом характеризуется крайне низким общим выходом (0.44% на 7 стадиях). Был предложен альтернативный способ синтеза, лишенный этих недостатков. Коммерчески доступная 3-гидроксипиразин-2-карбоновая кислота **2.6.1.1** (альтернативно может быть синтезирована из 3-аминопиразин-2-карбоновой кислоты [256]) этерифицируется и амидируется с образованием амида **2.6.1.2**, который затем нитруется нитратом калия. Полученное таким образом нитросоединение **2.6.1.3** восстанавливается гидразином на никеле Ренея с образованием амина **2.6.1.4**, реакцией которого с 70% фтороводородом в пиридине в инертной атмосфере в присутствии нитрата натрия получают искомый фавипиравир **2.6.1** с общим выходом 8% (схема 1.2.6.2) [257].

Пимодивир **2.6.2** (схема 1.2.6.1) получил в 2017 году статус Fast Track от Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США благодаря своему высокому потенциалу для лечения пациентов с развивающимся вирусом гриппом типа А на фоне высокого риска сопутствующих осложнений [258]. Он занимает кэп-связывающий домен PB2, ингибируя таким образом его связывание с 5'-концевой кэп-структурой мРНК хозяина. Пимодивир образует водородные связи с аминокислотными остатками E361 и K376 кэп-связывающего домена PB2. При этом азаиндольное кольцо пимодивира зажато между H357 и F404, в то время как его пиримидиновое кольцо взаимодействует с F323, а карбоксильная группа вступает в опосредованное водой взаимодействие с R355, H357 и Q406 [236,259,260].

Пимодивир активен против вирусов типа А, в том числе обладающих резистентностью к ингибиторам M2 и NA [259,260], но показал незначительную активность по отношению к вирусам типа В [261], что, по-видимому, вызвано различием некоторых ключевых аминокислот между вирусами А и В типов. При этом некоторые аминокислотные остатки кэп-

связывающего домена гриппа типа В могут стерически препятствовать связыванию пимодивира [262]. Кроме того, афинность и специфичность кэп-связывания у вирусов типа А и В значительно отличаются: афинность типа В существенно ниже; в то же время как тип А обладает строгой специфичностью к m^7G , тогда как тип В способен распознавать неметилованный кэп [263]. Синергетический эффект был продемонстрирован *in vitro* в сочетании с фавипиравиром, озельтамивиром и занамивиром [260].

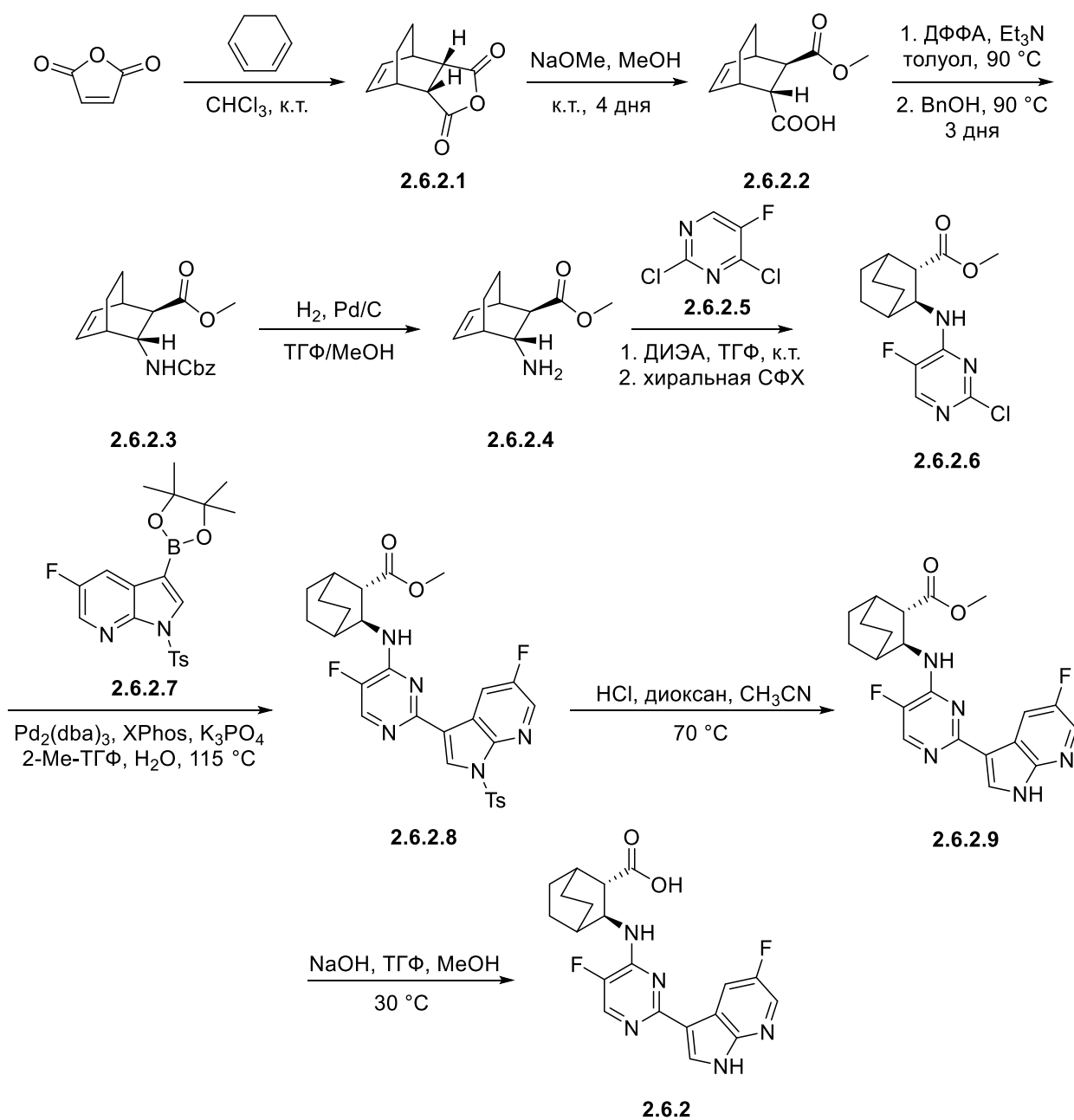


Схема 1.2.6.3 Синтез пимодивира.

Синтез пимодивира (схема 1.2.6.3) в качестве ключевого этапа использует Pd-катализируемое кросс-сочетание азаиндола с боронатом **2.6.2.7**. Реакция циклоприсоединения по Дильсу-Альдеру между малеиновым ангидридом и 1,3-циклогексадиеном позволяет получить аддукт **2.6.2.1**, который затем подвергается раскрытию ангидридового цикла и последующей эпимеризации при перемешивании с метилатом натрия при комнатной температуре в течение четырех дней, что приводит к получению транс-эфира карбоновой кислоты **2.6.2.2**. Перегруппировка Курциуса этого соединения с последующим захватом бензиловым спиртом приводит к образованию защищенной циклической аминокислоты **2.6.2.3**. Снятие защиты гидрированием на Pd на угле приводит к получению свободной циклической аминокислоты **2.6.2.4** с количественным выходом. Затем реакцией замещения между аминокислотой **2.6.2.4** и 2,4-дихлор-5-фторпиримидином **2.6.2.5** в присутствии основания Хунига получают рацемическую смесь, разделением которой при помощи хиральной сверхкритической флюидной хроматографии получают **2.6.2.6** в 2S,3S-конфигурации. Pd-катализируемая реакция Сузуки между **2.6.2.6** и боронатом азаиндола **2.6.2.7** приводит к образованию промежуточного продукта **2.6.2.8**, который обрабатывается соляной кислотой в диоксане для снятия тазилдильной защитной группы. На последней стадии основным гидролизом эфира **2.6.2.9** получают искомый пимодивир **2.6.2** с общим выходом 33% [259].

В 2020 г. разработка пимодивира была прекращена по результатам промежуточных анализов 3 фазы клинических исследований, так как не было продемонстрировано его существенных преимуществ по сравнению со стандартными протоколами лечения [264]. Тем не менее, структурная оптимизация пимодивира для усиления его активности видится достаточно перспективной.

Балоксавира марбоксил (далее балоксавир) **2.6.3** (схема 1.2.6.1) был разработан в Японии [265] и недавно одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США [266]. Его активная форма, балоксавириновая кислота, была разработана методом рационального молекулярного дизайна на основе концепции двухметалльного фармакофора, ранее использованной для долутегавира [267]. Как и интегразы ВИЧ, эндонуклеаза РЗРП использует два иона двухвалентных металлов в качестве кофакторов своей активности, чье хелатирование химическим каркасом потенциального ингибирования должно приводить к снижению эндонуклеазной активности [268].

Балоксавир отличается повышенной по сравнению с его кислотой пероральной биодоступностью и быстро гидролизует до активной формы эстеразами кишечника, печени и крови [269]. Балоксавириновая кислота связывается за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий с A20, Y24, K34, A37 и I38 эндонуклеазного домена PA у гриппа типа А или с T20, F24m, M34, N37 и I38 у типа В, ингибируя таким образом расщепление РНК [268]. Балоксавир обладает активностью по отношению к вирусам гриппа всех типов, включая устойчивые к ингибиторам NA штаммы [270,271], при этом тип В менее восприимчив к балоксавиру, нежели тип А [272–274]. Его синергетическое действие вместе с озельтамивиром было показано *in vitro* на мышах [275].

Синтез балоксавира (схема 1.2.6.4) сводится к сочетанию двух крупных фрагментов (**2.6.3.10R** и **1.2.6.3.18**), каждый из которых содержит хиральный центр. На первом этапе синтеза защитой лактама **2.6.3.1** аллилхлорформиатом в присутствии *n*-бутиллития с выходом 62% получают **2.6.3.2**, последующим восстановлением которого под действием диизобутилаллюминийгидрида (выход **2.6.3.3** 93%) и действием метанолом в кислых условиях получают рацемическое метоксисоединение **2.6.3.4** с выходом 87%.

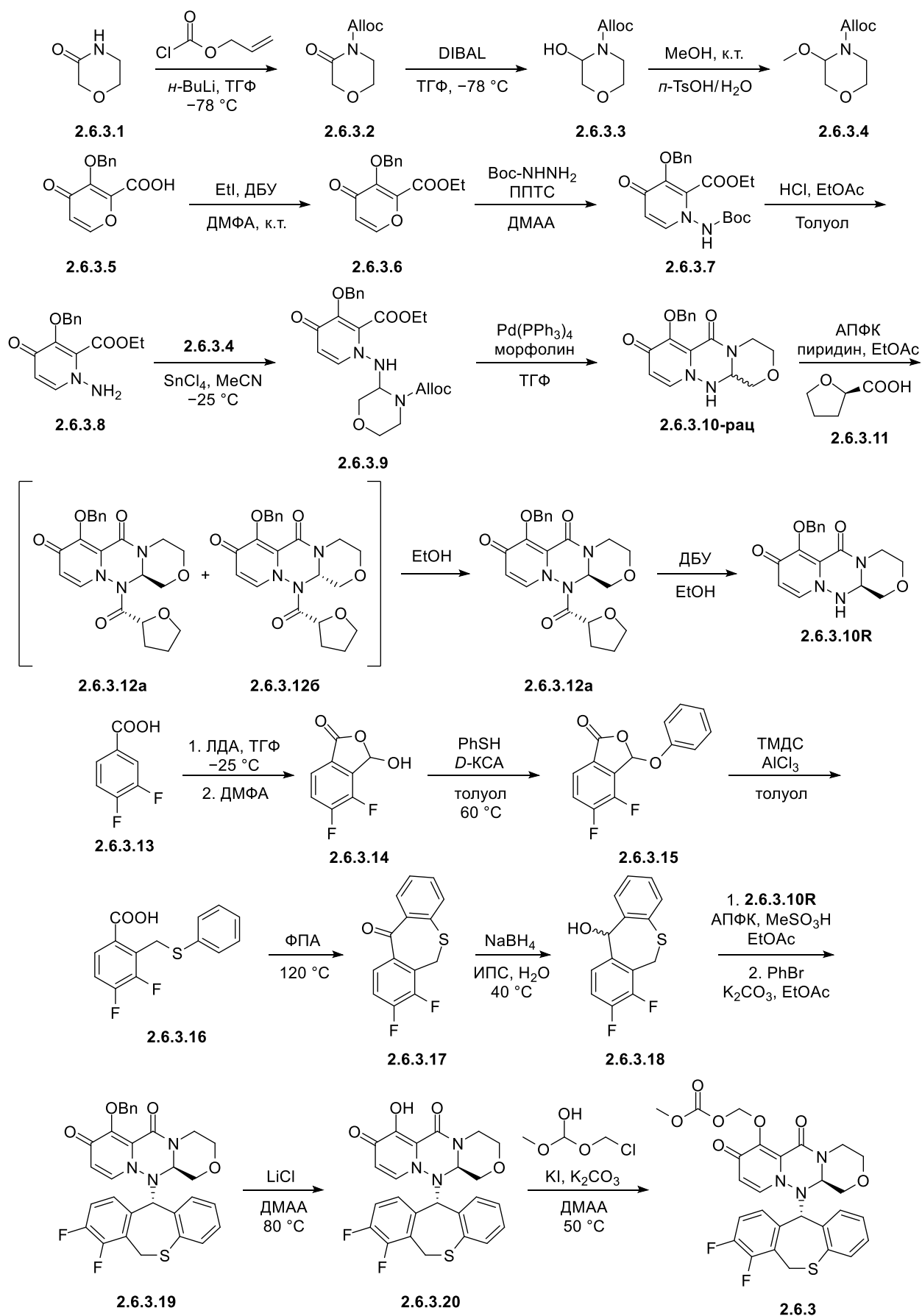


Схема 1.2.6.4 Синтез балоксавира.

Затем карбоксикислоту **2.6.3.5** этерифицируют этилйодидом с количественным выходом эфира **2.6.3.6**, который затем реагирует с трет-бутил карбозатом с образованием пиридона **2.6.3.7** с выходом 79% с последующим количественным снятии защиты ледяной соляной кислотой. Полученный таким образом гидразиновый фрагмент **2.6.3.8** вводят в реакцию с **2.6.3.4** действием хлорида олова (IV) при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в метаноле с образованием дизамещенного гидразина **2.6.3.9**, Pd-катализируемым снятием с которого N-аллилоксикарбонильной защитной группы с сопутствующей циклизацией количественно получают рацемическую смесь **2.6.3.10-рац**. Разделение энантиомеров проводят через образование гидразидных диастереомеров **2.6.3.12a** и **2.6.3.12b** конденсированием рацемата **2.6.3.10-рац** с (R)-тетрагидрофуран-2-карбоновой кислотой **2.6.3.11**. Суспендированием выпавшего осадка в этаноле с последующим фильтрованием позволяет получить чистый **2.6.3.12a** с выходом 45%. Затем снятием тетрагидрофурильной группы под действием ДБУ в этаноле при комнатной температуре с последующей кристаллизацией, вызываемой добавлением к реакционной смеси диизопропилового эфира, получают искомый фрагмент **2.6.3.10R** с выходом 90%.

На втором этапе синтеза 3,4-дифторбензойную кислоту **13** металлируют по 2 положению диизопропиламидом лития в тетрагидрофуране с последующим добавлением ДМФА, что приводит к образованию альдегида, внутримолекулярно реагирующего с карбоксильной группой с образованием **2.6.3.14**. Затем, после смены растворителя на толуол, реакцией **2.6.3.14** с тиофенолом под действием D-камфоросульфоновой кислоты получают тиацеталь **2.6.3.15**, который восстанавливают 1,1,3,3-тетраметилсилоксаном и хлоридом алюминия с образованием **2.6.3.16** с выходом 81% на трех стадиях. Обработкой **2.6.3.16** чистым фенилпропаноламином при $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ получают трициклический сульфид **2.6.3.17** с выходом 91%, восстановлением кето-

группы в котором при помощи боргидрида натрия получают искомый рацемический сульфид **2.6.3.18** с выходом 97%.

На последнем этапе производят сочетание **2.6.3.10R** и **2.6.3.18** в дегидратирующих условиях смеси 1-пропанфосфониевого альдегида и метансульфоновой кислоты при 70 °С с образованием защищенного балоксавира **2.6.3.19**, который затем обрабатывают 0,6 эквивалентами бромбензола и карбоната калия, так для обращения частичного дебензилирования **2.6.3.19**, что необходимо для его кристаллизации с выходом 53%. Полученный таким образом чистый защищенный балоксавир дебензилируют с использованием хлорида лития в ацетамиде при 80 °С с образованием балоксавиновой кислоты **2.6.3.20** с выходом 94%. Нуклеофильное дебензилирование хлоридом лития позволяет избежать использование палладия на завершающих стадиях синтеза, применение которого потребовало бы дополнительных мер для очистки готового продукта до допустимого уровня содержания тяжелых металлов. На финальной стадии синтеза кислота **2.6.3.20** обрабатывается хлорметилметилкарбонатом в диметилацетамиде с образованием искомого балоксавир марбоксила **2.6.3** с выходом 93% [276].

1.2.7 Прочие ингибиторы

Триазавирин **2.7.1** (схема 1.2.7.1) – оригинальный противовирусный препарат из семейства азолазинов [277], разработанный и зарегистрированный в России. Это соединение эффективно против широкого спектра вирусов гриппа, включая такие штаммы как H1N1, H3N2, H5N1 и H9N2 [277–279], при этом оно характеризуется практически полным отсутствием токсичности [279]. В последние годы спектр противовирусной активности триазавирина и его производных был значительно расширен в соответствии с данными исследований, продемонстрировавших его активность против вируса парагриппа человека, лихорадки Денге, клещевого и калифорнийского энцефалита, а также лихорадки Рифт-Валли [280–282].

Высокая эффективность и хорошая переносимость триазавирина в терапии гриппа и острых респираторных инфекций были подтверждены в ходе клинических исследований [283,284]. Механизм действия триазавирина на сегодняшний день не известен.

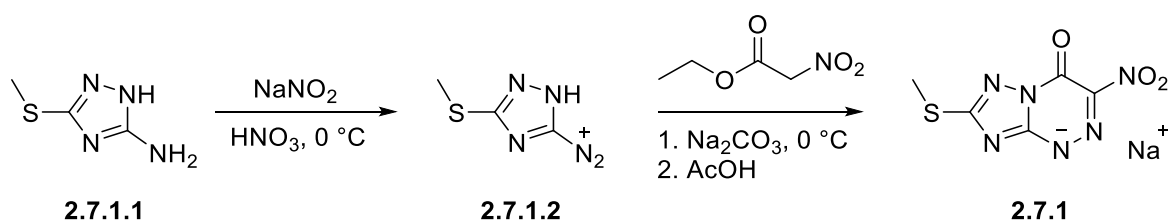


Схема 1.2.7.1 Синтез триазавирина.

Синтез триазавирина (схема 1.2.7.1) осуществляется *in situ* диазотированием аминотиазотриазола **2.7.1.1** с последующей конденсацией образовавшейся соли диазония **2.7.1.2** с этилнитроацетатом в щелочной среде. Выход искомого триазавирина **2.7.1** после перекристаллизации из 20% уксусной кислоты составляет 74% [280].

1.3 Выводы по главе 1

Таким образом, по результатам рассмотрения литературы можно сделать вывод, что несмотря на большое количество присутствующих на рынке препаратов против ВИЧ и гриппа, их общая эффективность недостаточна, что вызвано, в первую очередь, развитием резистентности. Так, к примеру, для каждого используемого в клинической практике ненуклеозидного ИОТ были выявлены устойчивые к нему клинические изоляты ВИЧ [285], а резистентные к озельтамивиру штаммы гриппа стали серьезной проблемой в сезон 2008 г. [286–288]. В связи с этим необходима разработка новых соединений с противовирусной активностью, эффективных против устойчивых к имеющимся препаратам мутантов.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Новый класс ингибиторов обратной транскриптазы N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амины

Было показано, что N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминовый каркас обладает существенной активностью в качестве ненуклеозидного ИОТ. Первоначальный вариант **3.1** (табл. 2.1.1) был найден в результате фенотипического скрининга, после чего на основании классического для медицинской химии анализа зависимости «структура – активность» было разработано более 100 аналогов (в диссертационной работе представлены только 50 наиболее релевантных) с целью оптимизации активности к дикому штамму ВИЧ, штамму A17 (K103N/Y181C) и другим распространенным мутантным штаммам, устойчивым к ненуклеозидным ИОТ. Этот подход позволил выявить серию соединений с пикомолярной активностью к дикому штамму, сохраняющих активность против клинически значимых мутантных ВИЧ.

2.1.1 Синтез

В рамках диссертационной работы был разработан эффективный метод синтеза производных N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазолов (схема 2.1.1). Ключевым интермедиатом для получения конечного соединения является замещённый метил-N'-циано-N-фенилимидотиокарбамат **3.i.3**, который можно синтезировать разными методами. Для замещенных анилинов, содержащих электронодонорные или нейтральные заместители, использовался метод синтеза, основанный на реакции анилинов с диметилцианотиоимидокарбонатом, сопровождающейся удалением метилмеркаптана. Для синтеза соединений, имеющих электроноакцепторную группу в анилиновом фрагменте, было успешно разработано два альтернативных подхода, основанных на реакции анилина, на протекание которой не влияет наличие электронодонорных или электроноакцепторных заместителей. В первом случае был использован

диметиламинотиокарбамоилхлорид в безводной среде. Соответствующий арилизоотиоцианат **3.i.2**, полученный с количественным выходом, впоследствии вступает в реакцию с цианамидом в присутствии этилата натрия. Последующая обработка реакционной смеси метилйодидом приводит к образованию ключевого интермедиата — N'-циано-N-фенилимидотиокарбамата **3.i.3**. По второму пути изотиоцианат **3.i.2** может быть альтернативно синтезирован реакцией замещенных анилинов с тиофосгеном в щелочных условиях. Например, наличие триэтиламина, диизопропилэтиламина, метилата натрия, карбоната кальция и т. д. в безводном растворителе вызывает образование соответствующего изотиоцианата и его последующее превращение в N'-циано-N-фенилимидотиокарбамат **3.i.3** в реакции с цианамидом и метилйодидом. Все три метода позволяют получать целевые соединения с высоким выходом и чистотой.

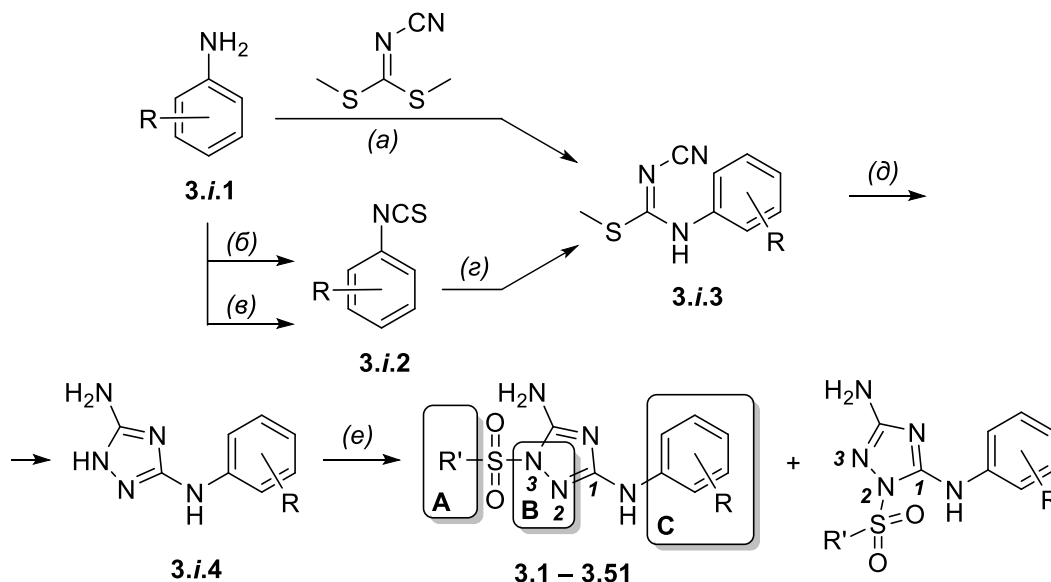


Схема 2.1.1 Общая схема синтеза: (а) *n*-бутанол, кипячение; (б) $(\text{CH}_3)_2\text{NCSCl}$, толуол, кипячение; (в) тиофосген, основание, толуол, к.т.; (г) цианамид, этилат натрия, метилйодид, этанол, кипячение; (д) гидразин, вода, этанол, кипячение; (е) R'-сульфонилхлорид, 16 ч к. т., затем 6 – 24 ч 4 °С.

Реакция полученного метил-N'-циано-N-фенилимидотиокарбамата **3.i.3** с гидразин-гидратом приводит к замыканию 1,2,4-триазольного кольца с образованием триазола **3.i.4**. Последняя стадия – реакция триазола **3.i.4** с арилсульфонилхлоридом, обычно приводящая к получению смеси двух изомеров. Основным продуктом образуется в ходе реакции по NH триазола, в то время как побочный продукт является следствием сульфонилирования соседнего атома азота. Подобная смесь является типичным результатом для 3-амино-1,2,4-триазолов, при этом селективность обуславливается увеличенной кислотностью NH-группы вследствие индуктивного эффекта соседнего амина [289–291]. Были подобраны условия реакции и кристаллизации полученной смеси, при которых концентрация желаемого 1,3-изомера значительно преобладает. В качестве альтернативного метода разделения изомеров возможно использование хроматографии.

2.1.2 Анализ зависимости «структура – активность»

Для анализа зависимости «структура – активность» исходная структура N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амин была условно разделена на 3 оптимизируемых структурных фрагмента — А, В и С (схема 2.1.1). Был проведен скрининг активности синтезированных соединений по отношению к ВИЧ дикого типа (ПВ) и мутантного A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, подтвердивший активность выбранного ряда препаратов по отношению к обратной транскриптазе (ОТ) (табл. 2.1.1). Кроме того, для каждого соединения была проведена качественная оценка цитотоксичности с использованием МТТ-теста, показавшая ее отсутствие для исследуемого диапазона доз. Фрагмент А (N1-сульфонамидная группа) был модифицирован введением заместителей разного размера, полярности и положения во фрагменте. Введение разнообразных по структуре гетероциклов, таких как 6-хлоримидазол, 2,4-диметилтиазол и замещенные нафталины, не оказало существенного негативного влияния на активность по отношению к дикому штамму, однако, введение таких простых заместителей как

метилсульфонамид, более крупные алифатические или циклоалифатические сульфонамиды приводило к отсутствию активности. В целом, замещение фенила во фрагменте А на нафталин приводило к резкому увеличению активности, в связи с чем было проведено исследование ряда замещенных нафталинов. Соединения, содержащие циано-, метилциано- или акрилонитрильную группы по 6 положению обладали наибольшей активностью по отношению к дикому штамму. Многие из этих соединений, включая **3.27**, **3.30** и **3.36**, показывали более высокую эффективность по сравнению с **3.1**. Кроме того, стерически нагруженные, электронодефицитные кольца в этом положении, по-видимому, необходимы для сохранения активности по отношению к штамму A17.

Среди протестированных модификаций фрагмента В (1,2-замещенные триазолы) только 8 соединений показали активность по отношению к дикому типу, при этом не прослеживалась какая-либо четкая корреляция между структурой и активностью. Более того, 1,2-замещенные триазолы не проявляли активность по отношению к штамму A17, в связи с чем было решено сосредоточить дальнейшие исследования на 1,3-замещенных триазолах.

В целом, электронодефицитные ароматические системы в анилиновом фрагменте С показывали повышенную активность по отношению к дикому типу, за исключением 2-хлор замещенных, показавших полную потерю активности. Введение одной или двух метиленовых групп между атомом азота и арильными кольцами во фрагменте С приводило к сильной частичной или полной потере активности. Удаление 4-хлор заместителя в **3.29** приводило к существенному (в 10–40 раз) падению активности, тогда как 4-циано и 4-метилциано группы существенно увеличивали активность. Наконец, введение 3-хлор заместителя в сочетании с объемным электронодефицитным кольцом во фрагменте А приводило к слабому увеличению активности по отношению к дикому типу и к значительному увеличению активности по отношению к штамму A17.

Таблица 2.1.1 *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

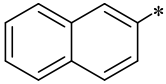
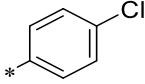
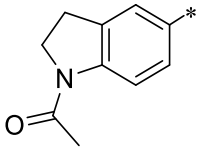
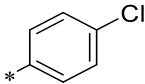
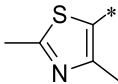
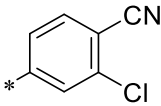
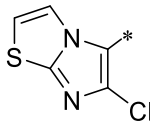
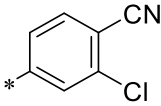
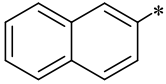
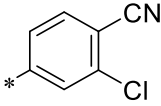
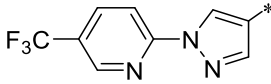
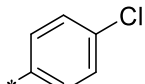
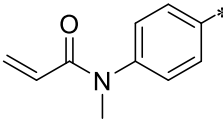
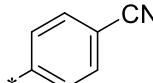
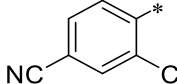
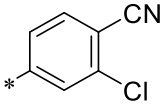
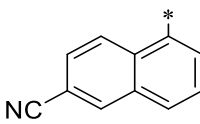
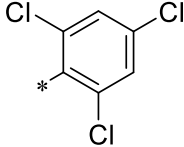
	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.1		1,3		9.3 ± 2.3	> 1000
3.2		1,3		93 ± 15	—
3.3		1,3		0.88 ± 0.07	300 ± 110
3.4		1,3		0.98 ± 0.24	180 ± 180
3.5		1,3		1.6 ± 0.19	570 ± 130
3.6		1,3		15 ± 2.9	> 1000
3.7		1,3		> 1000	—
3.8		1,3		150 ± 27	> 1000
3.9		1,3		> 1000	> 1000

Таблица 2.1.1 (продолжение) *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

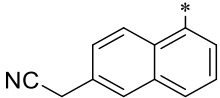
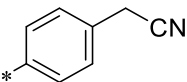
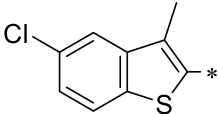
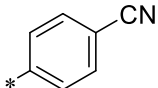
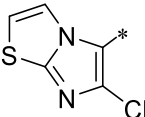
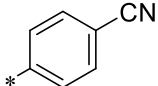
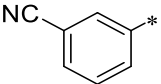
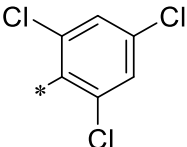
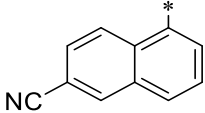
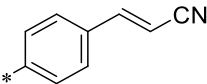
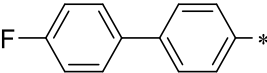
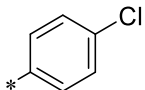
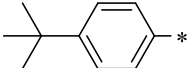
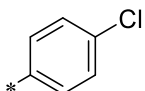
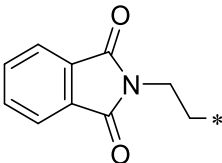
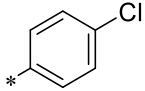
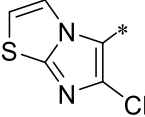
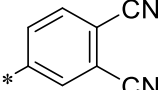
	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.10		1,3		0.18 ± 0.03	240 ± 87
3.11		1,3		2.7 ± 0.56	> 1000
3.12		1,3		1.8 ± 0.33	700 ± 1000
3.13		1,3		> 1000	> 1000
3.14		1,3		1.5 ± 0.31	220 ± 57
3.15		1,3		> 1000	—
3.16		1,3		70 ± 11	300 ± 56
3.17		1,3		> 1000	—
3.18		1,3		0.22 ± 0.05	> 1000

Таблица 2.1.1 (продолжение) *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

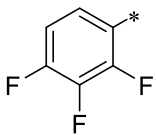
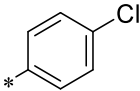
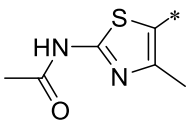
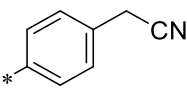
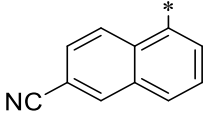
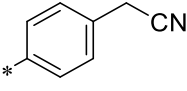
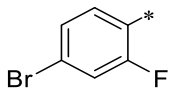
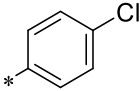
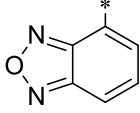
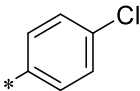
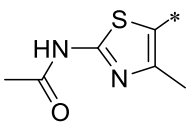
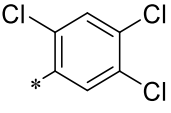
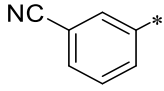
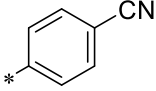
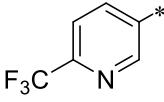
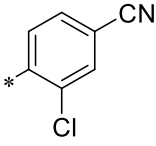
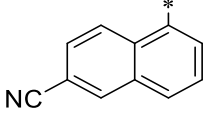
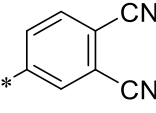
	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.19		1,3		580 ± 110	> 1000
3.20		1,3		> 1000	> 1000
3.21		1,3		0.28 ± 0.04	43 ± 35
3.22		1,3		19 ± 2.8	560 ± 50E+7
3.23		1,3		10 ± 1.5	> 1000
3.24		1,3		350 ± 160	> 1000
3.25		1,3		100 ± 24	710 ± 330
3.26		1,3		> 1000	> 1000
3.27		1,3		0.68 ± 0.08	37 ± 15

Таблица 2.1.1 (продолжение) *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

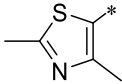
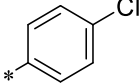
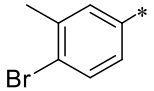
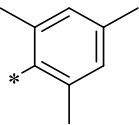
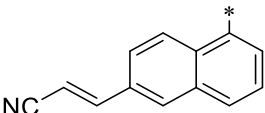
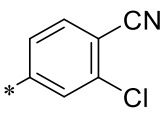
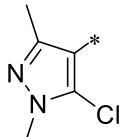
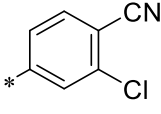
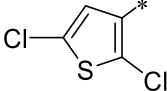
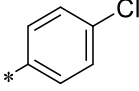
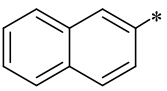
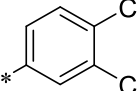
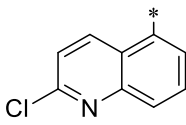
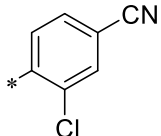
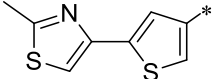
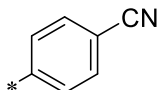
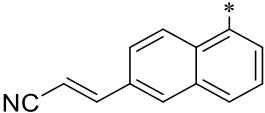
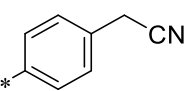
	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.28		1,3		4.6 ± 0.73	> 1000
3.29		1,3		> 1000	—
3.30		1,3		0.26 ± 0.05	0.69 ± 0.14
3.31		1,3		0.31 ± 0.05	900 ± 390
3.32		1,3		10 ± 1.7	3700 ± 11000
3.33		1,3		4.7 ± 0.58	> 1000
3.34		1,3		390 ± 260	> 1000
3.35		1,3		2.1 ± 0.81	> 1000
3.36		1,3		0.25 ± 0.05	5.4 ± 1.4

Таблица 2.1.1 (продолжение) *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

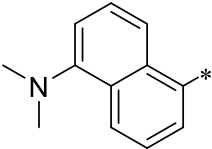
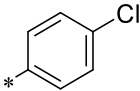
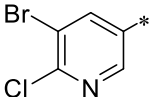
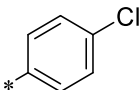
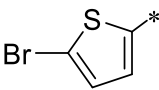
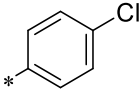
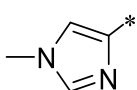
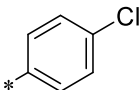
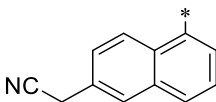
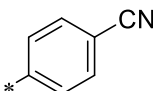
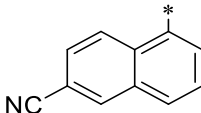
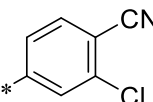
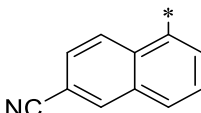
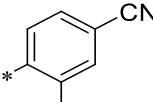
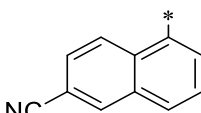
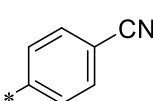
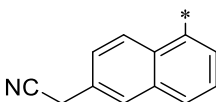
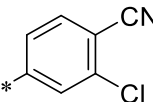
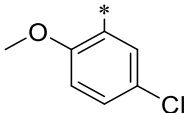
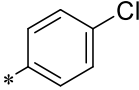
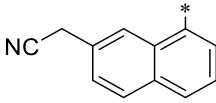
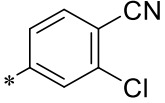
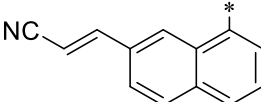
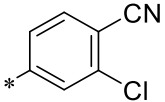
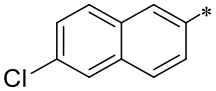
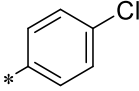
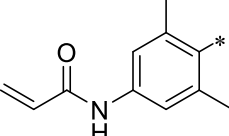
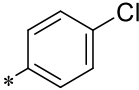
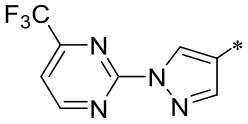
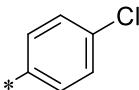
	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.37		1,3		10 ± 2	> 1000
3.38		1,3		> 1000	—
3.39		1,3		15 ± 3.1	> 1000
3.40		1,3		84 ± 19	—
3.41		1,3		0.74 ± 0.17	160 ± 60
3.42		1,3		0.42 ± 0.08	40 ± 18
3.43		1,3		14 ± 2.6	290 ± 70
3.44		1,3		1.1 ± 0.2	55 ± 4
3.45		1,3		0.6 ± 0.11	150 ± 59

Таблица 2.1.1 (окончание) *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ дикого типа (ПВ) и A17 (K103N/Y181C) в клетках TZM-bl, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

	A	B	C	IC₅₀ ДТ	IC₅₀ A17
3.46		1,3		180 ± 73	> 1000
3.47		1,3		5.3 ± 1.9	> 1000
3.48		1,3		1.7 ± 0.45	190 ± 23
3.49		1,3		> 1000	—
3.50		1,3		> 1000	—
3.51		1,3		240 ± 43	—

2.1.3 Расширенный противовирусный скрининг

Так как для первоначального варианта **3.1** не наблюдалось значимого ингибирования (IC₅₀ = 9,3 ± 2,3 нМ на клетках TZM-bl, IC₅₀ = 0,28 ± 0,1 мкМ на ОТ), дальнейшая оценка активности была продолжена на его аналогах. Так как для многих из наилучших соединений активность была крайне высокой, был проведен дополнительный эксперимент в расширенном диапазоне концентраций с целью выхода нормализованного ингибирования на плато

(0,028–5000 нМ, 15 точек), подтвердивший для исследуемых соединений значительное ингибирование дикого штамма и штамма A17. При этом оценка цитотоксичности проводилась более строго, с определением CC_{50} где это возможно. Данные для эксперимента в расширенном диапазоне концентраций приведены в табл. 2.1.2.

Таблица 2.1.2 *In vitro* цитотоксичность и ингибирование ВИЧ в расширенном диапазоне концентраций, все CC_{50} в мкМ $\pm$ СОС, все IC_{50} в нМ $\pm$ СОС.

	CC_{50}	IC_{50} (CC_{50}/IC_{50}) ДТ	IC_{50} (CC_{50}/IC_{50}) A17
3.27	28 ± 66	0.21 ± 0.01 (1.3×10^5)	49 ± 9.5 (1.3×10^5)
3.30	4.8 ± 1.2	0.47 ± 0.05 (1.0×10^4)	3.4 ± 1.1 (1.0×10^4)
3.36	0.91 ± 0.08	0.22 ± 0.03 (4.1×10^4)	24.5 ± 5.1 (4.1×10^4)
3.42	6.0 ± 1.1	0.34 ± 0.04 (1.7×10^4)	25 ± 6.6 (1.7×10^4)
3.44	7.8 ± 5.2	0.35 ± 0.05 (2.2×10^4)	49 ± 7.8 (2.2×10^4)
рилпивирин	> 5	0.35 ± 0.03 ($> 1 \times 10^4$)	2.5 ± 1.9 ($> 2 \times 10^3$)
эфавиренз	> 5	0.68 ± 0.03 ($> 7 \times 10^4$)	18 ± 4.5 ($> 2 \times 10^2$)

Соединения, сохраняющие активность по отношению к штамму A17 (**3.27**, **3.30**, **3.44**), были дополнительно протестированы на других клинически значимых штаммах с выраженной резистивностью к ненуклеозидным ИОТ (табл. 2.1.3). В то время как все три соединения сохраняют активность по отношению к большинству из исследованных мутантных штаммов, в случае штаммов L100I и K103N существенная потеря в активности не наблюдалась только для соединения **3.30**, что, по-видимому, вызвано наличием дополнительной винильной группы между нафталиновым фрагментом и нитрильной группой.

Таблица 2.1.3 Ингибирование штаммов с резистентностью к ИОТ и цитотоксичность для **3.27**, **3.30** и **3.44**. В скобках приведена кратность потери ингибирования мутантных штаммов по сравнению с диким типом.

		3.27	3.30	3.44	рилпивирин
IC ₅₀ , нМ	A14	12 ± 1.6 (41)	1.3 ± 0.2 (5.6)	55 ± 6.3 (240)	0.8 ± 0.1 (2.3)
	Y181C	41 ± 7.8 (140)	3.7 ± 0.6 (16)	18 ± 3.6 (80)	1.3 ± 0.5 (3.9)
	L100I, K103N	1050 ± 200 (3500)	18 ± 3.7 (75)	1500 ± 430 (6700)	14 ± 7.4 (43)
	K103N	5.9 ± 0.7 (20)	2.1 ± 0.32 (8.9)	8.8 ± 1.1 (39)	1.3 ± 0.5 (4.1)
	ДТ	0.30 ± 0.006	0.24 ± 0.004	0.23 ± 0.005	0.33 ± 0.004
CC ₅₀ , мкМ		27 ± 66	4.8 ± 1.2	7.8 ± 5.2	> 5

2.1.4 Тест на ингибирование ОТ

Проведенный тест на ингибирование ОТ подтверждает, что мишенью для исследуемых соединений служит обратная транскриптаза (табл. 2.1.4). Было показано, что соединения, сохранившие значительную активность против штамма A17, наблюдается ингибирование на уровне нМ, что сравнимо с ингибированием использовавшегося в качестве контроля рилпивирина, что подтверждает ОТ ВИЧ в качестве мишени. Практически для всех исследованных ИОТ (кроме невирапина и доравирина) наблюдалась схожая картина, разница в кратности при этом варьировалась в пределах 50–8500, причем в случае как **3.30**, так и рилпивирина, наблюдалась более чем 3000-кратная разница между внутриклеточным и ОТ-ингибированием.

Таблица 2.1.4 *In vitro* ингибирование ОТ ВИЧ для избранных соединений, все IC₅₀ в мкМ ± СОС.

	IC ₅₀		IC ₅₀
3.1	0.28 ± 0.1	невирапин	0.40 ± 0.14
3.27	0.35 ± 0.13	эфавиренз	0.03 ± 0.01
3.30	0.23 ± 0.07	рилпивирин	0.16 ± 0.06
3.44	0.7 ± 0.33		

Этот тренд уже был ранее описан в ходе масштабного сравнения ингибирования ВИЧ в клетках и на ОТ на основании литературных данных по AC₅₀ [292]. Так же было обнаружено, что с ростом активности (как на ОТ, так и в клетках) значимость этой корреляции снижалась, и соединения зачастую показывали на порядки разную эффективность. Кроме того, при помощи программного пакета Chemaxon для каждого соединения был рассчитан ряд физико-химических параметров, но никакой их корреляции с разницей в наблюдаемой активностью обнаружено не было (табл. 2.1.5).

Таблица 2.1.5 Сравнение *in vitro* активности и физико-химических свойств **3.30** с клинически используемыми ненуклеозидными ИОТ, все IC₅₀ в мкМ.

	IC ₅₀	^a pK _{a1}	^a pK _{a2}	^b pK _{a1}	^b pK _{a2}	logP	logD
3.30	4.06	8.54	17.55	−0.65	−5.51	4.33	4.3
Невирапин	0.26	14.98		3.28	1.18	2.49	2.49
Эфавиренз	0.03	12.52		−1.49		4.46	4.46
Доравирин	0.02	9.66		−2.63	−5.22	2.23	2.23
Этравирин	0.57	10.99	19.91	3.49	−3.02	5.54	5.54
Рилпивирин	1.18	11.43	16.33	4.44	−2.53	5.47	5.47

2.1.5 *In vitro* ADME-Tox для 3.30

Для соединения-лидера **3.30** была проведена оценка *in vitro* абсорбции, распределения, метаболизма и выведения (табл. 2.1.6).

Таблица 2.1.6 Данные ADME для **3.30**.

ADME характеристика

Растворимость, мкМ	< 0.2
Цитохромное ингибирование, IC ₅₀ , мкМ	
1A2 и 2D6	>50
2C9	1.42
2C19	10.6
3A4	31.3
Стабильность в микросомах печени, мышь	
t _{1/2} , мин.	124.4
собственный клиренс, мкл/мин./мг белка	11.1
Стабильность в микросомах печени, человек	
t _{1/2} , мин.	53.8
собственный клиренс, мкл/мин./мг белка	25.8
Связывание с белками крови, мышь	
связывание, %	> 99.9
стабильность, t _{1/2} , мин.	372.8
Связывание с белками крови, человек	
связывание, %	> 99.9
стабильность, t _{1/2} , мин.	372.8
Кишечная проницаемость на модели Caco-2	
A-B, ×10 ⁻⁶ см/с	0.4
B-A, ×10 ⁻⁶ см/с	0.4
коэффициент эффлюкса	1

Не считая низкой растворимости, в целом характерной для нуклеозидных ИОТ и, по-видимому, не оказывающей влияния на фармакокинетику в мышах, это соединение показало хорошую метаболическую стабильность в микросомах печени мыши и человека, относительно низкий уровень цитохромного (CYP) ингибирования (CYP2C9 IC_{50} 1,42 мкМ), высокое связывание с белками и отсутствие эффлюкса в клетках Caco-2.

Дополнительно для ряда соединений было проведено исследование кардиотоксичности по связыванию с hERG-каналами сердца методом поляризационного флуоресцентного анализа (табл. 2.1.7). Несмотря на то, что соединение-лидер **3.30** показало слабое ингибирование, данные для контролей показывают, что это может быть связано с неспецифическим не-hERG связыванием. В то же время ингибирующая концентрация для **3.30** была значимо выше, чем для рилпивирин.

Таблица 2.1.7 Ингибирование hERG для избранных соединений, все IC_{50} в мкМ $\pm$ СОС.

	IC_{50}		IC_{50}
3.1	> 11	3.44	9.6 ± 2.1
3.27	20 ± 4.3	рилпивирин	3.3 ± 0.29
3.30	12 ± 2.2		

2.1.6 *In vitro* нейротоксичность

Нейронная токсичность была определена по дозозависимому изменению окрашивания MAP2 в первичных нейронах мыши, при этом количественная оценка проводилась как по относительной интенсивности, так и по относительной площади. Оба подхода позволили получить близкие значения TC_{50} , что говорит о том, что они в принципе эквивалентны.

Единственным исключением являлось соединение **3.30**, для которого TC_{50} удалось определить только по относительной площади, но отклонение от среднего при этом говорит о низкой достоверности этого значения. Из всех исследованных соединений три показали дозозависимый отклик (по относительной интенсивности) — **3.44** (TC_{50} $1,0 \pm 0,5$ мкМ), рилпивирин (TC_{50} $4,4 \pm 1,5$ мкМ) и эфавиренз (TC_{50} $1,5 \pm 0,9$ мкМ); для остальных соединений токсичность была значительно ниже (табл. 2.1.8). При использовании ранее описанных методик [293] на использованных концентрациях не удалось достигнуть полной потери окрашивания MAP2, в связи с чем для оценки повреждения нейронов был использован полуколичественный подход.

Таблица 2.1.8 Данные по нейротоксичности по относительной интенсивности (I) и относительной площади (S) для избранных соединений, все IC_{50} в нМ, все TC в мкМ.

	IC_{50}	TC_{50}, I	TC_{10}, I	Si, I	TC_{50}, S	TC_{10}, S	Si, S
3.1	9.3	23	6.1	6.5	34	—	—
3.27	0.32	50	4.5	140	48	—	—
3.30	0.31	>10	>10	—	103	—	—
3.44	0.32	1.0	0.17	5.4	1.2	0.05	1.6
рилпивирин	0.35	4.5	0.93	27	3.9	0.60	17
эфавиренз	0.66	1.6	—	—	1.3	0.07	1.1

Для строгой количественной оценки возможной нейротоксичности была введена метрика «индекса безопасности» (Si) (табл. 2.1.7). Si определяет, может ли препарат при его максимальной терапевтической концентрации (принятой как $100 \times IC_{50}$) начать оказывать токсическое действие, наличие которого определяется по TC_{10} . $Si \leq 1$ указывает на наличие определенного риска токсического воздействия при условии полного проникновения препарата через гематоэнцефалический барьер (т. е. концентрация препарата в

плазме равна концентрации препарата в мозговой ткани). По этому показателю эфавиренз и **3.44** демонстрируют потенциальные нейротоксические риски, в то время как другие исследованные соединения ($Si > 1$) не попадают в этот диапазон. Для **3.30** невозможно было определить значение TC_{10} , так как не было достаточной уверенности в наличии нейронной токсичности в исследованном диапазоне концентраций.

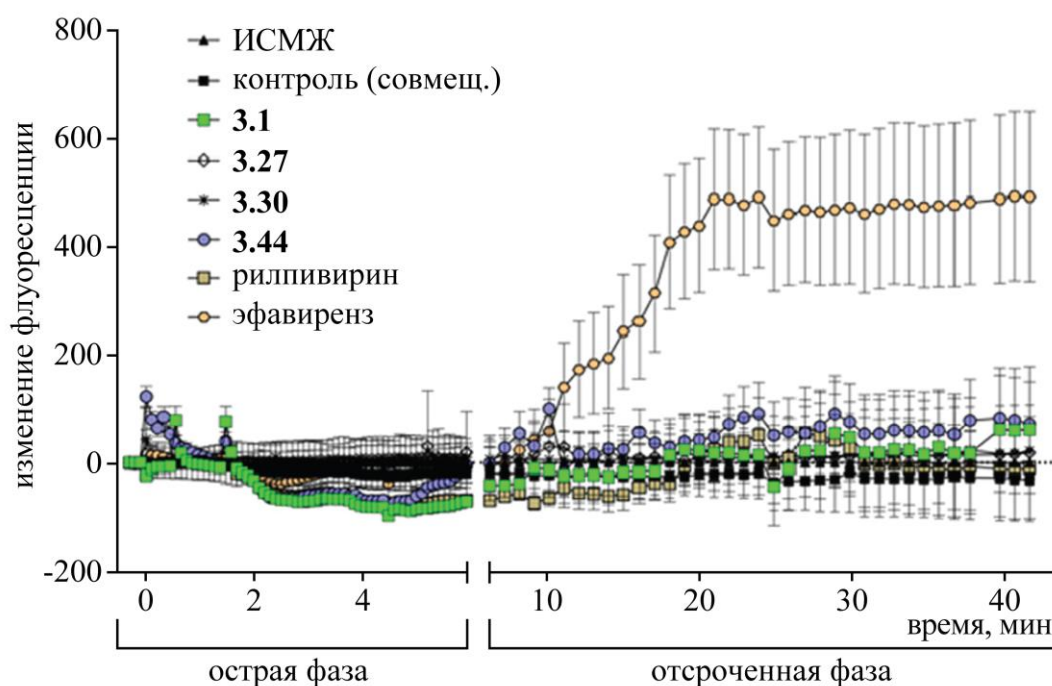


Рисунок 2.1.1 Накопление кальция в первичных культурах нейронов мыши.

Анализ накопления кальция (рис. 2.1.1) показывает, активируют ли исследуемые соединения кальциевую сигнализацию (острая фаза) или провоцируют отсроченный подъем. Все соединения были протестированы на концентрации в 1 мкМ. В отложенной стадии эфавиренз продемонстрировал выраженный рост накопления кальция. Для сравнения, токсичное воздействие на регуляцию кальция должно провоцировать отсроченный рост накопления (по росту флуоресценции) на 800–1000 и более, в то время как значения менее 200 считаются показателем отсутствия токсичности. В целом, по таким критериям лишь эфавиренз показал значимую нейротоксичность.

2.1.7 *In vivo* исследования для 3.30

Для **3.30** было проведено фармакокинетическое исследование на мышах при внутрижелудочном однократном введении дозы 250 мг/кг (рис. 2.1.2, табл. 2.1.9). Как и прочие нуклеозидные ИОТ, данное соединение малорастворимо в воде, тем не менее, исходя из фармакокинетических данных, этот факт не сказывается на относительной биодоступности, так как исследуемое соединение отличается высокой стабильностью в плазме крови и микросомах. Для плазмы крови период полувыведения ($T_{1/2}$) составил $7,7 \pm 1,6$ ч при максимальной концентрации ($C_{\max}$) $81,4 \pm 26,2$ нг/мл.

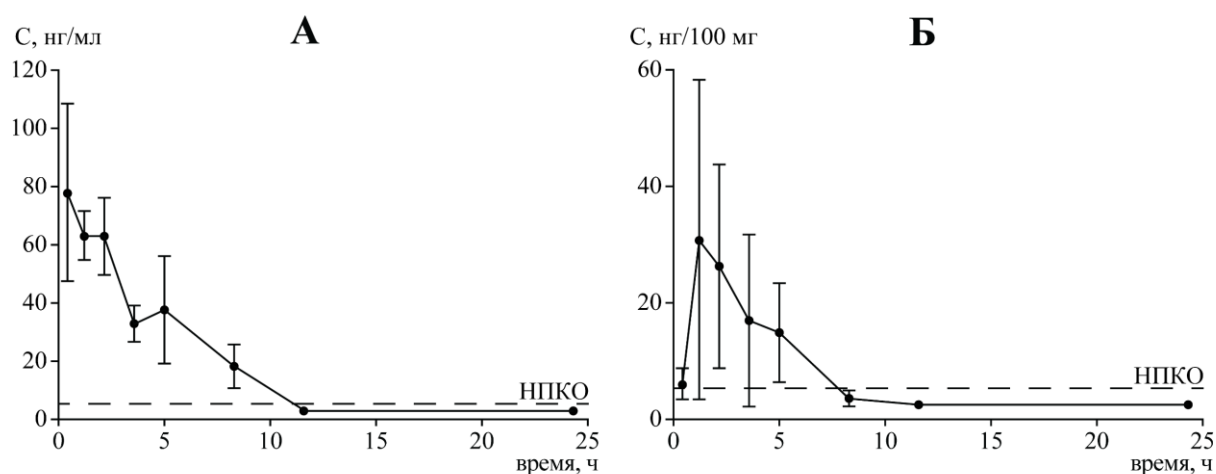


Рисунок 2.1.2 Фармакокинетические кривые (внутрижелудочно на мышах) для плазмы крови (а) и мозга (б) для **3.30**.

Таблица 2.1.9 Фармакокинетические параметры для **3.30**.

	плазма	мозг
AUC_{0-24}	397.3 ± 44.75 нг/мл·ч	142.5 ± 12.31 нг/100мг·ч
$AUC_{0-\infty}$	427.7 ± 40.88 нг/мл·ч	183.9 ± 41.65 нг/100мг·ч
$C_{\max}$	81.4 ± 26.16 нг/мл	40.3 ± 9.43 нг/100мг
$T_{\max}$	0.7 ± 0.29 ч	2 ± 1 ч
$T_{1/2}$	7.7 ± 1.57 ч	11.5 ± 8.14 ч

Высокая концентрация **3.30** в мозге и сравнимое время полувыведения свидетельствует о легком проникновении через гематоэнцефалический барьер, что в сочетании с описанной ранее существенно более низкой по сравнению с рилпивиринном и эфавирензом *in vitro* нейротоксичностью потенциально позволит избежать негативных нейрологических побочных эффектов, характерных для используемых в клинической практике ненуклеозидных ИОТ [293].

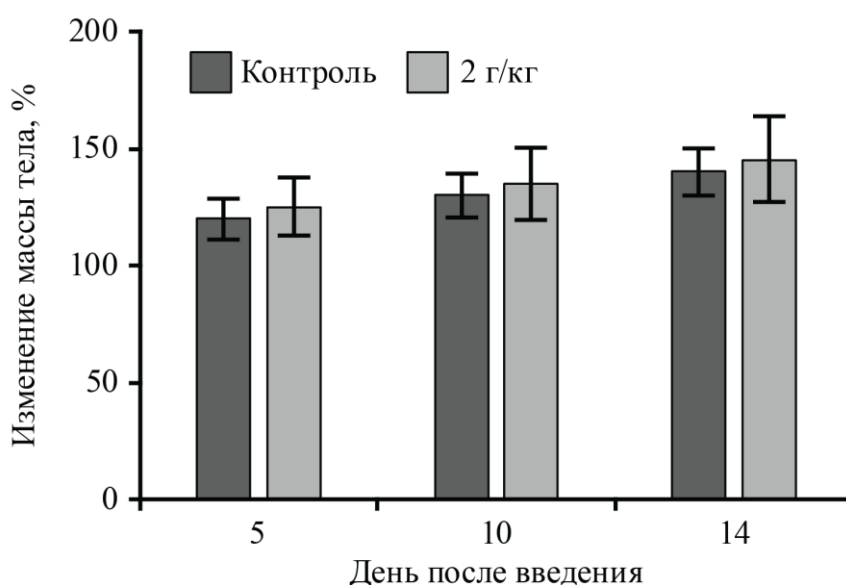


Рисунок 2.1.3 Тест на острую токсичность для **3.30**.

При проведении теста на острую токсичность на мышах с пероральной дозировкой 2 г/кг видимых признаков интоксикации не наблюдалось в течение всего эксперимента. За 14-дневный период не было выявлено отклонений во внешнем виде, состоянии шерсти, характере выделений и поведенческих реакций подопытных животных. Динамика прироста массы тела в опытной группе так же не отличалась от контрольной группы (рис. 2.1.3).

При проведении теста на субхроническую токсичность ни для одной из опытных групп (дозировки 25 и 250 мг/кг по 10 особей каждая) за 30-дневный период не было выявлено отклонений во внешнем виде, состоянии шерсти, характере выделений и поведенческих реакций подопытных животных.

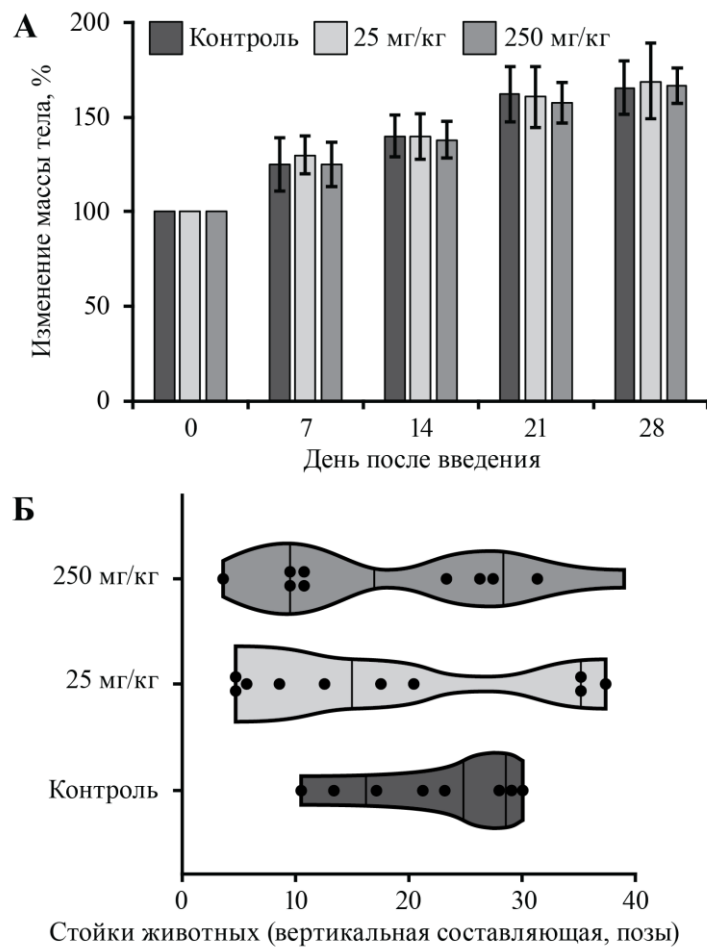


Рисунок 2.1.4 Тест на субхроническую токсичность для **3.30**: изменение массы тела (а) и двигательной активности (б).

Патологоанатомическое исследование внутренних органов (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, желудок, кишечник) показало, что за исключением печени в опытной группе не наблюдалось видимых паталогических изменений. Сердце, печень, почки и селезенка имели нормальную окраску и были умеренно полнокровными. Легкие на разрезе имели розовый цвет, надпочечники нормального размера и умеренно полнокровные. Желудок и кишечник были в норме. У большинства животных группы 250 мг/кг наблюдались множественные микроочаговые воспалительные инфильтраты в ткани печени. Кроме того, для обоих режимов дозирования не наблюдалось влияния на динамику роста массы тела и характер поведенческих реакций (рис. 2.1.4).

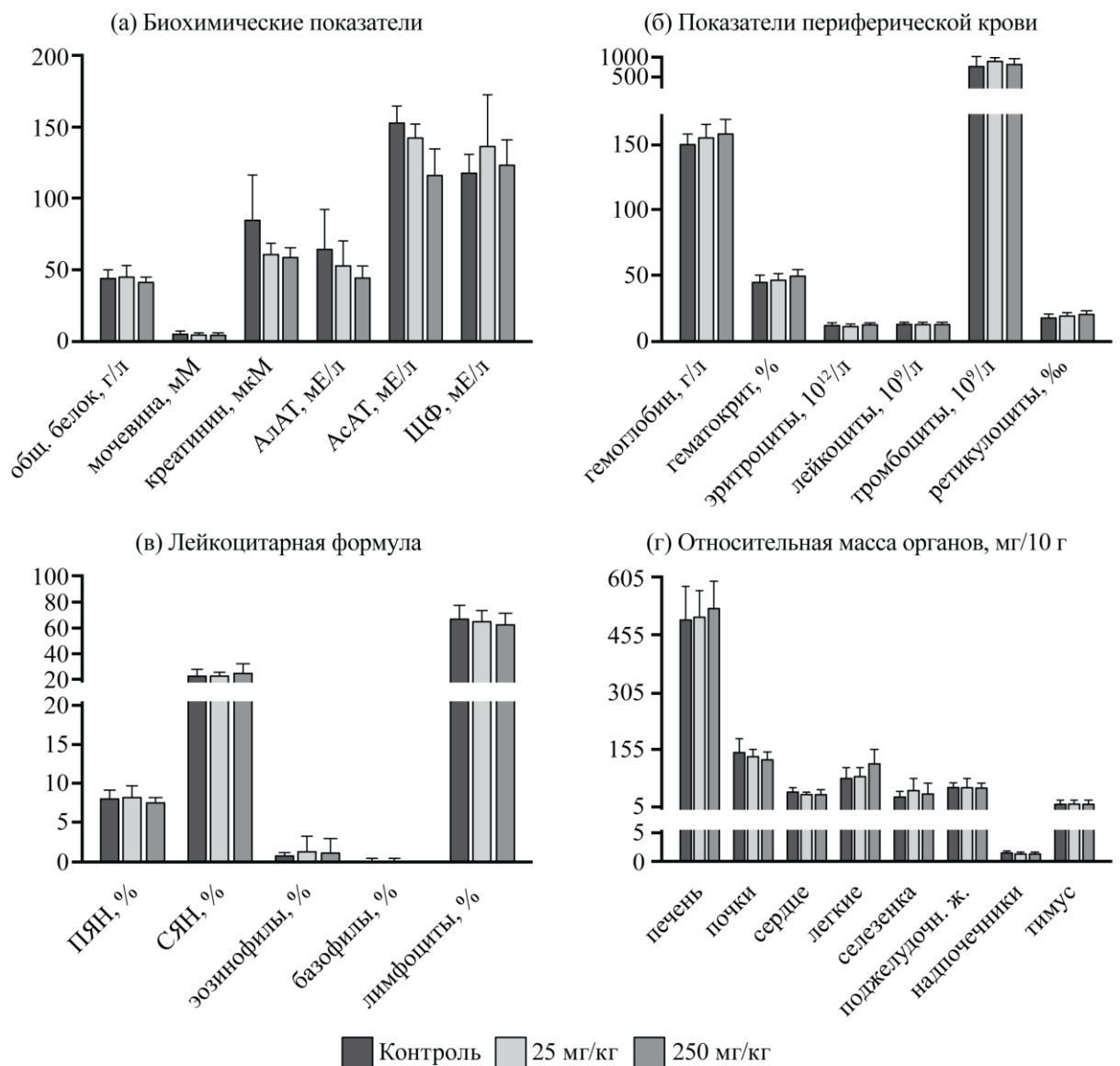


Рисунок 2.1.5 Тест на субхроническую токсичность для 3.30: показатели крови (а, б, в) и относительные массы внутренних органов (г).

Сравнительный анализ биохимических факторов и факторов периферической крови (рис. 2.1.5) не выявил статистически значимых различий кроме пониженного для дозировки 250 мг/кг уровня аспартат аминотрансферазы. Факторы, характеризующие функциональное состояние печени (общий белок, аланин аминотрансфераза, щелочная фосфатаза) не показали статистически значимых различий между опытными и контрольной группами. Не было обнаружено различий в уровнях мочевины и креатенина,

С целью объяснения повышенной активности соединения-лидера был проведен молекулярный докинг с некоторыми из структур ОТ ВИЧ, хранящихся в Protein Data Bank (PDB) (рис. 2.1.6).

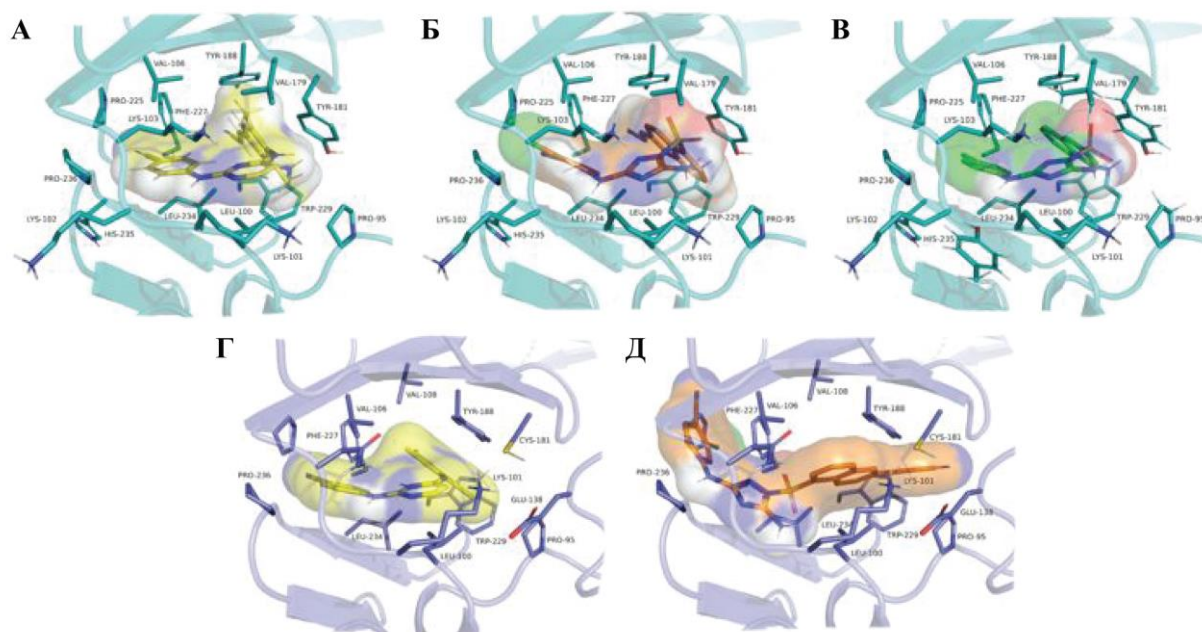


Рисунок 2.1.6 Докинг рилпивирина (выделено желтым, а, г), **3.30** (выделено оранжевым, б, д), **3.1** (выделено зелёным, в) с ОТ ВИЧ дикого типа (а – в) и K103N/Y181C (г, д).

Изначально был произведен докинг **3.1** с кристаллической структурой ОТ дикого типа ВИЧ (PDB 3MEC), показавший хорошее связывание (оценка

LibDock 140,36), перекрывающееся по предсказанным взаимодействиям с рилпивиринном (оценка 155,131). Докинг **3.30** так же показал схожее с рилпивиринном позиционирование как для дикого, так и для мутантного K103N/Y181C (PDB 4G1Q) штаммов (оценки 180,457 и 160,344 соответственно). В качестве контроля был проведен докинг рилпивиринна с ОТ дикого типа (оценка 142,101). Для **3.30** было обнаружено, что несколько важных взаимодействий сохраняются между рассчитанным положением молекулы и положением RPV в кристалле комплекса с ОТ [147], включая гидрофобные взаимодействия между акрилонитрильной группой и аминокислотными остатками W229, Y188, F227 и L234, π - π -взаимодействие с Y181/Y188 и образование водородной связи с K101. Данное исследование показало, что эти же типы взаимодействий должны наблюдаться и для **3.30** несмотря на его структурное отличие от рилпивиринна. Наложение рилпивиринна и **3.30** так же показывает значительное перекрывание их π -систем, доноров и акцепторов водородных связей и гидрофобных заместителей. Кроме того, докинг **3.30** с мутантным K103N/Y181C показал, что в отсутствии Y181 уравнивающее взаимодействие образуется, как и в случае рилпивиринном, с Y183.

2.1.8 Визуализация по алгоритму t-SNE

Для оценки новизны пространства химических свойств исследуемых соединений была использована методика визуализации, снижающая размерность молекулярных дескрипторов ECFP6 [294], с использованием алгоритма стохастического вложения соседей с распределением Стьюдента (t-SNE). Было проведено сравнение пространства химических свойств двух крупных библиотек протестированных на ингибирование ВИЧ соединений, собранных из различных источников [287] (оригинальные исследования, базы данных ChEMBL [295] и NIAD [296]) (рис 2.1.9). Эти соединения были оценены с точки зрения общего ингибирования ВИЧ и ингибирования ОТ ВИЧ. Исходя из графиков t-SNE можно сделать вывод, что исследованные

соединения можно выделить в уникальное пространство свойств по сравнению с ранее собранными массивами данных, содержащих ок. 19000 соединений, эффективных против ВИЧ в клетках и ок. 5700 соединений, эффективных против ОТ. Кроме того, исследованные соединения не пересекаются с ненуклеозидными ИОТ, допущенными к клиническому применению.

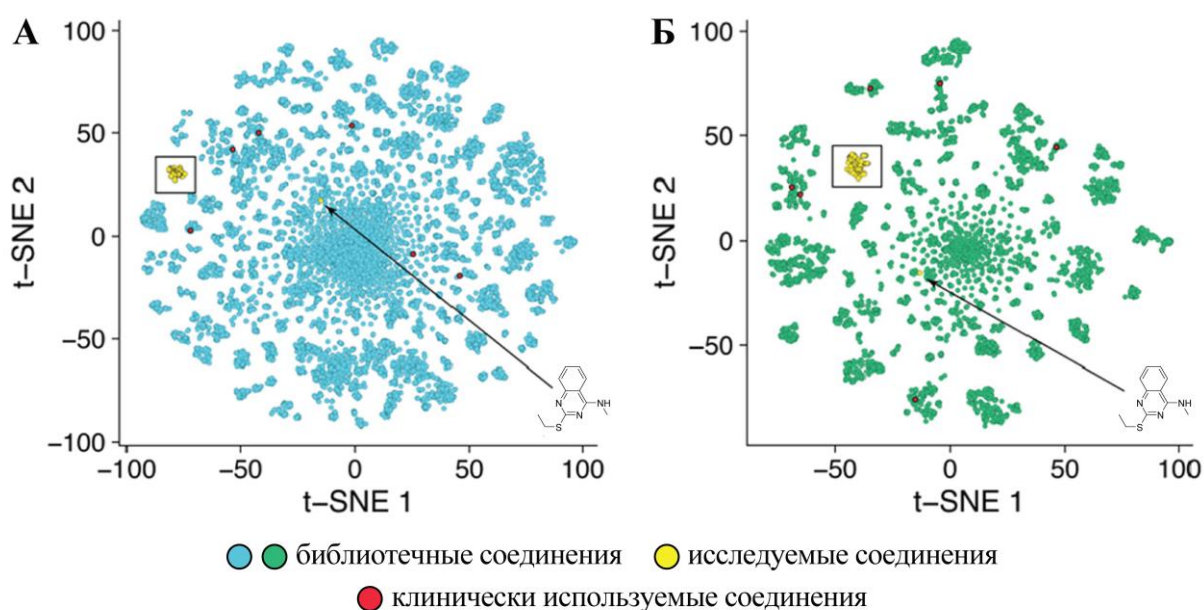


Рисунок 2.1.7 t-SNE анализ ингибирования ВИЧ (а) и ОТ ВИЧ (б).

2.1.9 Выводы по разделу 2.1

Таким образом, описан синтез серии эффективных ингибиторов ВИЧ на основе N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминового ядра, многие из которых обладают пикомолярной активностью в клетках TZM-bl при низкой цитотоксичности. С помощью t-SNE анализа показано отличие исследованных соединений как от клинически применяемых, так и от других соединений, изученных ранее. Многие из исследованных соединений сохраняют активность против мутантного штамма K103N/Y181C, а соединение-лидер **3.30**, кроме того, сохраняет активность и против других клинически значимых мутантов (Y181C, L100I/K103N, K103N). Как и прочие ненуклеозидные ИОТ, исследованные соединения обладают низкой

растворимостью, но результаты исследования фармакокинетики показали, что это значимо не снижает их биодоступность при пероральном введении. Кроме того, соединение-лидер **3.30** легко проникает через гематоэнцефалический барьер, но при этом у него не наблюдается значимой токсичности (в особенности, нейротоксичности, характерной для ИОТ [297]).

2.2 Новый класс ингибиторов нейраминидазы пирроло[2,3-*e*]индазол

В ходе фенотипического скрининга лабораторной библиотеки химических соединений было обнаружено, что ранее не изучавшийся класс пирроло[2,3-*e*]индазолов предотвращает репликацию вируса гриппа. Исследование химического пространства пирроло[2,3-*e*]индазолов привело к идентификации двух потенциально значимых соединений, отличающихся хорошей переносимостью клетками почек собаки Мадина-Дарби (MDCK) и способностью подавлять репликацию штаммов H1N1 и H3N1. Кроме того, данные соединения способны подавлять как вирусную, так и пневмококковую NA.

2.2.1 Синтез

Для изучения зависимости структура-активность был синтезирован (схема 2.2.1) ряд пирроло[2,3-*e*]индазолов с различными заместителями с использованием реакции аза-Неницеску по методике Любчанской [298,299]. Коммерчески доступный 1,4-бензохинон **4.i.1** вводят в реакцию с соответствующими фенилгидразонами бензальдегида **4.i.2** с образованием гидрохиноновых аддуктов **4.i.3**. Последующее окисление водным раствором ферроцианида натрия в присутствии карбоната натрия приводит к образованию индазолохинонов **4.i.4** [299]. Эти промежуточные соединения затем вводятся в реакцию с соответствующими коммерчески доступными аминокротоновыми эфирами **4.i.5** в среде уксусной кислоты в присутствии уксусного ангидрида с циклизацией в искомые пирроло[2,3-*e*]индазолы **4.1–4.11** [298].

Защита 5-гидроксильной группы в 8-фенилзамещенных пирролоиндазолах **4.2** и **4.3** ацетилом с образованием пирроло[2,3-*e*]индазолов **4.12** и **4.13** соответственно и последующим бромированием последних бромсукцинимидом в присутствии перекиси бензоила дает соответствующие 2-бромметильные производные **4.i.6**. Дальнейшее нуклеофильное замещение пиперидином, диэтиламином или морфолином приводит к образованию 2-

замещенных производных **4.14–4.16**. Щелочной гидролиз ацетильных производных **4.14** и **4.16** дает 2-гидроксипирроло[2,3-*e*]индазолы **4.17** и **4.18**.

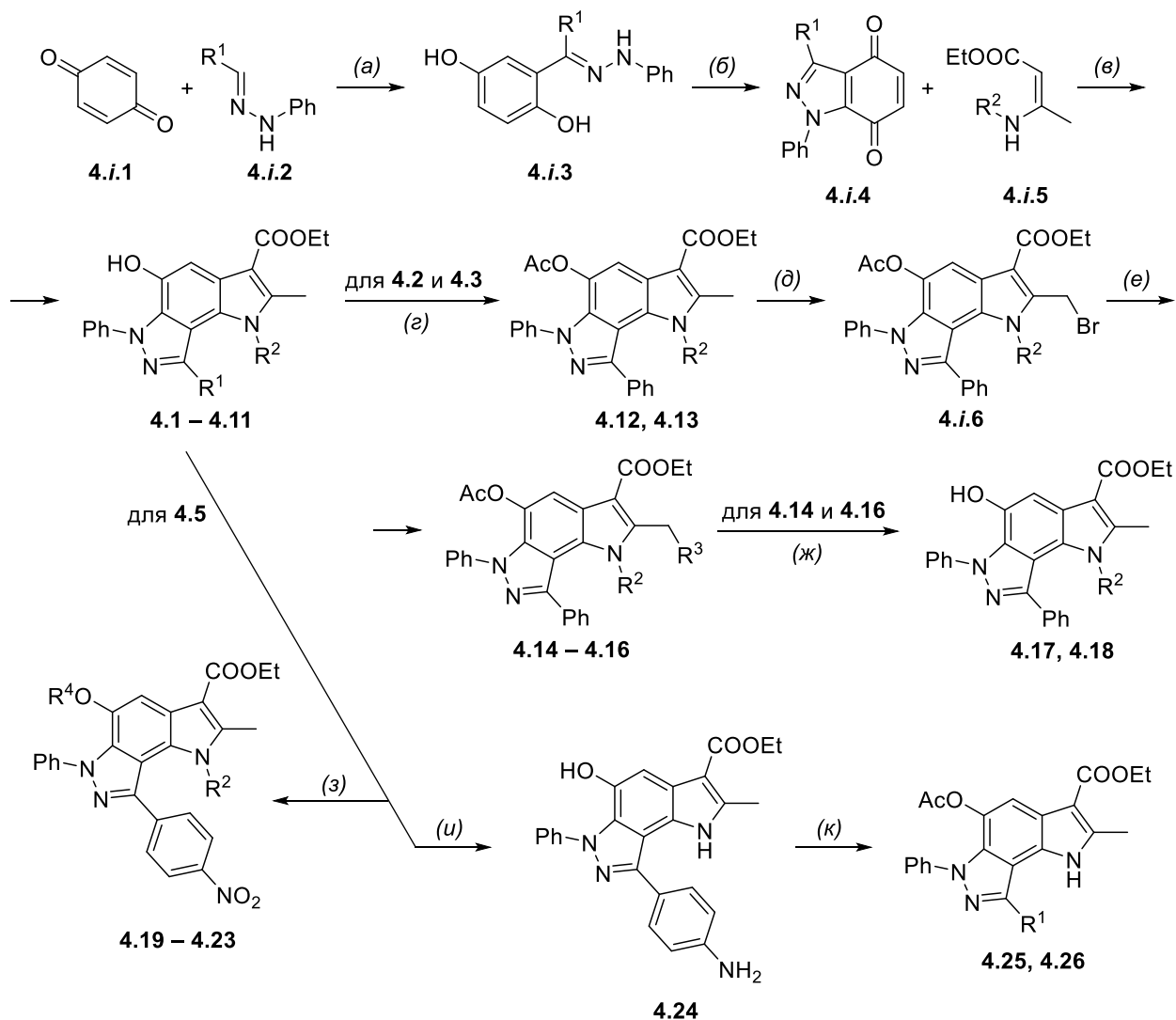


Схема 2.2.1 Общая схема синтеза: (а) ПТСК, уксусная к-та, к. т.; (б) водн. $K_4[Fe(CN)_6]$, K_2CO_3 , хлороформ, к. т.; (в) уксусный ангидрид, уксусная к-та, 55–60 °С; (з) уксусный ангидрид, кипяч.; (д) БСИ, перекись бензоила, ЧХУ, кипяч.; (е) пиперидин, диэтиламин или морфолин, бензол, кипяч.; (ж) KOH , этанол, кипяч.; (з) R^4I , K_2CO_3 , НМП или уксусный ангидрид, кипяч.; (и) H_2 , Pd/C , к. т.; (к) уксусный ангидрид, кипяч. или 2,5-диметокситетрагидрофуран, уксусная к-та, 50 °С.

Алкилированием 8-п-нитрофенилзамещенного пирролоиндазола **4.5** соответствующими алкил йодидами в присутствии карбоната калия в НМП

были получены моно- и дизамещенные производные **4.19–4.22**, его О-ацелированием уксусным ангидридом получили 5-ацетилокси-4-нитрофенилпирролоиндазол **4.23**, а восстановлением нитрогруппы каталитическим гидрированием на Pd на угле — аминифенилпирролоиндазол **4.24**. О-ацелированием последнего уксусным ангидридом получали 5-ацетилокси-8-аминофенилпирролоиндазол **4.25**, а конденсацией с 2,5-диметокситетрагидрофураном в присутствии уксусной кислоты — пирроловое производное **4.26**.

2.2.2 Рентгеноструктурный анализ

Для более детального изучения структуры полученных соединений, для **4.1** и **4.24** был проведен рентгеновский дифракционный анализ монокристаллов. Кристаллографические данные депонированы в базу данных Кембриджского центра кристаллографических данных под идентификационными номерами CCDC ID 2246679 [300] и 2249815 [301] соответственно. Визуализация кристаллографических данных приведена на рис. 2.2.1. Структурный анализ кристалла **4.1** подтвердил его идентичность как 6,8-дифенил-пирроло(2,3-*e*)индазол. Для **4.24** все длины связей и углы хорошо коррелируют с наблюдаемыми в **4.1** и других родственных соединениях. Триклинная сингония и близость размеров элементарных ячеек в обоих соединениях могут указывать на сходство их кристаллической упаковки. Оба соединения, несмотря на разное количество активных сайтов, образуют сходные центросимметричные водородосвязанные димеры. Гидроксильная группа в **4.24** участвует в образовании этих димеров аналогично соответствующей гидроксильной группе в **4.1**, при этом расстояние O1...O3 ($1-x, 2-y, 1-z$) составляет 2,705(4) Å для **4.1** и 2,711(9) Å для **4.24**. При этом аминогруппа в **4.24** не задействована в образовании водородных связей, а участвует в слабых межмолекулярных N...H...π взаимодействиях, связывающих центросимметричные димеры в лентообразные структуры.

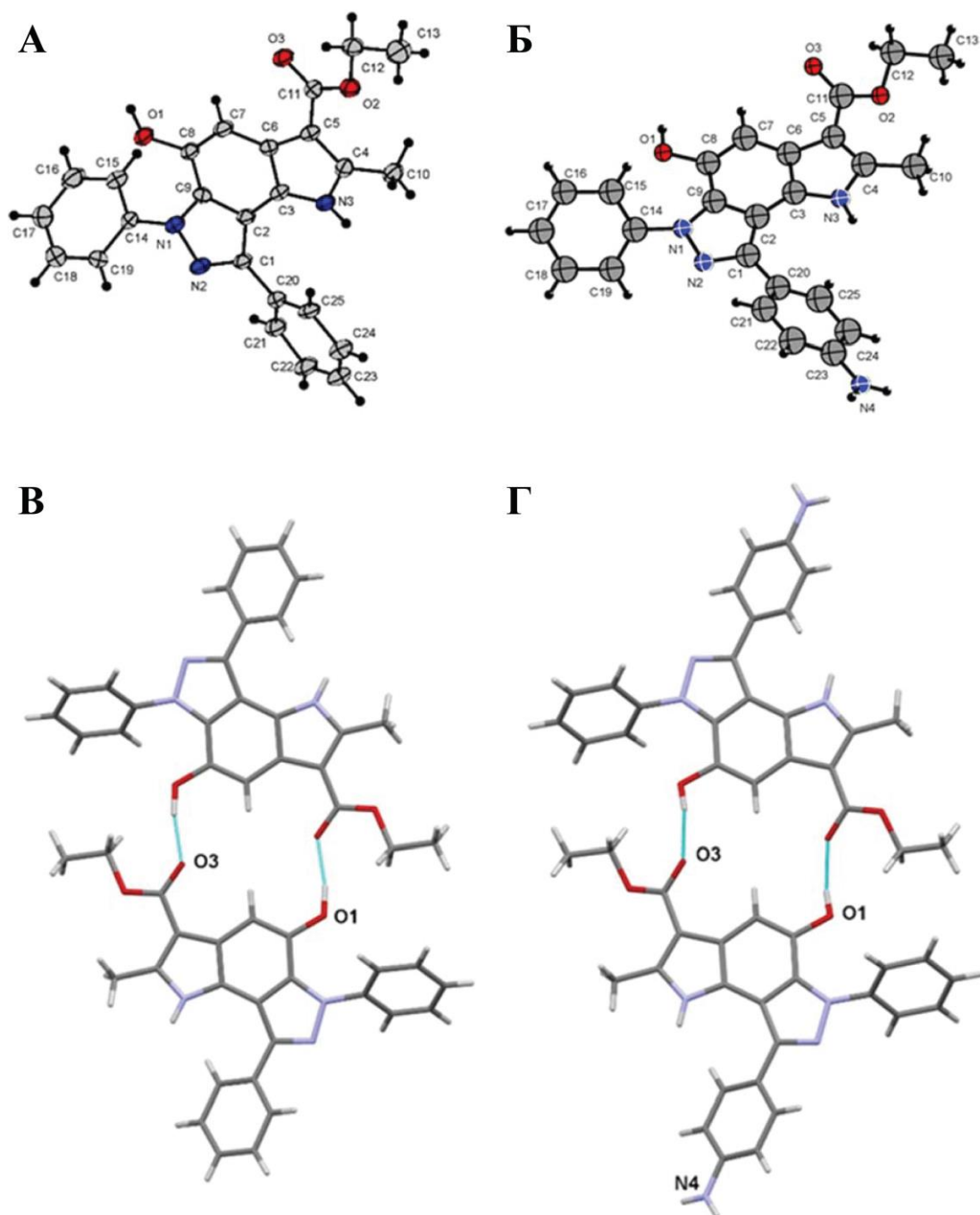


Рисунок 2.2.1 Кристаллическая структура соединений **4.1** (а) и **4.24** (б) и структура centrosимметричных димеров для **4.1** (в) и **4.24** (г), межмолекулярные водородные связи выделены циановым.

2.2.3 Противовирусный скрининг

В рамках противовирусного скрининга была проведена оценка синтезированных соединений против вируса гриппа А/НК/1/68 и вируса гриппа А/Jena/8178/09 (табл. 2.2.1).

Таблица 2.2.1 *In vitro* ингибирование вируса гриппа
(IVA HK/1/68 и IVA Jena/8178/09), все IC₅₀ в мкМ.

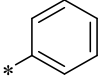
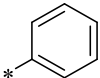
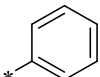
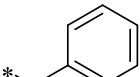
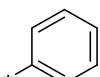
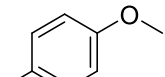
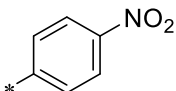
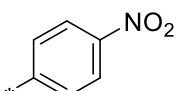
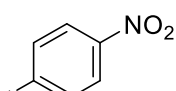
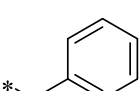
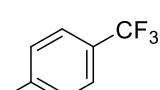
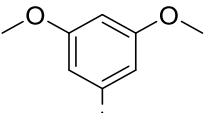
	R¹	R²	R³	R⁴	IC₅₀ HK	IC₅₀ Jena
4.1		H	H	H	неакт.	неакт.
4.2		CH ₃	H	H	неакт.	31.60
4.3			H	H	неакт.	71.09
4.4			H	H	неакт.	38.59
4.5		H	H	H	16.37	19.54
4.6		CH ₃	H	H	42.53	неакт.
4.7			H	H	неакт.	—
4.8		H	H	H	30.48	24.83
4.9		H	H	H	—	—

Таблица 2.2.1 (продолжение) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA HK/1/68 и IVA Jena/8178/09), все IC₅₀ в мкМ.

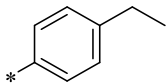
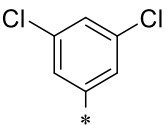
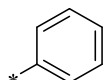
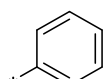
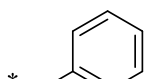
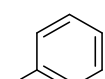
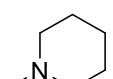
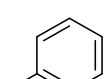
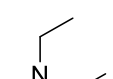
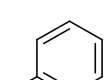
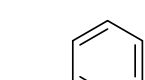
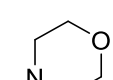
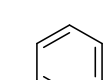
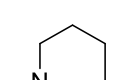
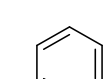
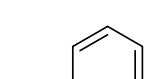
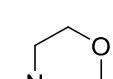
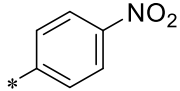
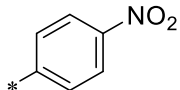
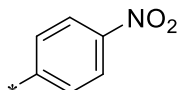
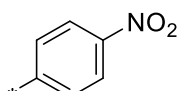
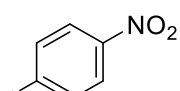
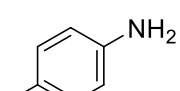
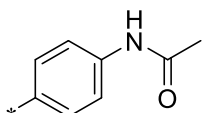
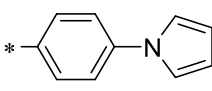
	R¹	R²	R³	R⁴	IC₅₀ HK	IC₅₀ Jena
4.10		H	H	H	52.23	—
4.11		H	H	H	30.18	—
4.12		CH ₃	H	Ac	неакт.	83.73
4.13			H	Ac	неакт.	38.66
4.14		CH ₃		Ac	неакт.	неакт.
4.15		CH ₃		Ac	неакт.	53.19
4.16				Ac	—	—
4.17		CH ₃		H	неакт.	86.70
4.18				H	неакт.	33.16

Таблица 2.2.1 (окончание) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA HK/1/68 и IVA Jena/8178/09), все IC₅₀ в мкМ.

	R¹	R²	R³	R⁴	IC₅₀ HK	IC₅₀ Jena
4.19		CH ₃	H	CH ₃	неакт.	21.52
4.20		C ₂ H ₅	H	C ₂ H ₅	неакт.	25.48
4.21		H	H	C ₂ H ₅	неакт.	30.26
4.22		H	H	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	неакт.	26.49
4.23		H	H	Ac	неакт.	16.67
4.24		H	H	H	8.54	15.69
4.25		H	H	H	9.39	14.08
4.26		H	H	H	неакт.	11.37
Озелтамивир 2.3.2					0.004	0.14
Занамивир 2.3.1					—	0.11

Все соединения с пирроло [2,3-*e*]индазоловым ядром, независимо от структурных фрагментов, не проявляли цитотоксичности в максимальной тестируемой концентрации 100 мМ для клеток MDCK. Результаты исследования взаимосвязи "структура-активность" указывают на специфическую по отношению к подтипу активность. Например, ряд соединений, содержащих различные заместители при R²–R⁴, ингибировали исключительно цитопатический эффект, вызванный A/Jena/8178/09 (4.1–4.4, 4.12, 4.13, 4.16, 4.17–4.23, 4.26), в то время как пирролоиндазолы со стерически ненагруженной группой при R² (4.6) или без заместителей при R²–R⁴ (4.10, 4.11) проявляли активность лишь против A/HK/1/68. Активность против обоих штаммов проявляли соединения без заместителей при R²–R⁴ (за исключением 4.25) с фенильным заместителем при R¹, содержащим нитро-, amino- или трифторметильную группу в *para*-положении (4.5, 4.6, 4.24). В качестве контроля использовались озельтамивир и занамивир.

2.2.4 Тесты на ингибирование нейраминидазы

С целью определения мишени действия синтезированных соединений был проведен анализ ингибирования A/Jena/8178/09 на основе эритроцитов человека. Вирусный гемагглютинин вызывает гемагглютацию эритроцитов при 4 °С, которая подавляется вирусной нейраминидазой при 37 °С, соответственно ингибиторы гемагглютенина будут подавлять гемагглютацию, в то время как ингибиторы нейраминидазы — ее подавление. За исключением 4.25 (гемагглютация при 31,6 мкМ), все синтезированные соединения слабо или не подавляли гемагглютацию, но подавляли нейраминидазную активность (табл. 2.2.2). Наибольшую активность показали 4.8, 4.19, 4.23, 4.24 и 4.26 со значениями IC_{min} в диапазоне 14,20–24,40 мкМ. Единственным исключением является соединение 4.14, которое не проявляет ни нейраминидазное ингибирование, ни подавление вирусной репликации.

Таблица 2.2.2 Активность по отношению к нейраминидазам гриппа А и *S. Pneumoniae*, все IC_{min} в мкМ.

	IC _{min} IAV	IC _{min} <i>S.p.</i>		IC _{min} IAV	IC _{min} <i>S.p.</i>
4.1	70.00	31.60	4.15	77.20	24.40
4.2	31.60	31.60	4.17	54.40	31.60
4.3	77.20	24.40	4.18	54.40	10.00
4.4	54.40	17.20	4.19	24.40	31.60
4.5	54.40	14.32	4.20	77.20	54.40
4.6	77.20	31.60	4.21	47.20	54.40
4.8	24.40	10.0	4.23	17.20	10.00
4.12	100.00	31.60	4.24	21.40	10.00
4.13	100.00	31.60	4.25	14.20	неакт.
4.14	неакт.	54.40	4.26	24.40	10.00
Озельтамивир	1.97	2.08 [†]	Занамивир	3.16	неакт. [†]

Исторические данные и несколько систематических обзоров показывают, что существенная часть летальных случаев во время пандемий гриппа была вызвана не первичной инфекцией, а вторичной бактериальной пневмонией, вызываемой преимущественно *S. pneumoniae* [303–311]. При этом структурное сходство между активными центрами нейраминидаз гриппа и пневмококка позволяет предполагать, что низкомолекулярный ингибитор будет в равной степени действовать на обе нейраминидазы [312,313]. Действительно, озельтамивир (но не занамивир) проявляет двойную активность [302,314]. В связи с этим для синтезированных соединений был дополнительно проведен анализ ингибирования нейраминидазы NanA *S. Pneumoniae* штамма DSM20566. За исключением **4.25**, все протестированные

[†] Литературные данные [302].

соединения ингибировали фермент в умеренных концентрациях, при этом наибольшую активность показали **4.8**, **4.18**, **4.23**, **4.24** и **4.26** со значением IC_{min} 10,0 мкМ (табл. 2.2.2). Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что наиболее перспективными представляются соединения **4.8** и **4.24** как обладающие существенной двойной ингибирующей активностью.

2.2.5 Докинг

Классические ингибиторы NA, такие как озельтамивир и занамивир, содержат общую структурную особенность — карбоксильную группу, захватывающую три гуанидиновые группы в аргининовых остатках активного центра [315–317]. Этот структурный мотив схож с переходным состоянием, образующимся в активном центре NA при расщеплении сialовой кислоты гликоконъюгатов [318]. Исследуемые соединения, напротив, не содержат ни только карбоксильных заместителей, но и каких-либо других анионных групп. Вследствие этого поиск сайта связывания представляется сложной задачей, тем более что исследуемые соединения активны против как вирусных, так и бактериальных NA и, следовательно, должны одинаково стабильно связываться с обоими белками.

Изначально был проведен докинг **4.24** по широкой области вокруг активных центров вирусной (A/Jenna/8178/09) и бактериальной (NanA) нейраминидаз, а полученные комплексы смоделированы методами классической молекулярной динамики. Большинство комплексов диссоциировало менее чем через 10 нс, но был обнаружен один сайт связывания, стабильный для обеих NA в течение более чем 100 нс. Несмотря на низкое сходство аминокислотных последовательностей вирусного и бактериального белков, характер связывания **4.24** с ними схож (рис. 2.2.2). Соединение **4.24** закреплено двумя водородными связями: с карбоксильной группой в D417 для NanA и в E228 для вирусной NA, и с положительно заряженной боковой цепью в R366 для NanA и в R156 для вирусной NA. Важно отметить, что этот аргинин не входит в число тех, что отвечают за связывание

субстратом карбоксилата. Соединение **4.24** и его аналоги так же имеют гидрофобные фрагменты, комплиментарные гидрофобным фрагментам сайтов связывания NA.

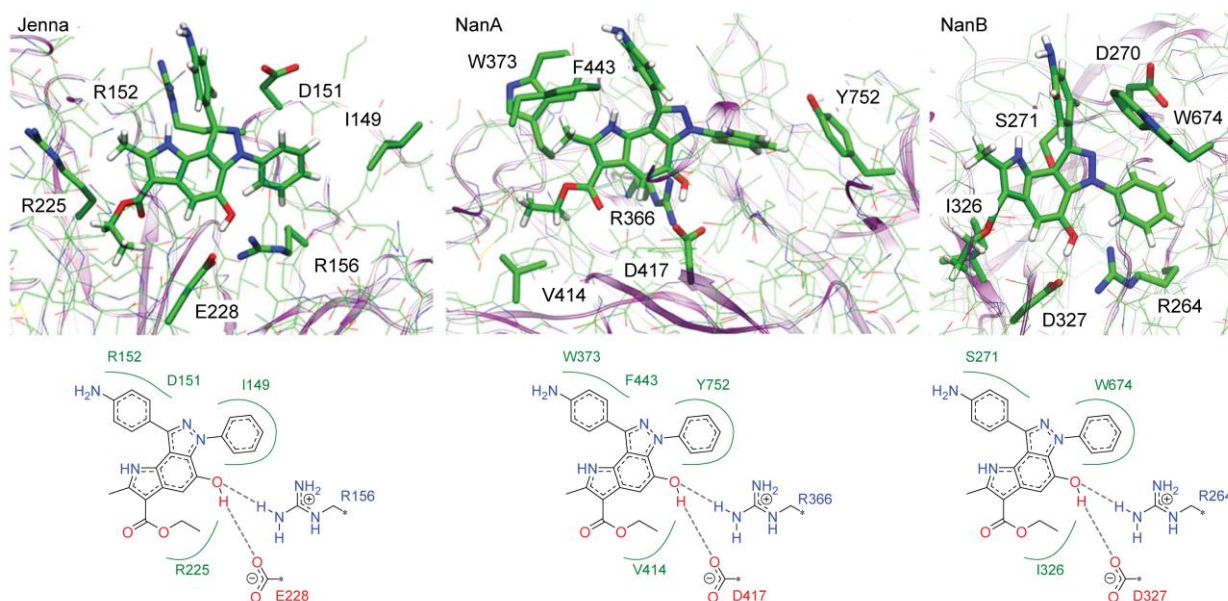


Рисунок 2.2.2 Визуализация комплексообразования между **4.24** и нейраминидазами A/Jenna/8178/09 (слева) и *S. pneumoniae* NanA (по центру) и NanB (справа). Водородные связи показаны серым пунктиром, гидрофобные взаимодействия обозначены зеленым.

Другой важной бактериальной NA является NanB. Было проверено, сохраняется ли сайт связывания между NanA и NanB. Для NanB был воссоздан аналогичный режим связывания, и было обнаружено, что комплекс остается стабильным, и наблюдаются схожие с NanA и вирусной NA структурные закономерности (рис. 2.2.2). Таким образом предполагается, что **4.24** так же способно ингибировать NanB, но для подтверждения этого необходимы дополнительные *in vivo* исследования.

2.2.6 Ингибирование планктонного роста и образования биопленок

В некоторых работах сообщалось, что пневмококковая NA может влиять на образование биопленок [319,320], из чего можно сделать вывод о том, что, возможно, ингибиторы NA могут подавлять образование биопленок

S. pneumoniae. Ранее наблюдалось, что некоторые ингибиторы НА способны подавлять планктонный рост и образование биопленок. В то же время, подобное подавление не наблюдается для озельтамивира и занамивира (табл. 2.2.3) [321–323]. Аналогично, для большинства исследуемых соединений не наблюдалось значимого подавления планктонного роста и/или образования биопленок у *S. pneumoniae*, за исключением активных против бактериальной NanA соединений **4.3**, **4.8**, **4.17**, **4.18** и **4.26** (табл. 2.2.3), при этом отсутствуют достаточные доказательства того, что подавление вызвано именно ингибированием этими соединениями нейраминидазы.

Таблица 2.2.3 Ингибирование планктонного роста (ПР) и образования биопленок (БП) у *S. Pneumoniae*, все значения IC₅₀ в мкМ.

	IC ₅₀ ПР	IC ₅₀ БП
4.3	8.90	0.93
4.8	50.00	40.13
4.17	6.88	3.31
4.18	7.57	неакт.
4.26	неакт.	28.04
Озельтамивир	неакт.	неакт.
Занамивир	неакт.	неакт.

2.2.7 Выводы по разделу 2.2

Таким образом, был обнаружен новый класс молекулярных ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа А, пирроло[2,3-*e*]индазолы. По результатам исследования взаимосвязи структура-активность, наличие R¹-фенильного кольца, содержащего *пара*-нитро-, amino- или трифторметильную группу, является важным для ингибирования штаммов H3N2 и H1N1. Терапевтическое преимущество пирроло[2,3-*e*]индазол может заключаться в их двойной активности против вирусной и структурно родственной

стрептококковой нейраминидаз. Молекулярное и молекулярно-динамическое моделирование показало, что этиловый эфир, гидроксильные группы и пирроло[2,3-*e*]индазольное ядро отвечают за образование стабильных комплексов с активными центрами как вирусных, так и бактериальных нейраминидаз. Некоторые пирроло[2,3-*e*]индазолы также способны ингибировать бактериальный рост. Совокупность результатов позволяет сделать вывод, что исследованные пирроло[2,3-*e*]индазолы представляют новые перспективные соединения, заслуживающие дальнейшей разработки.

2.3 Ингибиторы нейраминидазы на основе 3-индолинонового ядра, использующие в качестве мишени полость-430

Помимо собственно каталитической полости, связывающей с последующим расщеплением гликозидной связи остаток сиаловой кислоты олигосахаридного субстрата (полость-SA), активный центр нейраминидазы вируса гриппа А так же содержит так называемые полости 150 и 430, которые, по-видимому, играют важную роль в динамическом процессе связывания лигандов и представляют существенный интерес для рационального дизайна ингибиторов НА [324–328]. Полость-150 образуется петлёй из аминокислотных остатков 147–152 у нейраминидаз вирусов подтипов N1 и, по-видимому, закрывается в ответ на связывание занамивира и озельтамивира [192,324]. В то же время, ее отсутствие в кристаллической структуре НА подтипов N2 и N1 образца 2009 г. [329] означает, что ингибиторы, нацеленные на эту полость, будут эффективны только против конкретный подтипов вируса. С другой стороны, идентифицированная в области аминокислотных остатков 430-439 с использованием вычислительного картирование растворителем полость-430 [325,330], присутствует как в подтипе N1, так и в подтипе N2 (рис. 2.3.1).

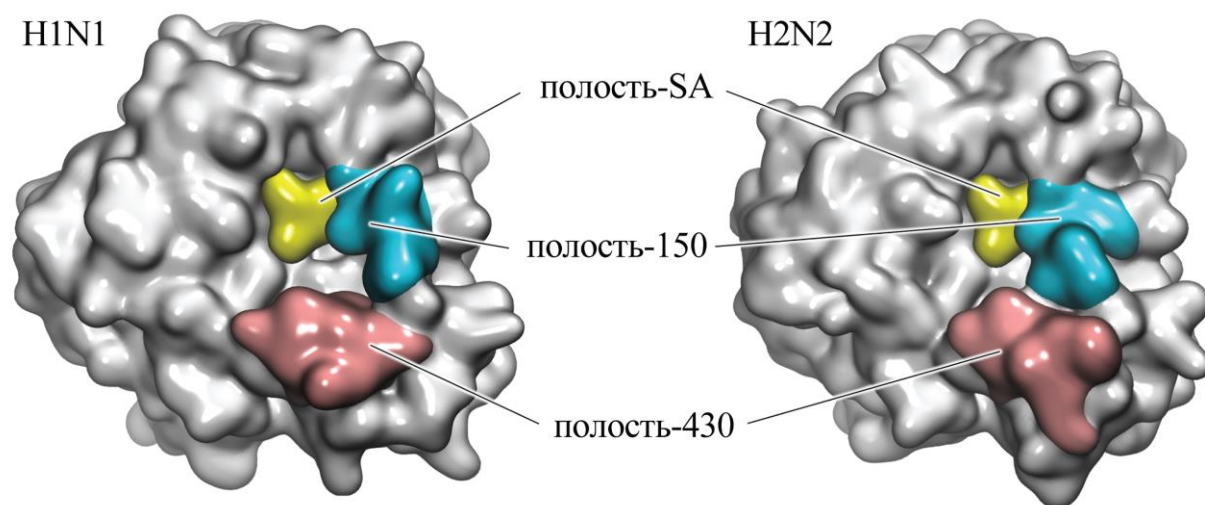


Рисунок 2.3.1 Локализация полостей активного центра нейраминидаз H1N1 (PDB ID 3BEQ [324]) и H2N2 (PDB ID 3TIC [331]).

Молекулярно-динамическое моделирование NA H5N1 указывает на то, что эта полость может взаимодействовать с остатком сиаловой кислоты и озельтамивиром, влияя таким образом на их связывание [332–334]. Было предпринято несколько попыток разработать низкомолекулярные ингибиторы NA, использующие в качестве мишени полость-430, но эти исследования, в основном, были сосредоточены на модификации занамивира и озельтамивира [335–340]. В рамках диссертационного исследования на основании данных анализа лабораторной химической библиотеки против NA был предложен класс соединений на основе 3-индолинонового ядра, который, по данным молекулярно-динамического моделирования, связывается с полостью-430.

2.3.1 Общая стратегия исследования

В ходе фенотипического скрининга лабораторной библиотеки химических соединений было обнаружено, что ряд 3-индолинонов **5.1–5.4** (табл. 2.3.2) способны ингибировать нейраминидазу вируса гриппа A H1N1 PR/8/34 в микромолярных концентрациях. С целью установления сайта связывания для этих соединений была проведена симуляция с использованием методов молекулярной динамики, используя в качестве субстрата кристаллическую структуру комплекса занамивира с полостью-SA NA [324] (рис. 2.3.1), предсказавшая связывание с полостью-430 для всех исследуемых соединений.

Дополнительно было произведено сравнение поверхностей основных полостей активного центра NA H1N1 с целью определения структурных характеристик потенциальных низкомолекулярных ингибиторов, обуславливающих связывание с полостью-430 (табл. 2.3.1). Полость-SA наиболее полярна и несколько превышает по объему две другие полости вместе взятые. Полость-150 обладает наименьшим объемом, несколько более гидрофобна и характеризуется высоким отношением площади поверхности, доступной для полярных растворителей (ППДР), к общей доступной площади полости. Полость-430 сформирована гидрофобными аминокислотными

остатками R326, W403, I427, R431 и заряженными остатками R371, K432 и, соответственно, наименее полярна. Метильные группы боковых цепей R371 и K432 интегрированы в гидрофобный карман, в то время как заряженные гуанидиновые и аминогруппы ориентированы в сторону полости-SA и основного объема растворителя. Совокупность этих факторов благоприятствует связыванию с полостью-430 гидрофобных малых молекул, подобных приведенным в табл. 2.3.1.

Таблица 2.3.1 Сравнение поверхностей полостей активного центра нейраминидазы H1N1

Полость	ППДР, Å ²			Объем, Å ³
	Полная	Полярная	Неполярная	
SA	444	310 (70%)	134 (30 %)	870
150	223	131 (59%)	92 (41%)	336
430	286	129 (45%)	157 (55%)	510

2.3.2 Синтез

Основываясь на предварительных данных *in vitro* ингибирования и анализа поверхности, был синтезирован ряд замещенных 3-индолинонов (табл. 2.3.2), общая схема синтеза приведена на схеме 2.3.1. Первая группа соединений содержит гидрофобные заместители в 1 положении. Во второй группе соединений были проварьированы различные гидрофобные заместители в 2-(фениламино)метиленовом фрагменте исходя из предположения, что подобные модификации могут быть полезны для усиления антинейраминидазной активности. Третья группа соединений содержит гидрофобные хлор- или метокси-заместители в 5 положении. Дополнительно было изучено влияние незначительных изменений в структуре ядра на активность.

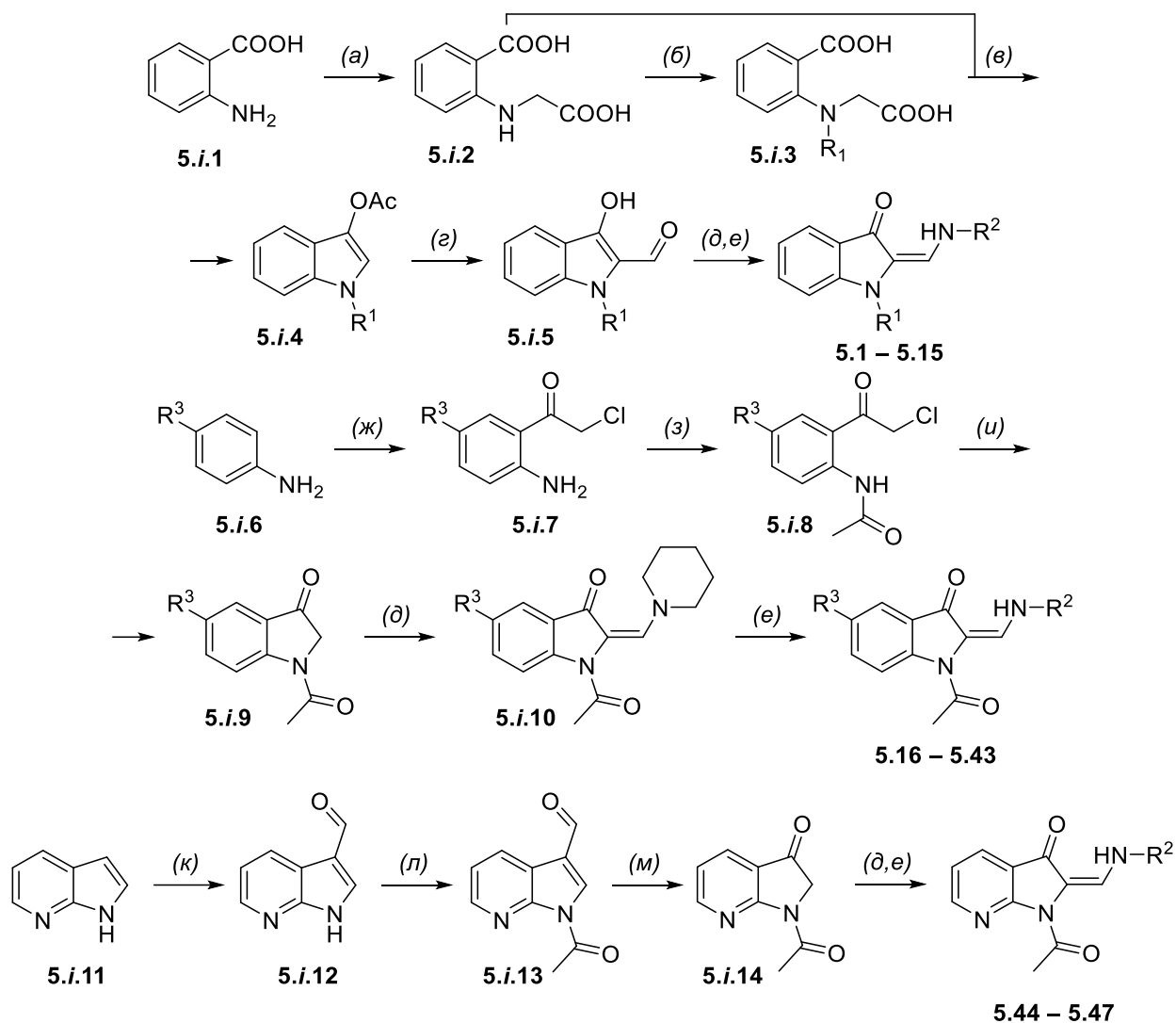


Схема 2.3.1 Общая схема синтеза: (а) хлоруксусная кислота, Na_2CO_3 , вода; (б) метилиодид или уксусный или пропионовый ангидрид, Na_2CO_3 , вода; (в) уксусный ангидрид, триэтиламин; (г) оксихлорид фосфора, ДМФА, 60 °С, затем гидроксид калия, 0 °С; (д) пиперидин, диметилацеталь пиперидин-карбоксальдегида, бензол, к. т.; (е) R^2 -анилин, уксусная к-та, изопропанол; (ж) хлорацетонитрил, BCl_3 , AlCl_3 , 0 °С, затем к. т.; (з) уксусный ангидрид, 80–85 °С; (и) NaN , ДМЭ, 0 °С, затем к. т.; (к) гексаметиленetetрамин, 33% уксусная к-та, кипяч.; (л) уксусный ангидрид, триэтиламин, ДМАП, к. т.; (м) *м*-хлорнадбензойная кислота, дихлорметан, 0 °С, затем к. т.

Часть целевых соединений, 2-ариламинометилениндолин-3-оны **5.1–5.3** и 1-ацетил-2-ариламинометилениндолин-3-оны **5.6–5.8** были

синтезированы по методикам, описанным Рябовой [341]; 2-бензиламинометилениндолин-3-он **5.4** был синтезирован по методике, описанной Исаковичем [342]; 2-(4-метоксифенил)аминометилен-1-метилендолоин-3-он **5.5** был синтезирован по методике, описанной Ситкиной [343]. Все физико-химические свойства синтезированных соединений соответствуют литературным данным.

Общая схема синтеза приведена на схеме 2.1.1. 1-замещенные 2-ариламинометилениндолонил-3-оны **5.1–5.15** были синтезированы в 4 стадии. Коммерчески доступная антрониловая кислота **5.i.1** вводится в реакцию с хлоруксусной кислотой в присутствии карбоната натрия в воде с образованием *N*-(2-карбоксифенил)глицина **5.i.2**, который затем опционально *N*-ацилируется уксусным или пропионовым ангидридом или *N*-ацилируется метилиодидом с образованием соответствующей замещенной кислоты **5.i.3**. Дальнейшая обработка уксусным ангидридом в присутствии триэтиламина приводит к внутримолекулярной циклизации с образованием замещенного индола **5.i.4**, который затем реакцией Вильсмейера-Хаака переводят в индолин-3-ол **5.i.5**, образование енаминокетона из которого под действием диметилацетата пиперидинкарбоксальдегида с последующим *in situ* трансаминированием последнего приводит к образованию целевых 3-индолинонов **5.1 – 5.15**.

Для получения 1-ацетил-3-индолинонов **5.16–5.43** данная схема была незначительно изменена. Так, 5-замещенные 2-аминохлорацетофеноны **5.i.7** получают ацилированием соответствующего коммерчески доступного замещенного анилина **5.i.6** с использованием хлорацетонитрила в присутствии треххлористого бора и/или хлорида алюминия в качестве кислот Льюиса. Дальнейшее ацетилирование уксусным ангидридом приводит к образованию *N*-ацетамидов **5.i.8**, претерпевающих внутримолекулярную циклизацию в основных условиях в ДМЭ при комнатной температуре с образованием *N*-ацктилированных 3-индолинонов **5.i.9**. Реакция последних с диметилацеталем

пиперидинкарбосальдегида в бензоле приводит к образованию выделяемых енаминкетонов **5.i.10**, реакцией которых с замещенными анилинами получают целевые 1-ацетил-3-индолиноны **5.16–5.43**.

Для исследования влияния введения атома азота в бензольное кольцо 3-индолинона дополнительно было синтезировано четыре 7-азаиндол-3-она **5.44–5.47**. 7-азаиндол **5.i.11** переводят в карбосальдегид **5.i.12** в условиях реакции Даффа с последующим *N*-ацетилированием с образованием промежуточного продукта **5.i.13**. Это формильное производное окисляют *m*-хлорпероксибензойной кислотой с образованием 1-ацетил-1,2-дигидро-3*H*-пирроло-[2,3-*b*]пиридин-3-она **5.i.13**, из которого целевые 3-индолиноны **5.44 – 5.47** получают через образование енаминокетона с его последующим *in situ* трансаминированием.

2.3.3 Анализ зависимости «структура – активность»

Все новые производные 3-индолинона были протестированы на ингибирующую активность против нейраминидазы вируса гриппа А с использованием хемолюминесцентного анализа (табл. 2.3.2). Поскольку соединения **5.1–5.4** слабо ингибируют НА, с целью повышения активности был введен ряд заместителей по 1 положению. Введение метильной группы (**5.5**) слегка повышает ингибирование, в то время как соединения с ацетильным (**5.6–5.11**) или пропионильным (**5.12–5.15**) заместителем существенно повышают антинейраминидазную активность, из чего можно сделать вывод о необходимости наличия объемного заместителя в этом положении.

Учитывая одинаковую активность 1-ацетил и 1-пропионил-3-индолинонов, дальнейшие исследования были сфокусированы на ацетил-замещенных соединениях. С целью определения влияния различных гидрофобных заместителей в 2-фениламинометиленовом фрагменте были изучены 3-индолиноны **5.16–5.39**. При введении двух или трех атомов фтора по различным положениям бензольного кольца (**5.16–5.19**) значимой антинейраминидазной активности не наблюдалось.

Таблица 2.3.2 *In vitro* ингибирование NA вируса гриппа
(IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

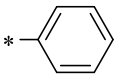
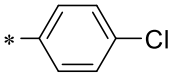
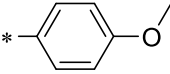
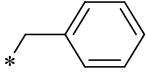
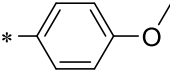
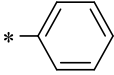
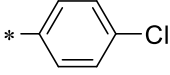
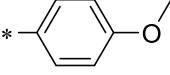
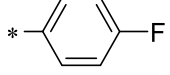
	R¹	R²	R³	*7	IC₅₀
5.1	H		H	C	5.36
5.2	H		H	C	1.85
5.3	H		H	C	3.01
5.4	H		H	C	12.92
5.5	CH ₃		H	C	1.00
5.6	COCH ₃		H	C	0.37
5.7	COCH ₃		H	C	1.39
5.8	COCH ₃		H	C	0.24
5.9	COCH ₃		H	C	0.34

Таблица 2.3.2 (продолжение) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

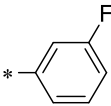
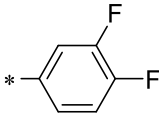
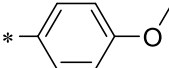
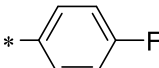
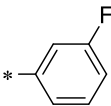
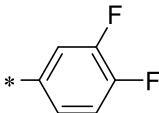
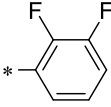
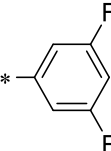
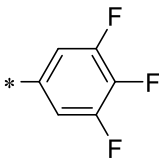
	R¹	R²	R³	*7	IC₅₀
5.10	COCH ₃		H	C	0.03
5.11	COCH ₃		H	C	0.47
5.12	COC ₂ H ₅		H	C	0.73
5.13	COC ₂ H ₅		H	C	0.43
5.14	COC ₂ H ₅		H	C	0.23
5.15	COC ₂ H ₅		H	C	0.30
5.16	COCH ₃		H	C	0.95
5.17	COCH ₃		H	C	0.53
5.18	COCH ₃		H	C	1.00

Таблица 2.3.2 (продолжение) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

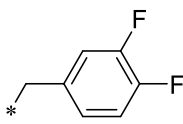
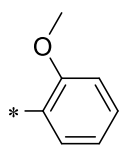
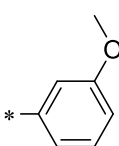
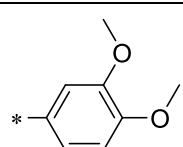
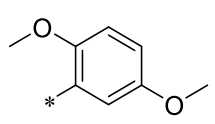
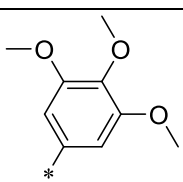
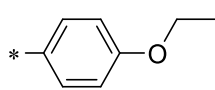
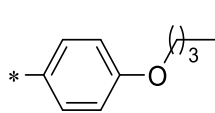
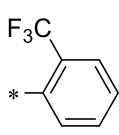
	R¹	R²	R³	*7	IC₅₀
5.19	COCH ₃		H	C	0.96
5.20	COCH ₃		H	C	1.08
5.21	COCH ₃		H	C	0.37
5.22	COCH ₃		H	C	25.22
5.23	COCH ₃		H	C	0.99
5.24	COCH ₃		H	C	2.71
5.25	COCH ₃		H	C	0.62
5.26	COCH ₃		H	C	0.42
5.27	COCH ₃		H	C	0.77

Таблица 2.3.2 (продолжение) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

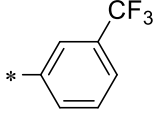
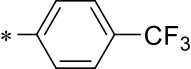
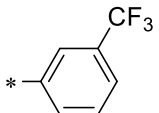
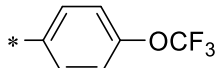
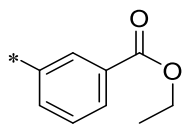
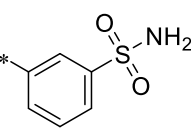
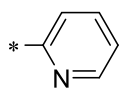
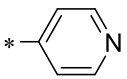
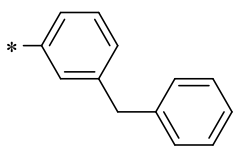
	R¹	R²	R³	*7	IC₅₀
5.28	COCH ₃		H	C	11.79
5.29	COCH ₃		H	C	9.28
5.30	COCH ₃		H	C	0.20
5.31	COCH ₃		H	C	5.13
5.32	COCH ₃		H	C	0.28
5.33	COCH ₃		H	C	0.64
5.34	COCH ₃		H	C	1.19
5.35	COCH ₃		H	C	1.08
5.36	COCH ₃		H	C	0.20

Таблица 2.3.2 (продолжение) *In vitro* ингибирование НА вируса гриппа
(IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

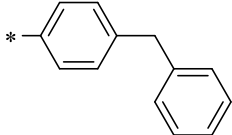
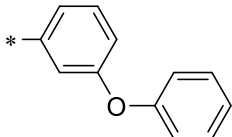
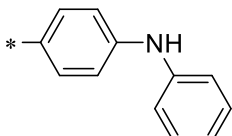
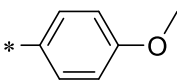
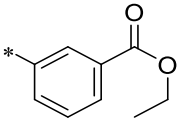
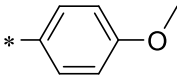
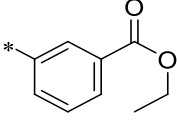
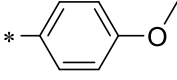
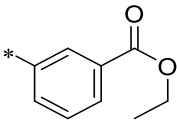
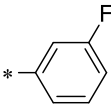
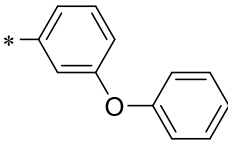
	R¹	R²	R³	*7	IC₅₀
5.37	COCH ₃		H	C	0.10
5.38	COCH ₃		H	C	0.50
5.39	COCH ₃		H	C	0.76
5.40	COCH ₃		OCH ₃	C	1.70
5.41	COCH ₃		OCH ₃	C	1.33
5.42	COCH ₃		Cl	C	5.43
5.43	COCH ₃		Cl	C	2.03
5.44	COCH ₃		H	N	2.0
5.45	COCH ₃		H	N	9.84

Таблица 2.3.2 (окончание) *In vitro* ингибирование NA вируса гриппа (IVA PR/8/34), все IC₅₀ в мкМ.

	R ¹	R ²	R ³	*7	IC ₅₀
5.46	COCH ₃		H	N	1.42
5.47	COCH ₃		H	N	0.15

Соединение с *мета*-метокси группой (**5.21**) демонстрирует большую активность, чем с *орто*-метокси группой (**5.20**). Неожиданно, но соединение **5.22** с 3,4-диметокси фрагментом полностью теряет активность, в то время как соединение **5.23** с 2,5-диметокси фрагментом проявляет среднюю активность. Увеличение длины цепи у алкильных заместителей (**5.25**, **5.26**) не приводит к значимому изменению активности. Существенное влияние оказывает положение трифторметильной группы: *мета*- и *пара*-положения (**5.28** и **5.29** соответственно) отличаются падением активности от *орто*-положения (**5.27**). При этом для трифторметокси группы наблюдается обратная картина: *пара*-замещенное соединение **5.30** показывает большую активность по сравнению с *мета*-замещенным **5.31**. Хорошую активность показало этоксикарбонил-замещенное соединение **5.32**. Широко используемая в медицинской химии в качестве акцептора водородных связей и обладающая стойкостью к гидролизу сульфонамидная группа [344] в данном случае (соединение **5.33**) приводит к снижению активности. Включение в качестве дополнительного донора водородных связей в бензольное кольцо атома азота (**5.34**, **5.35**) так же приводит к значительному ослаблению ингибирования а, введение дополнительной гидрофобной бензольной группы (соединения **5.36–5.39**) положительно влияет на антинейраминидазную активность.

Учитывая, что атом хлора или метокси-группы в индольном кольце вносят существенный вклад в липофильность, было интересно выявить их влияние на ингибирование. Введение этих заместителей в 5 положение (соединения **5.40–5.43**) приводит к уменьшению активности на порядок по сравнению с соответствующими незамещенными производными **5.8** и **5.32**, что свидетельствует о том, что для благоприятного уровня ингибирования требуется исключительно незамещенное бензольное кольцо индольного ядра.

Таблица 2.3.3 Антинейраминидазная активность для избранных соединений в тесте на гемагглютинацию, все значения в мкМ.

	Гемагглютинация	Ингибирование гемагглютинации	Ингибирование NA
5.20	100.0	отсутствует	10.0 – 31.6
5.22	100.0	отсутствует	отсутствует
5.23	31.6 – 100.0	отсутствует	10.0 – 31.6
5.24	31.6 – 100.0	отсутствует	отсутствует
5.44	100.0	отсутствует	31.6 – 100.0

По аналогии с содержащим 7-азаиндольный фрагмент пимодивиром **2.6.2** (раздел 1.2.6) был исследован ряд 7-азаиндолов **5.44–5.47**. За исключением **5.47**, содержащего объемный липофильный 3-бензилфенильный заместитель в 2 положении, все они не показывают желаемый уровень ингибирования, что говорит о значимости именно индольного ядра в обеспечении антинейраминидазной активности.

Так как основанные на хемилюминесценции тесты на ингибирование NA могут показывать существенное количество ложноположительных

результатов, для выбранных 3-индолинонов был дополнительно проведен комплиментарный анализ гемагглютинации на клетках [302]. Полученные для соединений с различными исходными значениями IC_{50} результаты позволяют уверенно утверждать, что мишенью для 3-индолинонов служит нейраминидаза N1 (табл. 2.3.3).

2.3.4 Докинг

Для рационального объяснения наблюдаемых различий в эффективности ингибирования для ряда соединений была проведена симуляция связывания ингибитора с нейраминидазой с использованием методов молекулярной динамики; на рис. 2.3.2 в качестве примера приведена визуализация комплекса между NA H1N1 и **5.36**. Проведенные расчеты показывают, что существенную роль в комплексообразовании по-видимому играют 1-ацетильная (1-пропионильная для **5.10**) группа (фрагмент R) и заместители в 2-фениламинометиленовом фрагменте (фрагмент В). Так, 1-ацетильная группа образует стабильную водородную связь с боковой цепью S370, обеспечивающую правильную ориентацию 3-индолинона относительно боковой цепи W403, что способствует стабилизации π - π -взаимодействий между ароматическими кольцами 3-индолинона и W403. Дополнительно это связывание стабилизируется гидрофобными взаимодействиями между фенильными фрагментами и боковой цепью I427.

Заместители в фенильном ядре фрагмента В могут приносить в структуру дополнительные свойства, еще более увеличивающие эффективность ингибирования. Одним из вариантов является введение крупного гидрофобного заместителя комплиментарно сайту связывания, состоящему из R431 и алифатических фрагментов боковых цепей Q430 и V149, что в явном виде наблюдается для соединений **5.36**, **5.37** и **5.47**.

Так как полость-430 открыта для взаимодействия с внешней средой, то другим вариантом может быть введение заместителей, способных образовывать водородные связи с растворителем, защищая таким образом ядро

ингибитора от взаимодействия с внешней средой. В качестве примера можно привести соединения **5.10**, **5.14** и **5.30**. Для реализации такого рода взаимодействий *мета*-конфигурация заместителей более предпочтительна, нежели *пара*-, так как *мета*-заместитель более открыт для растворителя. Эта закономерность хорошо прослеживается в сравнении вышеупомянутых соединений с их *пара*-аналогами **5.9**, **5.13** и **5.31**.

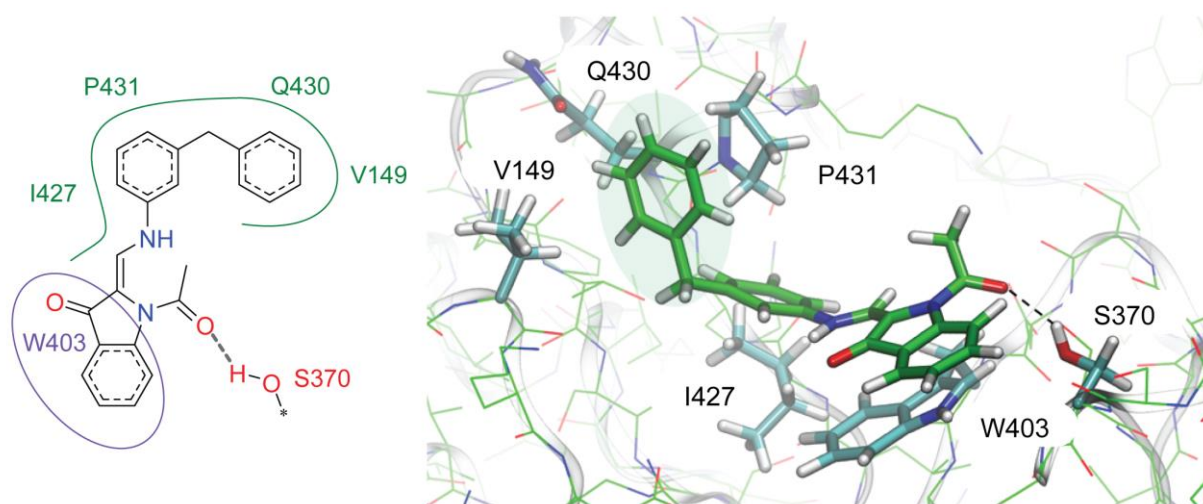


Рисунок 2.3.2 Визуализация комплексообразования между **5.36** и полостью-430 нейраминидазы H1N1, Водородные связи показаны пунктиром, гидрофобные взаимодействия обозначены зеленым, π - π -взаимодействия обозначены фиолетовым.

2.3.5 Активность против вируса гриппа А в клеточной культуре

Для соединений **5.8**, **5.10**, **5.14**, **5.30**, **5.37** и **5.47**, как показавшим наибольшую антинейраминазную активность, был проведен анализ *in vitro* активности против штамма PR/8/34 вируса гриппа А (H1N1) на клетках MDCK с использованием теста на ингибирование гемагглютинации (табл. 2.3.4). Согласно данным MTS-теста цитотоксичность не наблюдается для **5.8**, **5.10**, **5.37** и **5.47**, в то время как для **5.14** и **5.30** наблюдается умеренная цитотоксичность. **5.37** и **5.47** неактивны *in vitro* против вируса гриппа, в то время как для **5.8** и **5.14** ингибирование находится на приемлемом уровне. Соединение **5.10**, обладающее наибольшей антинейраминидазной

активностью, так же показывает умеренное ингибирование вируса в культуре клеток, в то время наибольшую противовирусную активность показывает **5.30**.

Таблица 2.3.4 Цитотоксичность и противовирусная активность для избранных соединений на клетках MDCK, все концентрации в мкМ $\pm$ СОС.

	CC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀ /IC ₅₀
5.8	1814.42 $\pm$ 230.26	12.00 $\pm$ 3.2	151
5.10	1479.63 $\pm$ 302.57	33.80 $\pm$ 6.8	44
5.14	94.97 $\pm$ 23.26	11.30 $\pm$ 1.00	8
5.30	104.92 $\pm$ 30.58	3.00 $\pm$ 0.80	35
5.37	1740.24 $\pm$ 239.35	111.40 $\pm$ 16.30	16
5.47	540.11 $\pm$ 109.59	120.10 $\pm$ 13.60	5

2.3.6 Сравнение 5.10 и 5.30 на модели вирусной пневмонии на мышах

Для оценки *in vivo* эффективности соединения **5.10** и **5.30** вводились 50 мг/кг перорально мышам BALB/c, летально зараженных гриппом A/California/04/2009, используя озельтамивир в качестве положительного контроля и оценивая выживаемость, легочный титр вируса и изменение массы тела (рис. 2.3.3). Все отрицательные контроли (физиологический раствор) постоянно теряли массу тела и погибали (100% смертность к 11 дню после инокуляции вируса). У всех животных, получавших ингибиторы NA, была предотвращена потеря массы тела, и к концу исследования наблюдалось ее значительное увеличение. Выживаемость для **5.10** и **5.30** составляет 30%, в то время как озельтамивир обеспечивает 50% выживаемости. Лечение любым из исследованных соединений, по-видимому, подавляет репликацию вируса в

легких по сравнению с отрицательным контролем, но эти различия нельзя назвать статистически значимыми. Кроме того, не наблюдается полное удаление вируса из легких, вследствие чего может потребоваться увеличение дозы или продолжительности лечения.

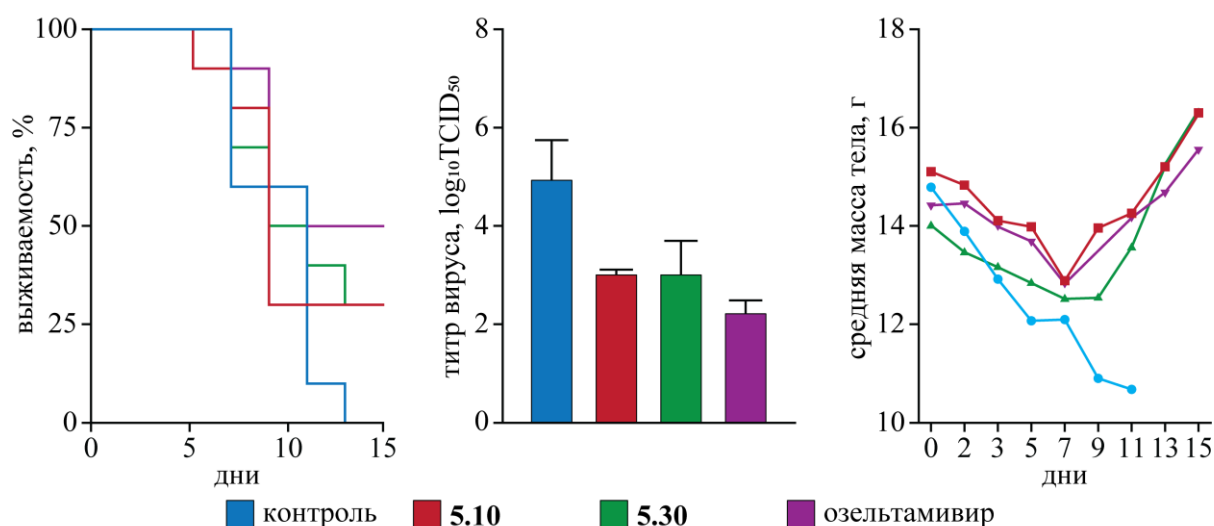


Рисунок 2.3.3 Оценка эффективности *in vivo* на мышах: выживаемость (слева), титр вируса на 4 день (в центре) и изменение массы тела (справа).

2.3.7 Выводы по разделу 2.3

Таким образом, был обнаружен новый класс молекулярных ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа А, 3-индолиноны. Молекулярное моделирование показало, что эти соединения используют в качестве мишени альтернативный имеющимся на рынке ингибиторам сайт связывания, полость-430, при этом были определены фрагменты белка, участвующие в комплексообразовании. Гидрофобные, π - π -взаимодействия и водородные связи определяют эффективность связывания и наиболее выражены у соединений, обладающих наибольшей ингибирующей способностью. Соединения с наибольшей антинейраминидазной активностью по данным хемолюминесцентного анализа были дополнительно протестированы на целых клетках, а два соединения-лидера (**5.10** и **5.30**) — так же на модели

вирусной (грипп A/California/04/2009) пневмонии на мышах, показав существенную эффективность и потенциал для дальнейшей разработки этого класса ингибиторов в качестве противогриппозных средств.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Общие инструментальные и методические аспекты

^1H и $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ спектры ЯМР были регистрировали на приборах Avance III 500 (Bruker) на частоте 500 МГц для ^1H канала и 125 МГц для ^{13}C канала и AC-200 (Bruker) на частоте 200 МГц для ^1H канала и 50 МГц для ^{13}C канала. Химические сдвиги для ядер ^1H и ^{13}C приведены в м.д. относительно остаточного пика растворителя для протонных спектров (δ 2.50 м.д. для ДМСО- d_6 , δ 7.27 для CDCl_3) и для углеродных спектров (δ 39.52 м.д. для ДМСО- d_6 , δ 77.00 для CDCl_3). Обработку данных проводили с использованием программного пакета Mnova 15 (Mestrelab Research).

Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре Impact II (Bruker) с источником ионизации электрораспылением в следующих условиях: режим положительных ионов, потенциал на капилляре 4.5 кВ, диапазон сканирования m/z 100–1200, прямой ввод раствора образца в ацетонитриле 10 мкл/мин., распыляющий газ — азот 0.9 бар, осушающий газ — азот 5 л/мин. 200 °С, частота регистрации 1 Гц, внешняя калибровка по раствору трифторацетата натрия. Обработку данных проводили с использованием программного пакета Compass DataAnalysis 5.1 (Bruker).

ИК-спектры регистрировали на фурье-спектрометре Alpha (Bruker) в таблетках бромида калия в диапазоне 4000–400 cm^{-1} . Обработку данных проводили с использованием программного пакета OPUS (Bruker).

Чистоту соединений подтверждали на ВЭЖХ Elute (Bruker) со спектрофотометрическим детектором Azura UVD 2.1S (Knauer) в следующих условиях: объем вкола 5 мкл, колонка Waters Acquity HSS T3 2.1×100 мм, 1.8 мкм, температура колонки 25, скорость потока 0.4 мл/мин., градиентное элюирование от 5 до 100% Б за 15 мин. (А: раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде, Б: раствор 0.1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле), регистрация при 254 нм с частотой 1 Гц. Обработку данных проводили с использованием программного пакета Compass DataAnalysis 5.1 (Bruker).

Элементный анализ проводили на анализаторе Euro EA (HEKAtech). Температуру плавления соединений определяли на приборе 9001 (Electrothermal) со скоростью нагрева 10 °/мин. без коррекции. Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на пластинках KGaA silica gel 60 F254 (Merk). Препаративную колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля 60 (Merck) 70–230 меш.

Выходы приведены для очищенных продуктов и не оптимизировались. Исходные и промежуточные соединения так же были выделены, очищены с использованием стандартных методов, включая (но не ограничиваясь) фильтрацию, дистилляцию, перекристаллизацию и хроматографию, и охарактеризованы стандартными способами, включая физические константы и спектральные данные.

3.2 К разделу 2.1

3.2.1 Синтетические процедуры

Все соединения были синтезированы согласно схеме 2.1.1 по методикам, описанным ниже.

Стадия (а). Смесь соответствующего анилина (1.0–1.2 ммоль) и диметилцианодитиоиминокарбоната (1.0 ммоль) в небольшом объеме *n*-бутанола перемешивали при кипячении в течение 3–4 часов. После завершения реакции реакцию смесь охлаждали, затем образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали гексаном. Целевой продукт метил-*N'*-циано-*N-R*-фенилиимидотиокарбамат перекристаллизовывали из этанола.

Стадия (б). Раствор производного анилина (1.0 ммоль) в сухом толуоле или бензоле обрабатывали твердым диметилтиокарбамоилхлоридом (1.0–1.1 ммоль) и перемешивали при кипячении в течение 2–3 часов. После завершения реакции реакцию смесь охлаждали, растворяли в гексане и полученное твердое вещество отфильтровывали. Затем маточный раствор упаривали под вакуумом и желаемое производное изотиоцианата использовали без дополнительной очистки.

Стадия (в). Смесь замещенных анилинов (1.0 ммоль) с добавлением подходящей щелочи, такой как триэтиламин, диизопропилэтиламин, карбонат кальция, карбонат калия и др. (1.8–2.2 ммоль) в толуоле, бензоле или дихлорметане обрабатывали тиофосгеном (1.0 ммоль) и перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре или кипячении в течение 4–6 часов. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли водой и органическую фазу отделяли, концентрировали в вакууме и затем хроматографировали (предпочтительно для реакции в бензоле) с получением желаемого производного изотиоцианата в виде светло-желтого или белого твердого вещества.

Стадия (г). Смесь этилата натрия (2.0–2.2 ммоль) в 20 мл этанола и цианамида (2,0 ммоль) перемешивали при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Соответствующий изотиоцианатобензол (2.0–2.2 ммоль) добавляли к реакционной смеси и перемешивали в течение 1.5 часов с последующим добавлением метилйодида (4.0–4.5 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при кипячении в течение 1–2 часов и оставляли на ночь при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывали и высушивали, получая метил-*N'*-циано-*N-R*-фенилимидотиокарбамат.

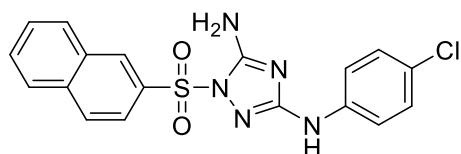
Стадия (д). Раствор гидразина в воде (3,0–5,0 ммоль) добавляли к раствору метил-*N*-4-бром-3,5-дихлорфенил-*N'*-цианокарбамимидотиоата (1,0–1,5 ммоль) в этаноле и перемешивали при 70 °C в течение 3–4 часов. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и суспендировали в ледяной воде. Осадок собирали и перекристаллизовывали из этанола с получением *N*⁵-фенил-1*H*-1,2,4-триазол-3,5-диамина в виде грязно-белого твердого вещества.

Стадия (е). Высококачественное производное сульфонилхлорида (1.0–1.2 ммоль) добавляли к суспензии соответствующего *N*⁵-фенил-1*H*-1,2,4-триазол-3,5-диамина (1.0 ммоль) в небольшом объеме пиридина. Реакционную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре, затем разбавляли водой

и охлаждали до 4 °С в течение 6–24 часов, после чего осадок отфильтровывали. Целевой изомер *N*³-(4-фенил)-1-(2-*R*6-сульфонил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин отделяли от побочного продукта с помощью перекристаллизации (этанол или смесь этанола и ДМФА) или хроматографии (хлороформ/метанол 10/1).

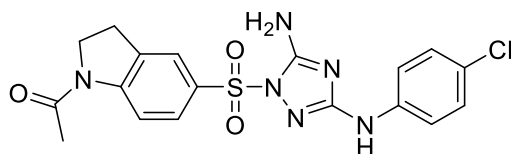
3.2.2 Аналитические данные синтезированных соединений

*N*³-(4-Хлорфенил)-1-(2-нафтилсульфонил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.1**.



Белое твердое вещество, выход 55%. Температура плавления 211–2 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{15}ClN_5O_2S]^+$ m/z 400.0630, найдено m/z 400.0632 ($\Delta = -0.5$ м.д.). ¹Н-ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 9.28 (с, 1Н, NH), 8.72 (с, 1Н, HC(1')), 8.23 (д, $J = 7.8$ Гц, 1Н, HC(8')), 8.18 (д, $J = 8.8$ Гц, 1Н, C(4')), 8.05 (д, $J = 8.0$ Гц, 1Н, HC(5')), 7.90 (дд, $J = 8.7, 1.8$ Гц, 1Н, HC(3')), 7.82–7.67 (м, 2Н, HC(6', 7')), 7.45 (д, $J = 8.9$ Гц, 2Н, HC(3'', 5'')), 7.40 (с, 2Н, NH₂), 7.26 (д, $J = 8.9$ Гц, 2Н, HC(2'', 6'')). ¹³С-ЯМР (50 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 159.1, 156.9, 139.6, 134.9, 133.1, 131.7, 129.8, 129.9, 129.0, 128.4, 128.3, 128.0, 123.7, 122.1, 121.7, 118.1.

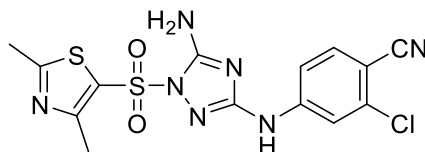
1-[5-[*5*-Амино-3-(4-хлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-индолин-1-ил]этанон **3.2**.



Белое твердое вещество, выход 37%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{18}ClN_6O_3S]^+$ m/z 433.0844, найдено m/z 433.0844 ($\Delta = 0.1$ м.д.). ¹Н-ЯМР (200 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 9.32 (уш.с, 1Н, NH), 8.16 (уш.д, $J = 8.6$ Гц, 1Н, HC(7')), 7.79 (д, $J = 8.6$ Гц, 1Н, HC(6')), 7.77 (уш.с, 1Н, HC(4')), 7.47 (д, $J = 8.9$ Гц, 2Н, HC(3'', 5'')), 7.28 (уш.с, 2Н, NH₂), 7.26 (д,

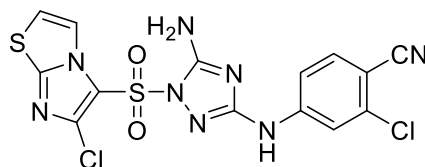
$J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 4.13 (т, $J = 8.67$ Гц, 2H, H₂C(2')), 3.18 (т, $J = 8.7$ Гц, 2H, H₂C(3')), 2.17 (с, 3H, CH₃CO). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 169.5, 159.3, 157.1, 148.1, 139.6, 133.4, 129.3, 128.3, 128.1, 123.9, 123.6, 118.0, 115.1, 48.6, 26.8, 23.9.

4-[[5-Амино-1-(2,4-диметилтиазол-5-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.3**.



Белое твердое вещество, выход 79%. (+)ИЭР-МС (TOF): [M+H]⁺ вычислено для [C₁₄H₁₃ClN₇O₂S₂]⁺ m/z 410.0255, найдено m/z 410.0255 ($\Delta = 0.1$ м.д.). ¹H-ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 10.18 (с, 1H, NH), 7.89 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.76 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.54 (уш.с, 2H, NH₂), 7.46 (дд, $J = 8.7, 2.2$ Гц, 1H, HC(5'')), 2.67 (с, 6H, 2CH₃). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 172.1, 159.3, 158.9, 157.0, 145.7, 136.1, 134.7, 124.6, 116.5, 115.5, 102.0, 19.2, 16.6.

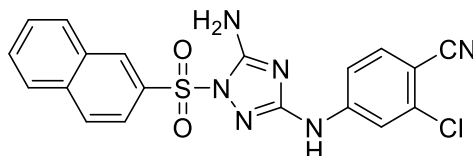
4-[[5-Амино-1-(6-хлоримидазо[2,1-*b*]тиазол-5-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.4**.



Белое твердое вещество, выход 76%. (+)ИЭР-МС (TOF): [M+H]⁺ вычислено для [C₁₄H₉Cl₂N₈O₂S₂]⁺ m/z 454.9661, найдено m/z 454.9661 ($\Delta = 0.1$ м.д.). ¹H-ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 10.16 (уш.с, 1H, NH), 8.21 (д, $J = 4.4$ Гц, 1H, HC(3')), 7.85–7.69 (м, 3H, HC(5''), HC(2''), HC(2')), 7.62 (уш.с, 2H, NH₂), 7.40 (дд, $J = 8.7, 2.1$ Гц, 1H, HC(6'')). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆)

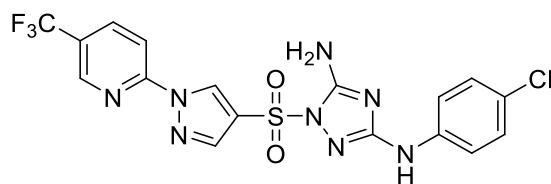
δ м.д.: 158.9, 156.8, 151.9, 145.5, 139.4, 136.0, 134.7, 120.6, 118.1, 116.6, 116.4, 115.5, 115.0, 102.0.

4-[[5-Амино-1-(2-нафтилсульфонил)-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.5**.



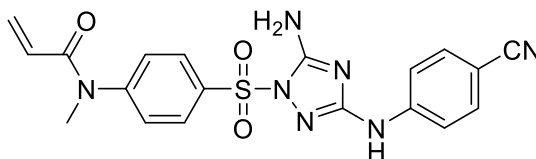
Белое твердое вещество, выход 45%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{14}ClN_6O_2S]^+$ m/z 425.0582, найдено m/z 425.0583 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.09 (с, 1H, NH), 8.75 (с, 1H, HC(1')), 8.35–7.32 (м, 11H). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.6, 157.3, 145.8, 136.0, 135.1, 134.9, 132.9, 131.4, 130.0, 130.0, 129.6, 128.2, 128.0, 121.7, 116.6, 116.4, 115.4, 101.8.

N^3 -(4-Хлорфенил)-1-[1-[5-(трифторметил)-2-пиридил]-имидазол-4-ил]сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.6**.



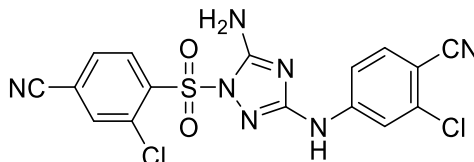
Белое твердое вещество, выход 37%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{12}ClF_3N_8O_2S]^+$ m/z 485.0517, найдено m/z 485.0517 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.39 (уш.с, 1H, NH), 9.28 (с, 1H, HC(5')), 8.93 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(6''')), 8.44 (дд, $J = 8.7, 2.5$ Гц, 1H, HC(4''')), 8.39 (с, 1H HC(2')), 8.14 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(3''')), 7.52 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.40 (уш.с, 2H, NH₂), 7.26 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.8, 157.2, 151.8, 146.0 (к, $J = 5$ Гц), 141.3, 139.5, 137.7 (к, $J = 6$ Гц), 130.3, 128.3, 125.1 (к, $J = 265$ Гц), 124.4 (к, $J = 30$ Гц), 123.7, 121.0, 118.2, 113.2.

N-[4-[[5-Амино-3-(4-цианоанилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-фенил]-*N*-метил-проп-2-енамид **3.7**.



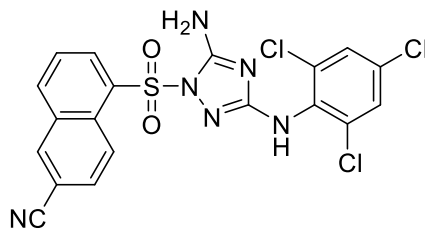
Белое твердое вещество, выход 47%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{18}N_7O_3S]^+$ m/z 424.1186, найдено m/z 424.1187 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.86 (уш.с, 1H, NH), 8.03 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(3', 5')), 7.65 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.60 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H, HC(2', 6')), 7.59 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.46 (уш.с, 2H, NH₂), 6.18 (д, $J = 4.5$ Гц, 1H, (Z)-HC=), 6.17 (д, $J = 7.8$ Гц, 1H, (E)-HC=), 5.61 (дд, $J = 7.7$, 4.8 Гц, 1H, HC=CO), 3.30 (с, 3H, NCH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 164.4, 158.9, 157.0, 148.6, 144.7, 133.7, 133.0, 128.7, 128.6, 128.0, 127.4, 119.4, 116.6, 101.5, 36.5.

4-[[5-Амино-1-(2-хлор-4-цианофенил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-3-хлорбензонитрил **3.8**.



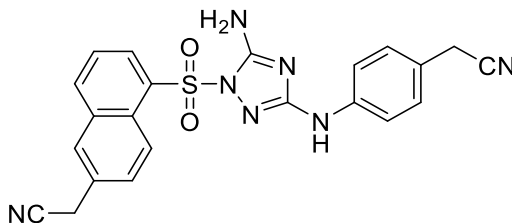
Белое твердое вещество, выход 45%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{10}Cl_2N_7O_2S]^+$ m/z 433.9988, найдено m/z 433.9990 ($\Delta = 0.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.16 (уш.с, 1H, NH), 8.38 (д, $J = 1.6$ Гц, 1H, HC(3')), 8.36 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(5')), 8.16 (дд, $J = 8.34$, 1.6 Гц, 1H, HC(6')), 7.70 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.66 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.59 (уш.с, 2H, NH₂), 7.35 (дд, $J = 8.7$, 2.1 Гц, 1H, HC(6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.4, 157.0, 145.7, 138.1, 136.0, 135.7, 134.7, 132.6, 132.3, 132.0, 118.5, 116.5, 116.4, 115.9, 115.4, 101.9.

5-[[5-Амино-3-(2,4,6-трихлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]нафталин-2-карбонитрил **3.9**.



Белое твердое вещество, выход 54%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{12}Cl_3N_6O_2S]^+$ m/z 492.9803, найдено m/z 492.9805 ($\Delta = 0.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.81 (с, 1H, NH), 8.77 (д, $J = 8.10$ Гц, 1H, HC(4')), 8.54 (с, 1H, HC(1')), 8.49 (д, $J = 7.9$ Гц, 1H, HC(8')), 7.90 (м, 2H, HC(7',3')), 7.55 (с, 2H, HC(3'', 5'')), 7.45 (с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 160.5, 157.8, 136.6, 135.1, 134.7, 134.0, 133.3, 132.7, 131.1, 128.5, 128.2, 128.0, 128.2, 127.7, 126.4, 126.1, 118.2, 109.8.

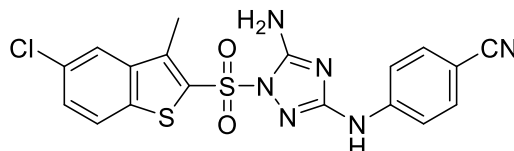
2-[4-[[5-Амино-1-[[6-(цианометил)-2-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]фенил]ацетонитрил **3.10**.



Белое твердое вещество, выход 35%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{22}H_{17}N_7O_2S]^+$ m/z 444.1237, найдено m/z 444.1237 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.20 (уш.с, 1H, NH), 8.96 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H, HC(8')), 8.45 (д, $J = 4.4$ Гц, 1H, HC(2')), 8.39 (д, $J = 9.7$ Гц, 1H, HC(4')), 8.07 (с, 1H, HC(5')), 7.77 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H, HC(7')), 7.75 (т, $J = 7.7$ Гц, 1H, HC(3')), 7.45 (уш.с, 2H, NH₂), 7.37 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.18 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 4.26 (уш.с, 2H, H 2 C-C(6')), 3.87 (уш.с, 2H, H₂C-C(1'')). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.0, 156.5, 140.0, 136.1, 133.8,

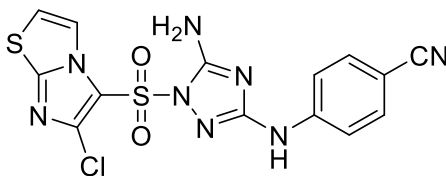
132.9, 130.6, 129.9, 128.3, 127.7, 127.0, 125.3, 125.0, 123.5, 119.5, 118.7, 116.8, 122.4, 22.4, 21.6.

4-[[5-Амино-1-(5-хлор-3-метилбензотиофен-2-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]бензонитрил **3.11**.



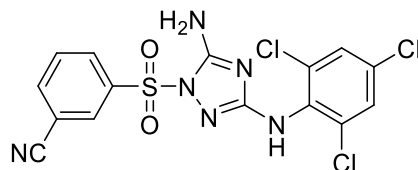
Белое твердое вещество, выход 53%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{14}ClN_6O_2S_2]^+$ m/z 445.0303, найдено m/z 445.0303 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.19 (уш.с, 1H, NH), 8.15 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, HC(7')), 8.13 (с, 1H, HC(4')), 7.87 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.77 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.66 (с, 2H, NH₂), 7.64 (д, $J = 2.2$ Гц, 9 HC(6')), 7.41 (дд, $J = 2.4, 8.7$ Гц, 1H, HC(3')), 2.78 (с, 3H, CH₃-C(3')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.9, 157.1, 145.6, 141.3, 139.8, 138.1, 136.1, 134.9, 131.8, 131.0, 128.9, 124.9, 124.3, 116.7, 116.4, 115.5, 101.9, 12.8.

4-[[5-Амино-1-(6-хлоримидазо[2,1-*b*]тиазол-5-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]бензонитрил **3.12**.



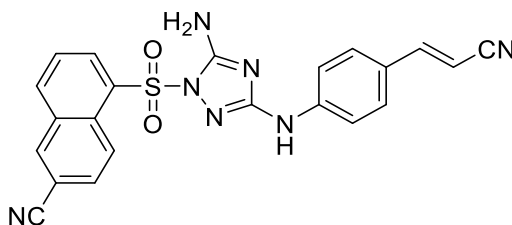
Белое твердое вещество, выход 49%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{14}H_{10}ClN_8O_2S_2]^+$ m/z 421.0051, найдено m/z 421.0052 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.86 (уш.с, 1H, NH), 8.23 (д, $J = 4.4$ Гц, 1H, HC(3')), 7.78 (д, $J = 4.4$ Гц, 1H, HC(2')), 7.65–7.50 (м, 4H, HC(2'', 3'', 5'', 6'')), 7.49 (уш.с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.3, 156.8, 151.7, 144.4, 139.1, 132.8, 120.9, 119.3, 117.7, 116.7, 115.2, 101.6.

3-[[5-Амино-3-(2,4,6-трихлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]бензонитрил **3.13**.



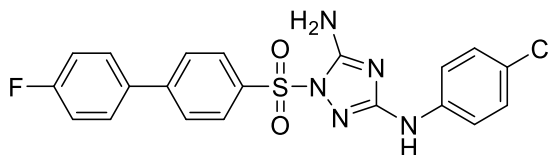
Белое твердое вещество, выход 76%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{15}H_{10}Cl_3N_6O_2S]^+$ m/z 442.9646, найдено m/z 442.9647 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.70 (уш.с, 1H, NH), 8.26 (т, $J = 2.1$ Гц, 1H, HC(2')), 8.24 (д, $J = 2.1$ Гц, 1H, HC(6')), 8.13 (дт, $J = 8.2, 1.5$ Гц, 1H, HC(3')), 7.88 (т, $J = 8.1$ Гц, 1H, HC(5')), 7.62 (с, 2H, HC(3'', 5'')), 7.41 (уш.с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 161.6, 158.8, 137.9, 136.9, 134.7, 134.0, 131.6, 131.3, 130.9, 128.2, 116.9, 112.8.

5-[[5-Амино-3-[4-[(E)-2-циановинил]анилино]-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]нафталин-2-карбонитрил **3.14**.



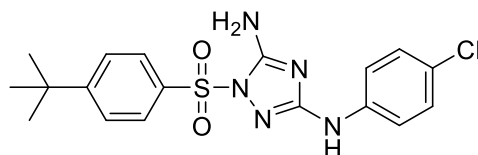
Белое твердое вещество, выход 62%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{22}H_{16}N_7O_2S]^+$ m/z 442.1081, найдено m/z 442.1081 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.57 (уш.с, 1H, NH), 9.09 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, HC(4')), 8.78 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(1')), 8.63 (дд, $J = 7.5, 1.2$ Гц, 1H, HC(6')), 8.50 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(8')), 8.11 (дд, $J = 9.0, 1.8$ Гц, 1H, HC(3')), 7.93 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H, HC(7')), 7.55 (с, 2H, NH₂), 7.50 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.48 (д, $J = 16.5$ Гц, 1H, (HC=)Ph), 7.40 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 6.20 (д, $J = 16.5$ Гц, 1H, (HC=)CN). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.8, 156.4, 150.2, 143.0, 136.9, 135.4, 133.6, 132.8, 132.2, 129.2, 128.7, 128.0, 126.6, 126.2, 125.8, 119.3, 118.2, 116.4, 110.1, 92.7.

*N*³-(4-Хлорфенил)-1-[4-(4-фторфенил)фенил]сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.15**.



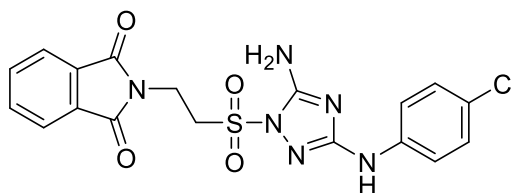
Белое твердое вещество, выход 41%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{16}ClFN_5O_2S]^+$ m/z 444.0692, найдено m/z 444.0693 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.35 (уш.с, 1H, NH), 8.02 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H, HC(2', 6')), 7.90 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H, HC(3', 5')), 7.76 (дд, $J = 8.8$, 5.5 Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.49 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.38 (с, 2H, NH₂), 7.28 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.26 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.9 (д, $J = 98.0$ Гц), 159.5, 157.2, 145.1, 139.5, 134.6, 134.4 (д, $J = 11.0$ Гц), 129.3 (д, $J = 21.5$ Гц), 128.3 (д, $J = 38.0$ Гц), 128.0, 127.6, 123.7, 118.1, 115.8 (д, $J = 53.0$ Гц).

1-(4-Трет-бутилфенил)сульфонил-*N*³-(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.16**.



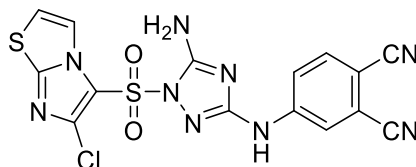
Белое твердое вещество, выход 56%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{21}ClN_5O_2S]^+$ m/z 406.1099, найдено m/z 406.1099 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.36 (уш.с, 1H, NH), 7.89 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H, HC(2', 6')), 7.67 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H, HC(3', 5')), 7.49 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.35 (уш.с, 2H, NH₂), 7.26 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 1.27 (с, 9H, (CH₃)₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.3, 158.0, 157.0, 139.7, 133.5, 128.4, 127.3, 126.5, 123.7, 118.1, 35.1, 30.6.

2-[2-[[5-Амино-3-(4-хлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-этил]изоиндолин-1,3-дион **3.17**.



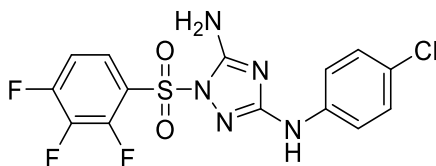
Белое твердое вещество, выход 64%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{16}ClN_6O_4S]^+$ m/z 447.0637, найдено m/z 447.0638 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.26 (с, 1H, NH), 7.77–7.72 (м, 4H, HC(4', 5', 6', 7')), 7.43 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.25 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.11 (с, 2H, NH₂), 4.07–3.99 (м, 4H, 2CH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 167.0, 159.0, 156.3, 139.6, 134.2, 131.4, 128.2, 123.6, 122.9, 118.1, 49.3, 31.7.

4-[[5-Амино-1-(6-хлоримидазо[2,1-*b*]тиазол-5-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]фталонитрил **3.18**.



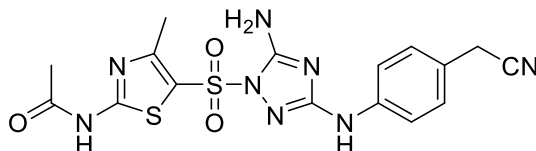
Белое твердое вещество, выход 67%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{15}H_9ClN_9O_2S_2]^+$ m/z 446.0004, найдено m/z 446.0005 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.37 (с, 1H, NH), 8.24 (д, $J = 4.5$ Гц, 1H, HC(3')), 8.03 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.91 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.80–7.69 (м, 2H, HC(2'), HC(5'')), 7.62 (уш.с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.7, 156.7, 151.9, 144.8, 139.5, 134.6, 120.5, 120.4, 120.3, 118.0, 116.3, 115.9, 115.2, 114.9, 104.1.

*N*³-(4-Хлорфенил)-1-(2,3,4-трифторфенил)сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.19**.



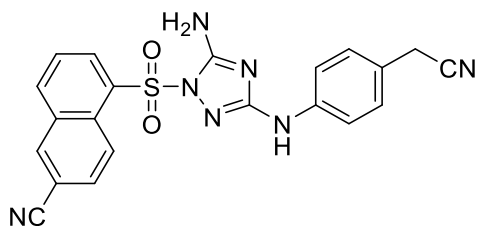
Белое твердое вещество, выход 38%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{14}H_{10}ClF_3N_5O_2S]^+$ m/z 404.0190, найдено m/z 404.0190 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.44 (с, 1H, NH), 8.02–7.83 (м, $J = 2.3, 5.6, 8.1, 9.3$ Гц, 1H, HC(6')), 7.62 (тдд, $J = 9.3, 6.7, 2.1$ Гц, 1H, HC(5')), 7.45 (с, 2H, NH₂), 7.43 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.23 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.7, 156.9, 151.0 (ддд, $J = 152.0, 8.0, 3.0$ Гц), 145.6 (ддд, $J = 4.6, 12.0, 146.0$ Гц), 142.3 (дт, $J = 255.0, 15.0$ Гц), 139.5, 128.3, 125.9 (дд, $J = 4.6, 9.0$ Гц), 123.9, 121.9 (дд, $J = 3.0, 12.0$ Гц), 118.2, 113.9 (дд, $J = 3.0, 19.0$ Гц).

N-[5-[[5-Амино-3-[4-(цианометил)анилино]-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]-4-метилтиазол-2-ил]ацетамид **3.20**.



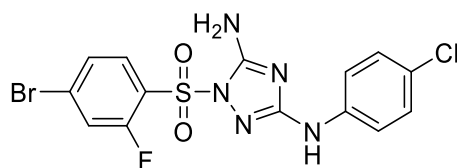
Белое твердое вещество, выход 19%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{17}N_8O_3S_2]^+$ m/z 433.0860, найдено m/z 433.0859 ($\Delta = -0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 12.74 (с, 1H, CONH), 9.31 (с, 1H, NH), 7.51 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.33 (уш.с, 2H, NH₂), 7.20 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 3.89 (с, 2H, CH₂), 2.61 (с, 3H, CH₃Ar), 2.17 (с, 3H, CH₃CO). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 169.7, 161.1, 159.7, 157.1, 156.4, 140.1, 128.2, 122.4, 119.2, 117.2, 116.9, 22.2, 21.6, 16.7.

5-[[5-Амино-3-[4-(цианометил)анилино]-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]нафталин-2-карбонитрил **3.21**.



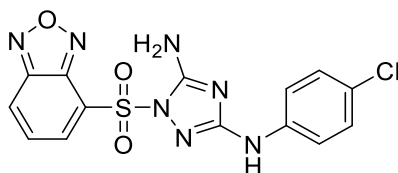
Белое твердое вещество, выход 57%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{21}H_{16}N_7O_2S]^+$ m/z 430.1081, найдено m/z 430.1081 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.18 (с, 1H, NH), 9.12 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, HC(4')), 8.73 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(1')), 8.61 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H, HC(6')), 8.47 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(8')), 8.05 (дд, $J = 8.9, 1.8$ Гц, 1H, HC(3')), 7.91 (т, $J = 7.8$ Гц, 1H, HC(7')), 7.44 (с, 2H, NH₂), 7.37 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(2''), HC(6'')), 7.18 (д, $J = 8.4$ Гц, 2H, HC(3''), HC(5'')), 3.87 (с, 2H, CH₂CN). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.1, 156.3, 139.9, 136.7, 135.2, 133.4, 132.8, 132.4, 129.3, 128.6, 128.2, 126.5, 126.3, 122.4, 119.2, 118.1, 116.9, 110.0, 21.7.

1-(4-Бром-2-фторфенил)сульфонил- N^3 -(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.22**.



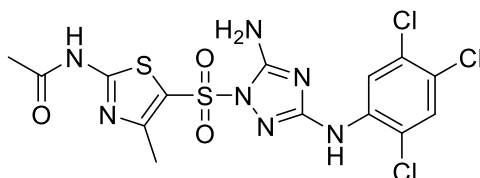
Белое твердое вещество, выход 26%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{14}H_{11}BrClFN_5O_2S]^+$ m/z 445.9484, найдено m/z 446.9483 ($\Delta = -0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.35 (уш.с, 1H, NH), 7.96 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(6')), 7.88 (д, $J = 9.2$ Гц, 1H, HC(3')), 7.72 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(5')), 7.41 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.33 (уш.с, 2H, NH₂), 7.21 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.5, 158.0 (д, $J = 262.0$ Гц), 156.9, 139.4, 132.0, 130.2 (д, $J = 9.3$ Гц), 128.7 (д, $J = 4.0$ Гц), 128.2, 123.7, 123.5 (д, $J = 13.8$ Гц), 121.2 (д, $J = 24.3$ Гц), 118.1.

1-(2,1,3-Бензоксадиазол-4-илсульфонил)-N³-(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин 3.23.



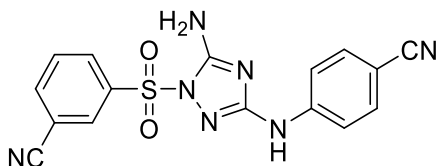
Белое твердое вещество, выход 27%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{14}H_{11}ClN_7O_3S]^+$ m/z 392.0327, найдено m/z 392.0327 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.36 (с, 1H, NH), 8.49 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, HC(7')), 8.44 (д, $J = 6.8$ Гц, 1H, HC(5')), 7.85 (дд, $J = 9.1, 6.9$ Гц, 1H, HC(6')), 7.50 (уш.с, 2H, NH₂), 7.35 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.20 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.5, 157.1, 149.2, 143.8, 139.4, 137.5, 131.5, 128.3, 124.6, 123.8, 123.7, 118.1.

N-[5-[[5-Амино-3-(2,4,5-трихлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]-4-метилтиазол-2-ил]ацетамид 3.24.



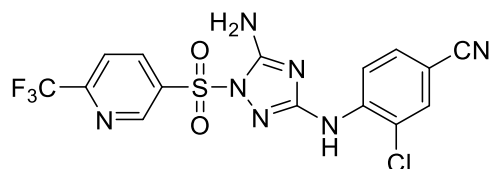
Белое твердое вещество, выход 48%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{14}H_{13}Cl_3N_7O_3S_2]^+$ m/z 495.9581, найдено m/z 495.9583 ($\Delta = 0.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 12.79 (уш.с, 1H, CONH), 8.45 (уш.с, 1H, NH), 8.29 (с, 1H, HC(6')), 7.70 (с, 1H, HC(3')), 7.45 (уш.с, 2H, NH₂), 2.62 (с, 3H, CH₃Ar), 2.18 (с, 3H, CH₃CO). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 169.7, 161.4, 158.9, 157.0, 156.9, 136.7, 130.0, 129.9, 123.0, 120.8, 120.1, 117.0, 22.2, 16.7.

3-[[5-Амино-3-(4-цианоанилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-бензонитрил
3.25.



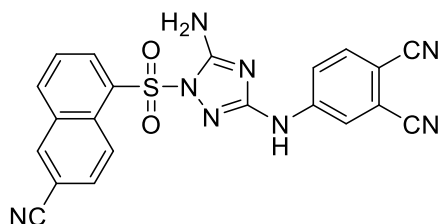
Белое твердое вещество, выход 56%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{12}N_7O_2S]^+$ m/z 366.0768, найдено m/z 366.0769 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.88 (уш.с, 1H, NH), 8.48 (уш.с, 1H, HC(2')), 8.25 (д, $J = 7.7$ Гц, 2H, HC(4'), HC(6')), 7.90 (т, $J = 7.7$ Гц, 1H, HC(5')), 7.72–7.56 (м, 4H, HC(2'', 3'', 5'', 6'')), 7.53 (с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.3, 157.2, 144.6, 138.4, 137.0, 133.1, 131.7, 131.3, 131.0, 119.4, 116.9, 116.8, 113.0, 101.7.

4-[[5-Амино-1-[[6-(трифторметил)-3-пиридил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-3-хлорбензонитрил **3.26.**



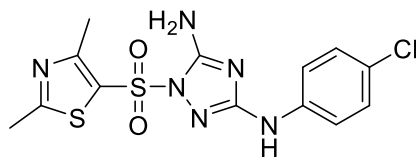
Белое твердое вещество, выход 41%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{15}H_{10}ClF_3N_7O_2S_2]^+$ m/z 444.0252, найдено m/z 444.0252 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.33 (д, $J = 2.3$ Гц, 1H, HC(2')), 8.73 (с, 1H, NH), 8.68 (дд, $J = 8.4, 2.5$ Гц, 1H, HC(4')), 8.25 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(5')), 8.16 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.92 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H, HC(2'')), 7.75 (дд, $J = 8.8, 2.0$ Гц, 2H, HC(6'')), 7.70 (с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.2, 157.2, 151.2 (к, $J = 74$ Гц), 148.2, 140.8, 138.4, 135.6, 132.8, 131.9, 122.1, 121.8 (к, $J = 260$ Гц), 121.3, 119.3, 117.8, 103.8.

4-[[5-Амино-1-[(6-циано-1-нафтил)сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]-амино]фталонитрил **3.27**.



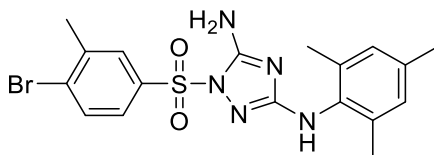
Белое твердое вещество, выход 51%. Температура плавления 287-8 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{21}H_{13}N_8O_2S]^+$ m/z 441.0877, найдено m/z 441.0877 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.27 (с, 1H, NH), 9.06 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, HC(8')), 8.78 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(5')), 8.66 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H, HC(2')), 8.52 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(4')), 8.10 (дд, $J = 9.1, 1.7$ Гц, 1H, HC(7')), 7.98–7.86 (м, 2H, HC(3'), HC(6'')), 7.88 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.75 (дд, $J = 8.8, 2.3$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.66 (уш.с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.0, 156.3, 144.9, 137.2, 135.5, 134.8, 133.8, 132.9, 132.1, 129.6, 129.0, 126.6, 125.8, 120.2, 120.2, 118.1, 116.5, 116.1, 115.3, 110.3, 104.0.

N^3 -(4-Хлорфенил)-1-(2,4-диметилтиазол-5-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.28**.



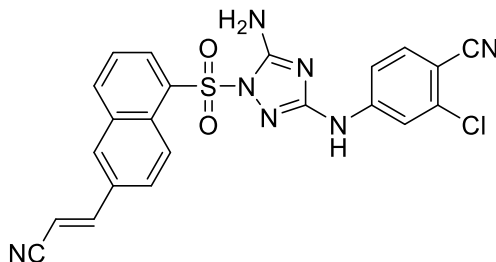
Белое твердое вещество, выход 57%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{13}H_{14}ClN_6O_2S_2]^+$ m/z 385.0303, найдено m/z 385.0304 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.42 (с, 1H, NH), 7.51 д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.39 (уш.с, 2H, NH₂), 7.26 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 2.65 (д, $J = 1.8$ Гц, 6H, 2CH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 171.7, 159.8, 158.9, 157.2, 139.4, 128.3, 124.6, 123.9, 118.1, 19.1, 16.5.

1-(4-Бром-3-метилфенил)сульфонил-N³-(2,4,6-триметилфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин 3.29.



Белое твердое вещество, выход 64%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{21}BrN_5O_2S]^+$ m/z 450.0594, найдено m/z 450.0594 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (300 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 8.52 (с, 1H, HC(1')), 8.18 (д, = 8.6 Гц, 1H, HC(8')), 8.18 (д, $J = 8.5$ Гц, 1H, HC(3')), 8.08 (д, $J = 7.8$ Гц, 1H, HC(5')), 7.83–7.68 (м, 3H, HC(6'), HC(7'), HC(4')), 7.66 (уш.с, 1H, NH), 7.23 (уш.с, 2H, NH_2), 6.75 (с, 2H, HC(3'', 5'')), 2.18 (с, 3H, C(2'')-CH₃, C(6'')-CH₃), 1.79 (с, 6H, C(4'')-CH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 162.5, 158.8, 135.3, 134.9, 134.6, 134.1, 132.9, 131.4, 129.7, 129.5, 129.3, 128.2, 128.0, 127.9, 121.7, 20.4, 17.6.

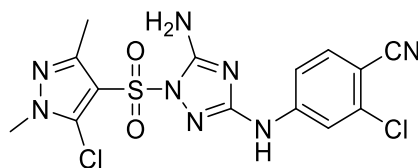
4-[[5-Амино-1-[[6-[(E)-2-циановинил]-1-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил 3.30.



Белое твердое вещество, выход 24%. Температура плавления 279-80 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{22}H_{15}ClN_7O_2S]^+$ m/z 476.0691, найдено m/z 476.0691 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 10.06 (уш.с, 1H, NH), 8.88 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, HC(8')), 8.52 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H, HC(2')), 8.42 (д, $J = 8.1$ Гц, 1H, HC(4')), 8.34 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(5')), 8.10 (дд, $J = 9.2$, 1.8 Гц, 1H, HC(7')), 7.84 (д, $J = 16.6$ Гц, 1H, HC=(CN)), 7.67 (д, $J = 2.1$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.65 (уш.с, 2H, NH_2), 7.38 (дд, $J = 8.7$, 2.1 Гц, 1H, HC(4'')), 6.69 (д,

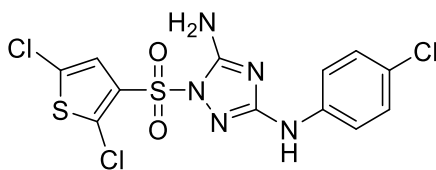
$J = 16.6$ Гц, 1H, HC=(CN)). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.0, 156.3, 149.3, 145.7, 137.3, 136.0, 134.9, 133.6, 132.6, 132.2, 131.8, 130.2, 128.6, 126.0, 125.9, 124.9, 118.5, 116.7, 116.2, 115.3, 101.8, 99.1.

4-[[5-Амино-1-(5-хлор-1,3-диметилпиразол-4-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.31**.



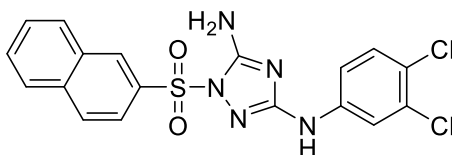
Белое твердое вещество, выход 59%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_2\text{S}]^+$ m/z 427.0254, найдено m/z 427.0255 ($\Delta = 0.2$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.13 (уш.с, 1H, NH), 7.92 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.74 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.41 (дд, $J = 2.4, 8.7$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.39 (уш.с, 2H, NH₂), 3.79 (с, 3H, NCH₃), 2.43 (с, 3H, CH₃-C(3')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.2, 156.3, 148.8, 145.8, 136.1, 134.6, 130.9, 116.5, 116.3, 115.5, 111.9, 101.8, 36.7, 13.4.

N^3 -(4-Хлорфенил)-1-[(2,5-дихлор-3-тиенил)сульфонил]-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.32**.



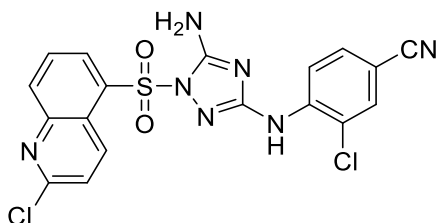
Белое твердое вещество, выход 34%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2]^+$ m/z 423.9258, найдено m/z 423.9257 ($\Delta = -0.2$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.47 (с, 1H, NH), 7.53 (с, 1H, HC(4')), 7.50 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.42 (с, 2H, NH₂), 7.25 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.7, 157.0, 139.5, 133.5, 131.9, 128.3, 127.3, 126.4, 123.9, 118.2.

*N*³-(3,4-Дихлорфенил)-1-(1-нафтилсульфонил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.33**.



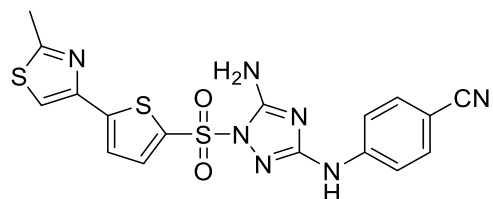
Белое твердое вещество, выход 43%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{14}Cl_2N_5O_2S]^+$ m/z 434.0240, найдено m/z 434.0240 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.54 (с, 1H, NH), 8.72 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H, HC(2'')), 8.21 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(2')), 8.18 (д, $J = 8.5$ Гц, 1H, HC(4')), 8.06 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H, HC(8')), 7.90 (дд, $J = 8.7$, 1.9 Гц, 1H, HC(5')), 7.82–7.65 (м, 3H, HC(3', 5', 6')), 7.48 (с, 2H, NH₂), 7.43 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.36 (дд, $J = 8.8$, 2.0 Гц, 1H, HC(6'')). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.9, 157.0, 141.1, 135.4, 132.8, 131.2, 130.7, 130.0, 129.6, 129.3, 127.8, 127.7, 121.5, 121.1, 117.4, 116.5.

4-[[5-Амино-1-[(2-хлор-5-хинолил)сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]-амино]-3-хлорбензонитрил **3.34**.



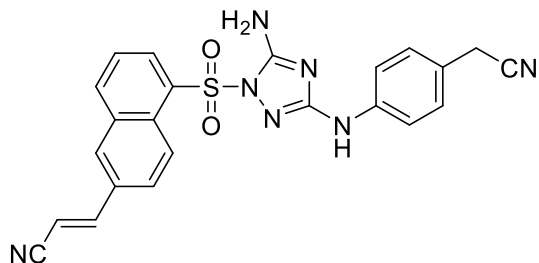
Белое твердое вещество, выход 33%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{12}Cl_2N_7O_2S]^+$ m/z 460.0145, найдено m/z 460.0144 ($\Delta = -0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.63 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(6')), 8.62 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H, HC(8')), 8.50 (уш.с, 1H, NH), 8.49 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(3')), 7.91 (т, $J = 7.8$, 1H, HC(7')), 7.84 (д, $J = 8.4$, 1H, HC(4')), 7.81 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H, HC(2'')), 7.78 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.58 (дд, $J = 8.7$, 2.0 Гц, 1H, HC(6'')), 7.44 (уш.с, 2H, NH₂). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 157.6, 157.7, 151.7, 142.2, 141.2, 140.8, 135.9, 134.2, 132.7, 132.4, 131.6, 127.3, 126.4, 124.2, 120.7, 118.3, 117.9, 103.1.

4-[[5-Амино-1-(2-метилтиазол-4-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3-ил]-амино]бензонитрил **3.35**.



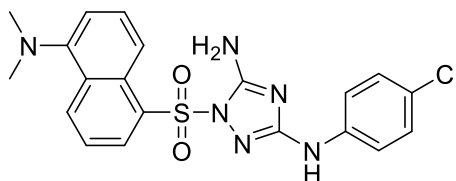
Белое твердое вещество, выход 37%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{14}N_7O_2S_3]^+$ m/z 444.0366, найдено m/z 444.0366 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.90 (с, 1H, NH), 8.10 (с, 1H, HC(5')), 7.75–7.57 (м, 4H, HC(2'', 3'', 5'', 6'')), 7.49 (уш.с, 2H, NH₂), 2.68 (с, 3H, CH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 166.9, 159.4, 157.5, 146.0, 144.7, 135.9, 133.0, 123.8, 119.4, 116.8, 101.6, 18.6.

(E)-3-[5-[[5-Амино-3-[4-(цианометил)анилино]-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-2-нафтил]проп-2-еннитрил **3.36**.



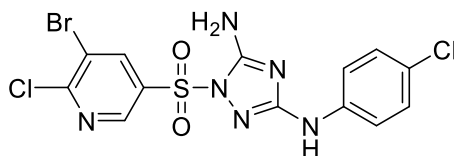
Белое твердое вещество, выход 38%. Температура плавления 275-6 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{23}H_{18}N_7O_2S]^+$ m/z 456.1237, найдено m/z 456.1337 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.20 (с, 1H, NH), 8.94 (д, $J = 9.1$ Hz, 1H, HC(4')), 8.48 (дд, $J = 7.6, 1.2$ Гц, 1H, HC(6')), 8.36 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(8')), 8.29 (д, $J = 1.8$ Гц, 1H, HC(1')), 8.09 (дд, $J = 9.2, 1.9$ Гц, 1H, HC(3')), 7.83–7.78 (м, 2H, HC(7'), HC=(Ar)), 7.48 (с, 2H, NH₂), 7.34 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.16 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 6.68 (д, $J = 16.7$ Гц, 1H, HC=(CN)), 3.88 (с, 2H, CH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 156.4, 149.2, 139.9, 136.9, 134.6, 133.6, 132.5, 132.2, 131.9, 130.0, 128.7, 128.3, 126.1, 125.8, 122.5, 116.9, 99.0, 21.7.

*N*³-(4-Хлорфенил)-1-[[5-(диметиламино)-1-нафтил]-сульфонил]-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.37**.



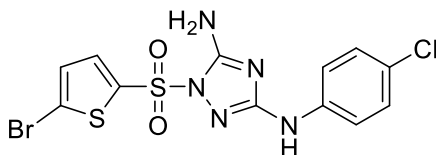
Белое твердое вещество, выход 52%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{20}ClN_6O_2S]^+$ m/z 443.1051, найдено m/z 443.1049 ($\Delta = -0.5$ м.д.). ¹H-ЯМР (200 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 9.28 (уш.с, 1H, NH), 8.59 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(2')), 8.55 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H, HC(4')), 8.43 (д, $J = 7.3$ Гц, 1H, HC(8')), 7.72 (т, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(3')), 7.66 (т, $J = 8.1$ Гц, 1H, HC(7')), 7.41 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.40 (с, 2H, NH₂), 7.23 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 2.80 (с, 6H, N(CH₃)₂). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 158.5, 156.1, 151.3, 139.5, 132.4, 132.0, 130.6, 129.3, 129.0, 128.6, 128.1, 123.5, 118.8, 117.9, 115.6, 44.9.

1-[(5-Бром-6-хлор-3-пиридил)сульфонил]-*N*³-(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.38**.



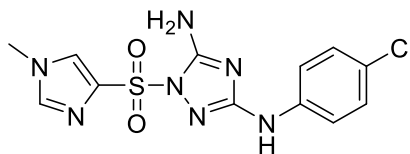
Белое твердое вещество, выход 45%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{13}H_{10}BrCl_2N_6O_2S]^+$ m/z 462.9141, найдено m/z 462.9140 ($\Delta = -0.2$ м.д.). ¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 9.50 (с, 1H, NH), 8.93 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(2')), 8.72 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(4')), 7.49 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.48 (уш.с, 2H, NH₂), 7.30 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м.д.: 160.1, 157.4, 155.4, 146.3, 141.1, 139.3, 132.2, 128.5, 124.0, 120.7, 118.3.

1-[(5-Бром-2-тиенил)сульфонил]-N³-(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин 3.39.



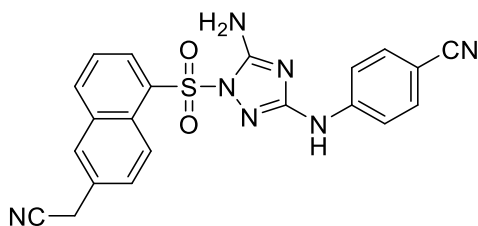
Белое твердое вещество, выход 47%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{12}H_{10}BrClN_5O_2S_2]^+$ m/z 433.9142, найдено m/z 433.9143 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.47 (с, 1H, NH), 7.72 (д, $J = 4.1$ Гц, 1H, HC(3')), 7.53 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.44 (уш.с, 2H, NH₂), 7.42 (д, $J = 4.1$ Гц, 1H, HC(4')), 7.29 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 160.2, 157.6, 139.4, 135.4, 135.3, 131.7, 128.4, 124.0, 122.6, 118.3.

N³-(4-Хлорфенил)-1-(1-метилимидазол-4-ил)сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин 3.40.



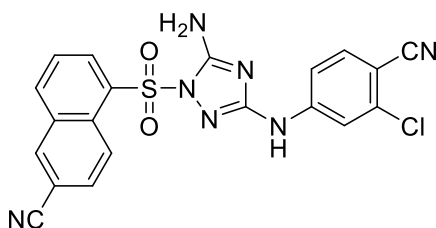
Белое твердое вещество, выход 32%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{12}H_{13}ClN_7O_2S]^+$ m/z 354.0534, найдено m/z 353.0534 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.28 (с, 1H, NH), 8.15 (с, 1H, HC(5')), 7.81 (с, 1H, HC(2')), 7.45 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.23 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.14 (с, 2H, NH₂), 3.72 (с, 3H, NCH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.9, 157.2, 140.5, 139.7, 135.1, 128.2, 127.5, 123.4, 118.0, 33.7.

4-[[5-Амино-1-[[6-(цианометил)-1-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]бензонитрил **3.41**.



Белое твердое вещество, выход 47%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{21}H_{16}N_7O_2S]^+$ m/z 430.1081, найдено m/z 430.1079 ($\Delta = -0.5$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.79 (с, 1H, NH), 8.97 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H, HC(8')), 8.49 (д, $J = 4.4$ Гц, 1H, HC(2')), 8.41 (д, $J = 9.7$ Гц, 1H, HC(4')), 8.08 (с, 1H, HC(5')), 7.80 (д, $J = 8.9$, 1H, HC(7')), 7.78 (т, $J = 7.7$ Гц, 1H, HC(3')), 7.66 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 7.56 (с, 2H, NH₂), 7.52 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 4.27 (с, 2H, CH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.4, 156.4, 144.6, 136.3, 133.1, 132.9, 132.0, 131.4, 131.0, 130.0, 127.8, 125.4, 125.0, 123.3, 119.5, 118.6, 116.5, 101.5, 23.3.

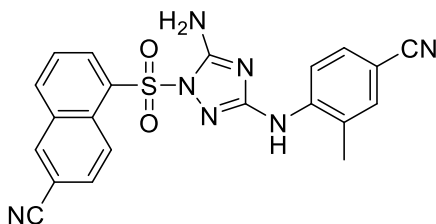
5-[[5-Амино-3-(3-хлор-4-цианоанилино)-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]нафталин-2-карбонитрил **3.42**.



Белое твердое вещество, выход 74%, температура плавления 236–7 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{13}ClN_7O_2S]^+$ m/z 450.0534, найдено m/z 450.0535 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.07 (с, 1H, NH), 9.04 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, HC(4')), 8.79 (д, $J = 1.8$ Гц, 1H, HC(1')), 8.65 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H, HC(6')), 8.52 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(8')), 8.11 (дд, $J = 9.0$, 1.8 Гц, 1H, HC(3')), 7.94 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H, HC(7')), 7.78 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.66 (с, 2H, NH₂), 7.64 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(2'')), 7.41 (дд, $J = 8.7$,

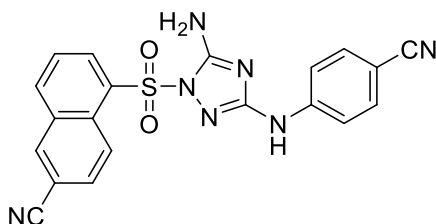
2.2 Гц, 1H, HC(5'')). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.2, 156.4, 145.6, 137.1, 135.9, 135.5, 134.9, 133.8, 132.8, 132.0, 129.2, 129.1, 126.6, 125.7, 118.1, 116.6, 116.3, 115.3, 110.2, 101.9.

5-[[5-Амино-3-(4-циано-2-метиланилино)-1,2,4-триазол-1-ил]-сульфонил]нафталин-2-карбонитрил **3.43**.



Белое твердое вещество, выход 61%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}]^+$ m/z 430.1081, найдено m/z 430.1081 ($\Delta = 0.1$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.12 (с, 1H, NH), 9.08 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, HC(4')), 8.74 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(1')), 8.62 (д, $J = 7.2$ Гц, 1H, HC(6')), 8.48 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H, HC(8')), 8.10 (дд, $J = 9.1, 1.9$ Гц, 1H, HC(3')), 7.93 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H, HC(7')), 7.60 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.52 (с, 2H, NH_2), 7.43 (дд, $J = 1.2, 8.2$ Гц, 1H, HC(5'')), 7.40 (д, $J = 1.2$ Гц, 1H, HC(2'')), 2.30 (с, 3H, CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.7, 156.4, 141.4, 136.3, 135.6, 133.9, 134.7, 132.7, 132.5, 131.2, 128.9, 128.7, 126.9, 126.5, 126.5, 120.2, 119.5, 116.1, 110.2, 105.6, 17.8.

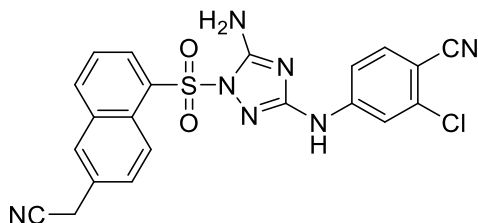
5-[[5-Амино-3-(4-цианоанилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-нафталин-2-карбонитрил **3.44**.



Белое твердое вещество, выход 47%. Температура плавления 268–9 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}]^+$ m/z 416.0924,

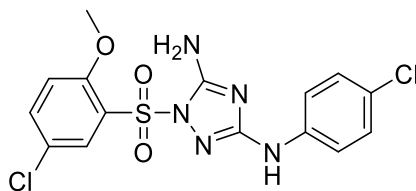
найденно m/z 416.0923 ($\Delta = 0.2$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.79 (с, 1H, NH), 9.12 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, HC(4')), 8.76 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H, HC(1')), 8.64 (д, $J = 7.2$ Гц, 1H, HC(6')), 8.50 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H, HC(8')), 8.15 (дд, $J = 9.1, 1.9$ Гц, 1H, HC(3')), 7.92 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H, HC(7')), 7.67 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(3''), HC(5'')), 7.56 (с, 2H, NH₂), 7.51 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2''), HC(6'')). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.5, 156.3, 144.5, 137.0, 135.3, 133.6, 133.0, 132.9, 132.3, 128.9, 126.8, 126.6, 126.3, 119.5, 118.1, 116.6, 110.2, 101.6.

4-[[5-Амино-1-[[6-(цианометил)-1-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.45**.



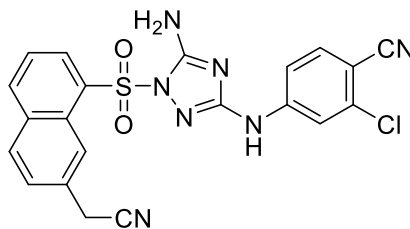
Белое твердое вещество, выход 23%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_7\text{O}_2\text{S}]^+$ m/z 464.0691, найденно m/z 464.0692 ($\Delta = 0.2$ м.д.). ^1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.04 (с, 1H, NH), 8.80 (с, 1H, HC(8')), 8.48 (дд, $J = 7.5, 1.2$ Гц, 1H, HC(2')), 8.42 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(4')), 8.18 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H, HC(5')), 7.79 (т, $J = 8.0$ Гц, 1H, HC(3')), 7.76 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H, HC(6'')), 7.63 (с, 2H, NH₂), 7.60 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.48 (дд, $J = 8.7, 2.2$ Гц, 1H, HC(5'')), 4.26 (с, 2H, CH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.0, 156.5, 145.7, 135.9, 135.0, 132.9, 132.2, 131.3, 130.1, 127.6, 127.6, 125.0, 123.1, 118.6, 118.5, 116.7, 116.3, 115.3, 101.8, 23.3.

1-(5-Хлор-2-метоксифенил)сульфонил- N^3 -(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.46**.



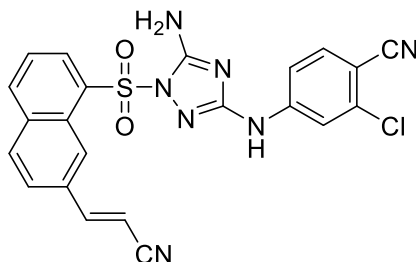
Белое твердое вещество, выход 40%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{15}H_{14}Cl_2N_5O_3S]^+$ m/z 414.0189, найдено m/z 414.0190 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.33 (с, 1H, NH), 7.89 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H, HC(6')), 7.76 (дд, $J = 9.0, 2.6$ Гц, 1H, HC(4')), 7.36 (д, $J = 9.1$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.28 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, HC(3')), 7.22 (с, 2H, NH₂), 7.20 (д, $J = 9.1$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 3.82 (с, 3H, OCH₃). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 159.0, 158.0, 155.8, 139.7, 136.2, 129.6, 128.2, 125.7, 124.1, 123.5, 117.9, 115.3, 56.6.

4-[[5-Амино-1-[[7-(цианометил)-1-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.47**.



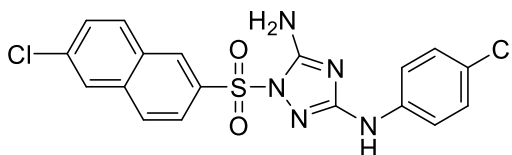
Белое твердое вещество, выход 45%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{21}H_{15}ClN_7O_2S]^+$ m/z 464.0691, найдено m/z 464.0690 ($\Delta = -0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.07 (с, 1H, NH), 8.81 (с, 1H, HC(8')), 8.49 (д, $J = 7.7$ Гц, 1H, HC(2')), 8.43 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H, HC(4')), 8.19 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, HC(5')), 7.80 (т, 1H, $J = 7.81$ Гц, HC(3')), 7.73 (д, 1H, $J = 8.7$ Гц, HC(6')), 7.68 (дд, 1H, $J = 1.4, 8.5$ Гц, HC(6'')), 7.66 (с, 2H, NH₂), 7.60 (д, $J = 2.0$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.49 (дд, $J = 8.5, 2.0$ Гц, 1H, HC(5'')), 4.27 (с, 2H, CH₂). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.0, 156.4, 145.7, 136.4, 135.8, 135.0, 132.9, 132.2, 131.7, 131.3, 130.2, 127.6, 127.6, 125.0, 123.1, 118.5, 116.6, 116.3, 115.1, 101.8, 23.3.

4-[[5-Амино-1-[[7-[(E)-2-циановинил]-1-нафтил]сульфонил]-1,2,4-триазол-3-ил]амино]-2-хлорбензонитрил **3.48**.



Белое твердое вещество, выход 67%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{22}H_{15}ClN_7O_2S]^+$ m/z 476.0691, найдено m/z 476.0690 ($\Delta = -0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.05 (с, 1H, NH), 8.89 (д, $J = 1.6$ Гц, 1H, HC(8')), 8.54 (д, $J = 7.6$ Гц, 1H, HC(2')), 8.42 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, HC(4')), 8.20 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(5')), 8.01 (дд, $J = 8.7, 1.6$ Гц, 1H, HC(6')), 7.85 (д, $J = 16.7$ Гц, 1H, CH=(Ar)), 7.78 (с, 1H), 7.74 (с, 2H, NH₂), 7.63 (д, $J = 2.1$ Гц, 1H, HC(3'')), 7.45 (дд, $J = 8.7, 2.2$ Гц, 1H, HC(4'')), 6.64 (д, $J = 16.7$ Гц, 1H, HC=(CN)). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 158.0, 156.4, 149.7, 145.6, 136.3, 135.9, 134.9, 134.6, 133.8, 132.2, 131.9, 130.2, 127.4, 126.1, 125.0, 124.4, 118.2, 116.5, 116.3, 115.3, 101.9, 99.6.

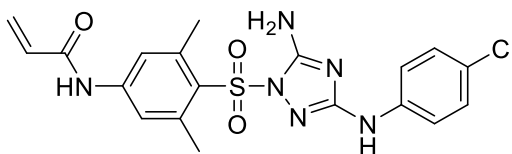
1-[(6-Хлор-2-нафтил)сульфонил]-N³-(4-хлорфенил)-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.49**.



Белое твердое вещество, выход 62%. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{14}Cl_2N_5O_2S]^+$ m/z 434.0240, найдено m/z 434.0240 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.32 (уш.с, 1H, NH), 8.77 (д, $J = 1.9$ Гц, 1H, HC(1')), 8.29 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, HC(4')), 8.19 (д, $J = 1.9$ Гц, 1H, HC(5')), 8.16 (д, $J = 9.2$ Гц, 1H, HC(8')), 7.95 (дд, $J = 8.7, 2.0$ Гц, 1H, HC(3')), 7.71 (дд, $J = 8.8, 2.1$ Гц, 1H, HC(7')), 7.45 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.41 (с,

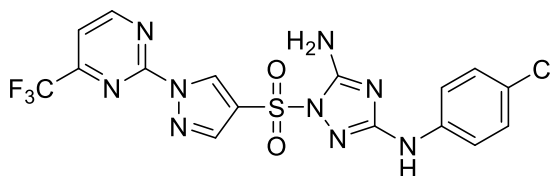
2H, NH₂), 7.24 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 159.6, 157.3, 139.6, 135.8, 134.6, 133.5, 131.7, 129.9, 129.5, 129.1, 128.7, 128.3, 126.7, 123.7, 123.1, 118.1.

N-[4-[[5-Амино-3-(4-хлоранилино)-1,2,4-триазол-1-ил]сульфонил]-3,5-диметилфенил]проп-2-енамид **3.50**.



Белое твердое вещество, выход 57%. (+)ИЭР-МС (TOF): [M+H]⁺ вычислено для [C₁₉H₂₀ClN₆O₃S]⁺ m/z 447.1001, найдено m/z 447.0999 ($\Delta = -0.5$ м.д.). ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 10.42 (с, 1H, NHCO), 9.33 (с, 1H, NH), 7.60 (с, 2H, HC(2', 6')), 7.39 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.25 (с, 2H, NH₂), 7.21 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')), 6.42 (дд, $J = 17.0, 10.1$ Гц, 1H, (E)-HC=), 6.30 (дд, $J = 17.0, 2.0$ Гц, 1H, (Z)-HC=), 5.81 (дд, $J = 10.1, 2.0$ Гц, 1H, HCCO), 2.65 (с, 6H, 2CH₃). ¹³C-ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 163.7, 158.6, 155.7, 143.3, 141.8, 139.8, 131.3, 128.3, 128.2, 128.1, 123.5, 120.8, 117.9, 22.8.

*N*³-(4-хлорфенил)-1-[1-[4-(трифторметил)пиримидин-2-ил]-имидазол-4-ил]сульфонил-1,2,4-триазол-3,5-диамин **3.51**.



Белое твердое вещество, выход 55%. (+)ИЭР-МС (TOF): [M+H]⁺ вычислено для [C₁₆H₁₂ClF₃N₉O₂S]⁺ m/z 486.0470, найдено m/z 486.0470 ($\Delta = 0.1$ м.д.). ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 9.42 (уш.с, 1H, NH), 9.29 (с, 1H, HC(5')), 9.28 (д, $J = 5.0$ Гц, 1H, HC(6''')), 8.39 (с, 1H, HC(2')), 8.09 (д, $J = 5.0$ Гц, 1H, HC(5''')), 7.52 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(3'', 5'')), 7.44 (уш.с, 2H, NH₂), 7.28 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H, HC(2'', 6'')). ¹³C-ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 163.4,

159.9, 157.4, 155.4 (к, $J = 48$ Гц), 154.5, 141.6, 139.5, 132.7, 128.4, 123.8, 121.2, 118.9 (к, $J = 274$ Гц), 118.2, 116.9.

3.2.3 Клеточные и вирусные культуры

Клетки TZM-bl [345], ВИЧ-1 штаммов IIIB [346–348], IIIB вариант A17 [349] и NL4-3 варианты p5485, pNLGRINFQ и p7324-1 [350] были получены в рамках программы HIV Reagent Program Национальных институтов здравоохранения США. Клетки H9 (производные HuT 78) и 293T были получены из коллекции культур American Type Culture Collection (каталожные номера ATCC HTB176 и CRL-3216 соответственно). Вирусы IIIB и A17 выращивали в клетках H9 до высокого титра, который подтверждали с помощью набора для количественного определения ВИЧ AlphaLISA p24 high sensitivity (PerkinElmer). Плазмиды вирусов p5485, pNLGRINFQ и p7324-1 трансфицировали в клетки 293T с использованием реактива FuGene6 (Promega) и выращивали в клетках H9 до высокого титра. Вирусы были сконцентрированы до требуемого уровня с использованием концентратора Lenti-X (Takara Bio USA). Инфицирование клеток TZM-bl проводили с использованием диэтиламиноэтилдекстрана (15 мкг/мл).

3.2.3 Тесты на ингибирование и токсичность

Исследуемые соединения последовательно разбавлялись начиная с р-ра 10 мМ в ДМСО, при этом концентрация ДМСО поддерживалась на постоянном уровне (0.05 или 0.005 % в зависимости от наибольшей используемой концентрации). В дублированные 96-луночные планшеты помещали 25 мкл раствора исследуемого соединения, 25 мкл раствора вируса и 50 мкл раствора клеток TZM-bl (2×10^5 /мл) с добавлением диэтиламиноэтилдекстрана. Полученные растворы инкубировали 48 ч. при 37 °C в 5 % CO₂. Все соединения тестировались дважды минимум в трех повторениях в течение нескольких дней. В каждом планшете в качестве контроля присутствовали 1 лунка с раствором эфавиренза (положительный

контроль), 3–5 лунок контроля без соединения, 1 лунка без клеток и 1 лунка с высокотоксичной (9 %) концентрацией ДМСО.

Тесты на ингибирование проводили в прозрачных планшетах, обработанных тканевой культурой, с переносом лизатов в черные планшеты или непосредственно в черных планшетах, обработанных тканевой культурой. Среду удаляли, клетки лизировали с использованием буфера Glo Lys (Promega), добавляли люциферазу светлячков Luciferase Assay System (Promega) и измеряли относительную освещенность с использованием планшетного анализатора EnSpire (PerkinElmer).

Тесты на токсичность проводили в прозрачных планшетах, обработанных тканевой культурой. К инкубированным образцам добавляли реактив для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Blue (Promega) и дополнительно инкубировали 2 ч., останавливали реакцию 1.5 % раствором лаурилсульфата натрия и измеряли люминесценцию с использованием планшетного анализатора EnSpire (PerkinElmer).

3.2.4 Тесты на ингибирование ОТ

Ингибирование ОТ ВИЧ оценивалось по двум методикам.

Анализ, основанный на флюоресценцентном методе, проводили с использованием набора EnzChek (Molecular Probes) по модифицированному протоколу производителя. Исследуемые соединения последовательно десятикратно разбавляли начиная с раствора 10 мМ в ДМСО, при этом концентрацию ДМСО поддерживали на постоянном уровне (0.1 %). Диапазон используемых концентраций составлял 10 000 – 0.1 нМ. В 96-луночные планшеты помещали 20 мкл смеси поли(А) рибонуклеотидного шаблона и олиго d(T)16 праймеров, 4 мкл разбавленной обратной транскриптазы (Calbiochem) и 1 мкл раствора исследуемого соединения или 0.1 % раствора ДМСО в качестве контроля. Реакционную смесь инкубировали 30 мин. при комнатной температуре, после чего добавляли 125 мкл реактива для количественного определения двухцепочечной ДНК PicoGreen, инкубировали

2 – 5 ч. и определяли активность ОТ по концентрации ДНК с использованием планшетного анализатора Spectramax ID5 (Molecular Devices) при возбуждении 480 нм и регистрации эмиссии 520 нм. В каждой планшете в качестве контроля присутствовали 4 лунки с положительным контролем и 4 лунки контроля без соединения, каждое соединение анализировалось в 6 повторениях.

Анализ, основанный на колориметрическом методе, проводили с использованием набора для количественного определения ретровирусной обратнотранскриптазной активности (Roche) по протоколу производителя. Исследуемые соединения последовательно десятикратно разбавляли начиная с раствора 5 мМ в ДМСО, при этом концентрацию ДМСО поддерживали на постоянном уровне (0.5 %). Диапазон используемых концентраций составлял 5 000 – 0.05 нМ. В 96-луночные планшеты помещали 20 мкл раствора исследуемого образца, 20 мкл раствора 500 пМ ОТ и 20 мкл раствора шаблона и нуклеотидов. Реакционную смесь инкубировали 1 ч. при 37 °С в 5 % CO₂, после чего 50 мкл реакционной смеси переносили в покрытые стрептавидином 96-луночные планшеты и проводили ИФА по протоколу производителя. В каждой планшете в качестве контроля присутствовали 1 лунка с раствором эфавиренза (положительный контроль), 8 лунок контроля без соединения, 2 лунки контроля без ОТ и 2 лунки отрицательного контроля, каждое соединение анализировалось в 6 повторениях.

3.2.5 *In vitro* ADME-Tox

Все исследования *in vitro* ADME-Tox, кроме связывания с hERG, проводились в компании BioDuro (США) по стандартным протоколам, описанным ниже.

3.2.5.1 Биоаналитический метод для ADME

Количественное определение проводили на ВЭЖХ LC-20AD (Shimadzu) с использованием масс-спектрометра API 4000 (Sciex) с источником ионизации электрораспылением в качестве детектора.

Калибровочные растворы готовили последовательным разбавлением раствора исследуемого соединения в ДМСО с последующим разбавлением полученных рабочих растворов смесью ацетонитрил : вода (1:1).

3.2.5.2 Кинетическая растворимость

К 4 мкл раствора 50 мМ исследуемого соединения в ДМСО прибавляли 396 мкл универсального буфера pH 7.4, перемешивали 4 ч при 20 °С, осадок отфильтровывали и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения в фильтрате.

3.2.5.3 Кишечная роницаемость на модели Caco-2

Клетки Caco-2 выращивали на 24-луночных планшетных фильтрах (поликарбонатная мембрана 0.4 мкм). Монослои предварительно инкубировали теплым HBSS, содержащим 2.5 % HEPES-буфер (pH 7.4) 30 мин. при 37 °С, буфер удаляли и добавляли раствор исследуемого соединения до концентрации 10 мкМ. В приемный буфер добавляли 2 % бычьего альбумина. Общий объем составлял 400 мкл для апикальной (А) области и 1200 мкл для базолатеральной (В) области. Для исследования переноса из апикальной в базолатеральную (А-В) область, отбирали для количественного определения исследуемого соединения по 100 мкл из обеих областей в начале анализа и 200 мкл из апикальной области по окончании анализа (90 мин.). Исследование переноса из базолатеральной в апикальную (В-А) область проводили аналогично.

Коэффициент кажущейся проницаемости ($P_{\text{каж.}}$, см/с) рассчитывали по формуле (3.1):

$$P_{\text{каж.}} = \frac{V_a * \partial C_a / \partial t}{S * C_d^0}, \quad (3.1)$$

где V_a – объем акцепторной лунки, C_a – концентрация исследуемого соединения в акцепторной лунке, S – площадь поверхности (0.64 см² для используемых

планшетов), C_d^0 – исходная концентрация исследуемого соединения в донорной лунке.

3.2.5.4 Цитохромное ингибирование

Раствор микросом печени человека (Sekisu Xenotech) вместе с CYP субстратом аликвотировали до концентрации 0.2 мг/мл в 0.05 М фосфатный буфер (pH 7.4) в 1.1 мл пробирки, после чего в аликвоты добавляли исследуемое соединение или контрольный ингибитор, перемешивали в вихревом режиме, инкубировали 5 мин при 37 °С, добавляли 50 мкл раствора НАДФ-Н, перемешивали в вихревом режиме, инкубировали при перемешивании 20 мин при 37 °С, гасили реакцию 300 мкл раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле, интенсивно перемешивали в вихревом режиме 1 мин, центрифугировали при 4000 об./мин 15 мин при 4 °С, отбирали 100 мкл супернатанта и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения. Использовали следующие цитохромные субстраты (в скобках даны соответствующие контрольные ингибиторы): CYP1A2 (фенацетин, нафтофлавон), CYP2C9 (диклофенак, сульфафеназол), CYP2C19 (омепразол, транилципромин), CYP2D6 (декстрометопран, кинидин) и CYP3A4 (мидазолам, кетоконазол).

3.2.5.5 Стабильность в микросомах

По 197.5 мкл раствора 1.27 мг/мл микросом печени человека (Sekisu Xenotech) аликвотировали в 1.1 мл пробирки, после чего в аликвоты добавляли 2.5 мкл раствора 100 мкМ исследуемого соединения или положительного контроля в ДМСО, перемешивали в вихревом режиме, инкубировали 5 мин при 37 °С, добавляли 50 мкл буфера (с 5 мМ НАДФ-Н или без), и инкубировали 60 мин при 37 °С, отбирая по аликвоты по 15 мкл во временные точки 0, 5, 15, 30 и 60 мин (реакция с НАДФ-Н) или 0, 30 и 60 мин (реакция без НАДФ-Н). В отобранных таким образом аликвотах останавливали реакцию добавлением 300 мкл раствора 25 нг/мл пропанола в ацетонитриле, интенсивно перемешивали в вихревом режиме 1 мин,

центрифугировали при 4000 об./мин 15 мин при 4 °С, отбирали 100 мкл супернатанта и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения.

3.2.5.6 Связывание с белками плазмы

В донорную часть вставки для диализа помещали 200 мкл плазмы мыши или человека (BioDuro), содержащей 5 мкМ исследуемого соединения и 0.5 % ДМСО, в ресиверную часть помещали 350 мкл 100 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7.4). Собранный аппарат для диализа встряхивали при 100 об./мин 5 ч при 37 °С, из обеих частей диализной вставки отбирали аликвоты образца и доводили их до состава плазма : буфер 1:1. К 50 мкл полученных аликвот добавляли 300 мкл раствора 25 нг/мл пропанола в ацетонитриле, интенсивно перемешивали в вихревом режиме 1 мин, центрифугировали при 4000 об./мин 15 мин при 4 °С, отбирали 100 мкл супернатанта и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения.

Для оценки стабильности 2 образца плазмы, содержащей 5 мкМ исследуемого соединения, встряхивали 5 ч при 37 °С или выдерживали 5 ч при 4 °С, отбирали аликвоты 50 мкл, к которым добавляли 300 мкл раствора 25 нг/мл пропанола в ацетонитриле, интенсивно перемешивали в вихревом режиме 1 мин, центрифугировали при 4000 об./мин 15 мин при 4 °С, отбирали 100 мкл супернатанта и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения.

3.2.5.7 Связывание с hERG

Исследование кардиотоксичности по связыванию с hERG проводились с использованием набора Predictor hERG FP (Thermo FS) в SelectScreen Biochemical hERG Screening Service, Thermo FS (СИИА). Все анализы проводили в растворах, содержащих 1% ДМСО. Титрование осуществлялось по 10 точкам (трехкратные последовательные разбавления) с использованием буфера следующего состава: 25 мМ HEPES (рН 7.5), 15 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂,

0.05% полоксамера 407. Мембраны для определения связывания хранили в двухкратном буфере при -80°C , каждую партию мембран перед началом анализа предварительно титровали для определения концентрации мембран, обеспечивающей 70% связывание трейсера. Мембраны размораживали на водяной бане при 37°C , сонифицировали на Sonifier 450 (Branson) на 10 импульсах, помещали на лёд и сонифицировали на 5–10 импульсах до полной гомогенизации. Трейсер (250-кратный стоковый раствор) размораживали и разбавляли буфером до концентрации 1 нМ. В качестве контроля 100% ингибирования использовали ингибитор hERG E-4031 в концентрации 30 мкМ. Дополнительно регистрировали контроли помех поляризации (исследуемое соединение, 30 мкМ E-4031, мембраны, трейсер, 1% ДМСО) и флуоресценции (по сравнению полной флуоресценции исследуемого соединения и полной флуоресценции контролей 0% и 100% ингибирования).

3.2.6 *In vitro* нейротоксичность

3.2.6.1 Первичные культуры коры и гиппокампа мыши

Все работы с животными и клеточными культурами проводились в соответствии с требованиями Институционального комитета по содержанию и использованию животных Университета Северной Каролины в Чапел-Хилле.

Самок мышей CD1 (Charles Rivers Laboratories) на сроке беременности 16 дней анестезировали изофлураном капельным методом до остановки дыхания и сердца, проводили торакотомию, извлекали матку, кратковременно промывали ледяным 70% этанолом и дважды промывали ледяным стерильным HBSS с добавлением HEPES-буфера. Из каждого плода извлекали мозг, тщательно промывали и очищали от твердой арахноидальной оболочки и видимых сосудов. Из каждого мозга извлекали кору/гиппокамп, измельчали и переносили в 15 мл пробирку, содержащую 5 мл HBSS с добавлением 2.4 ед/мл диспазы и 2 ед/мл ДНКазы, и инкубировали 25–30 мин при 36°C . Ткани тритурировали и осаждали в течение 2 мин, взвешенные клетки переносили в 50 мл культуральную пробирку, содержащую 25 мл среды Neurobasal Plus

(Thermo FS) с добавлением вспомогательных компонентов B27 Plus (Thermo FS), GlutaMAX (Thermo FS), 5% фетальной бычей сыворотки и 20 мкг/мл гентамицина. После нескольких циклов тритурации в 2–3 мл HBSS (без добавления кальция и магния) диссоциированные клетки высевали с плотностью 2×10^4 клеток/см² в 48-луночные планшеты, покрытые *поли-D-лизином* (0.1 мг/мл 16 ч при 36 °C) или на обработанные *поли-D-лизином* 18 мм покровные стекла. По истечении 24 ч культуры переносили в среду Neurobasal Plus с добавлением вспомогательных компонентов B27 Plus и GlutaMAX. Содержание нейронов в полученных культурах на 4-й день посева составляло более 95 %.

3.2.6.2 Клеточная нейронная токсичность в первичных культурах

По 25 мкл 10-кратных разведений исследуемого соединения в ИСМЖ без белковых добавок (диапазон концентраций 0.1 – 10 000 нМ) добавляли в каждую лунку 48-луночного планшета, содержащую 225 мкл первичной культуры. Через 48 ч клетки фиксировали 3% раствором уксусной кислоты в метаноле и окрашивали на MAP-2. Количество и морфологию нейронов фиксировали инвертированным флуоресцентным микроскопом IX71 (Olympus) и оценивали при помощи программного пакета Metamorph (Molecular Devices).

3.2.6.3 Картирование кальция

К нейронам на 14–18 день *in vitro* добавляли раствор 2 мкМ кальциевого индикатора Fluo-4 AM (Molecular Probes) в ИСМЖ. Через 30 мин после загрузки красителя покровные стекла переносили на стенд для визуализации и регистрировали изображения на инвертированном флуоресцентном микроскопе IX71 (Olympus) в автоматическом режиме, поддерживая клетки в ИСМЖ. Для установления базального уровня флуоресценции в начале каждого эксперимента проводили 3 предварительных регистрации, после чего добавляли 1 мкМ раствор исследуемого соединения в ИСМЖ или отрицательный контроль, интервалы между регистрацией

составляли 6 с при выдержке 40 мс для острой фазы (6 мин) и 1 мин при выдержке 40 мс для отложенной фазы (40 мин). Эксперимент проводили в трех повторениях.

3.2.7 *In vivo* исследования

Все работы с животными и клеточными культурами проводились в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Федерального исследовательского центра «Молекулярные основы биотехнологии» РАН. Фармакокинетические исследования проводились на самцах специфических безпатогенных мышей BALB/c (ЦНИИТ РАМН) возрастом от 5 до 6 недель. До начала эксперимента животные содержались на стандартном виварийном сухом гранулированном корме.

3.2.7.1 Фармакокинетика

Для исследования были отобраны 24 особи со средней массой тела 20 г. Животные имели свободный доступ к воде, но были лишены пищи за 1 ч до и в течение 1 ч после введения исследуемого соединения. 0.5 мл суспензии исследуемого соединения (доза 250 мг/кг) в 1 % КМЦ с добавлением 0.05 % полисорбата 80 вводили путем внутрижелудочной интубации. Животных умерщвляли декапитацией и отбирали образцы крови, мозга и печени через 0.5, 1, 2, 3, 5, 8 и 24 ч после введения препарата в трех повторениях.

Образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин, плазму отделяли. К 100 мкл плазмы добавляли 300 мкл ацетонитрила, интенсивно перемешивали в вихревом режиме, центрифугировали 5 мин при 13400 об/мин, отбирали 300 мкл супернатанта, высушивали в вакууме, добавляли 150 мкл 5% водного ацетонитрила и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения.

Образцы органов диспергировали с водой (1 к 1 по весу) в течение 3 мин, отбирали 200 мг получившейся смеси, добавляли 0.5 мм циркониевые шарики, интенсивно перемешивали 3 мин в вихревом режиме, добавляли 400

мкл ацетонитрила, центрифугировали 5 мин при 13400 об/мин, отбирали 400 мкл супернатанта, высушивали в вакууме, добавляли 300 мкл 50% водного ацетонитрила и проводили количественное определение содержания исследуемого соединения.

Количественный анализ проводили на ВЭЖХ Bruker Elute с использованием масс-спектрометра Impact II (Bruker) с источником ионизации электрораспылением в качестве детектора в следующих условиях: объем вкола 3 мкл, колонка Acquity HSS T3 2.1×100 мм, 1.8 мкм (Waters), температура колонки 25, скорость потока 0.4 мл/мин. с постколоночным делением потока 1:20, градиентное элюирование от 5 до 100% Б за 15 мин. (А: раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде, Б: раствор 0.1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле), на капилляре 4.5 кВ, диапазон сканирования m/z 100–1500, распыляющий газ — азот 0.7 бар, осушающий газ — азот 6 л/мин. 200 °С, частота регистрации 1 Гц, внешняя калибровка по раствору трифторацетата натрия. Обработку данных проводили с использованием программного пакета Compass DataAnalysis 5.1 (Bruker).

3.2.7.2 Острая токсичность

Для исследования были отобраны 10 особей с массой тела 19 – 21 г. Животные были лишены воды и пищи за 2 ч до введения исследуемого соединения. 0.5 мл суспензии исследуемого соединения (доза 2 г/кг) в 1 % КМЦ с добавлением 0.05 % полисорбата 80 (5 особей) или 0.5 мл 1% крахмального геля (5 контрольных особей) вводили путем внутрижелудочной интубации. Состояние животных наблюдали в течение 14 дней.

3.2.7.3 Субхроническая токсичность

Для исследования были отобраны 51 особь с массой тела 20.1 – 21.7 г. 0.2 мл на 20 г веса суспензии исследуемого соединения (дозы 2.5 и 25 мг/кг) в 1% крахмальном геле (по 17 особей) или 0.2 мл на 20 г веса 1% крахмального геля (17 контрольных особей) вводили путем внутрижелудочной интубации. В

ходе эксперимента регистрировали изменения массы тела животных, состояние их шерсти, слизистых оболочек и характер выделений.

Животные имели свободный доступ к воде, но были лишены пищи в течение 2 ч после введения исследуемого соединения, после чего у них бралась кровь и проводился анализ на содержание общего белка, мочевины, креатинина, аспартат аминотрансферазы, аланин аминотрансферазы, и щелочной фосфатазы с использованием биохимического анализатора Express Plus (Bayer), оценивалось содержание гемоглобина, уровень гематокрита, количество эритроцитов, лейкоцитов и ретикулоцитов, а так же проводился дифференциальный анализ крови.

Через 24 ч после введения препарата оценивали уровень двигательной активности животных, регистрируя количество стоек (вертикальная составляющая) в 3-минутном промежутке. Для этого по одному животному за раз помещали в непрозрачный цилиндр диаметром 160 мм, освещенный с расстояния в 1 м сверху электрической лампой (710 Лм).

На 28 день эксперимента животных эвтаназировали и проводили макроскопическое исследование внутренних органов и морфометрический анализ, после чего брали части органов и консервировали 10 % раствором формальдегида. Срезы органов для гистологического анализа готовили по общепринятым методикам с парафинированием и окрашиванием гематоксилином и эозином.

3.2.8 Докинг

Структурно-ориентированный анализ проводили путем докинга молекул в различные структурные фрагменты ОТ ВИЧ дикого типа и K103N/Y181C с использованием программного пакета Discovery Studio LibDock (Biovia) методом жесткого докинга используя настройки по умолчанию. Сфера докинга была выбрана исходя из кристаллографических данных для комплексов рилпивирин с диким типом и JLJ494 с K103N/Y181C.

3.2.9 Визуализация по алгоритму t-SNE

Алгоритм t-SNE [351] переносит данные в пространство меньшей размерности. Для всех соединений генерировали 1024 цифровых отпечатка ECFP6, которые затем встраивали в двухмерный вектор t-SNE преобразованием с использованием Python библиотеки scikit-learn с гиперпараметрами по умолчанию.

3.3 К разделу 2.2

3.3.1 Синтетические процедуры

Все соединения были синтезированы согласно схеме 2.2.1 по методикам, описанным ниже.

Стадия (а). Раствор соответствующих альдегида (1.0 экв.) и фенилгидразина (1.0 экв.) в этаноле перемешивали при к. т. в течение 2 ч, осадок бензохинона собирали и перекристаллизовывали из этанола.

Стадия (б). К суспензии соответствующего бензальдегид фенилгидразона (1.0 экв.) в уксусной кислоте добавляли 0.1 экв. Толуолсульфоновой кислоты и 1.0 экв. соответствующего бензохинона, перемешивали при к. т. в течение 24 ч, осадок индазолхинона собирали, промывали уксусной кислотой и водой и перекристаллизовывали из бензола.

Стадия (в). К суспензии индазолхинона (3 г, 1.0 экв.) в уксусной кислоте (100 мл) с добавлением уксусного ангидрида (1 мл) при к. т. добавляли соответствующий этиловый эфир 3-аминобут-2-енойной кислоты (1.94 г, 1.5 экв.), перемешивали при 55–60 °С в течение 24 ч, осадок пирролоиндазола собирали, промывали уксусной кислотой и водой, высушивали и перекристаллизовывали из дихлорэтана.

Стадия (г). Смесь пирролоиндазола (2.18 г, 1.0 экв.) и уксусного ангидрида (52 мл) кипятили в течение 4 ч, выливали в холодную воду (100 мл), осадок собирали, промывали водой, высушивали.

Стадия (д). Смесь пирролоиндазола (3.09 г, 1.0 экв.), БСИ (1.32 г, 1.05 экв.) и перекиси бензоила (1 мг) в ЧХУ (59 мл) кипятили в течение 5 ч,

фильтровали, концентрировали в вакууме, обрабатывали гексаном, осадок собирали, промывали гексаном, высушивали и перекристаллизовывали из смеси гексан-бензол.

Стадия (е). К раствору пирролиндазола (1.3 г, 1.0 экв.) в бензоле (24 мл) добавляли пиперидин (0.47 мл, 2.0 экв.) перемешивали при к. т. в течение 3 ч, разбавляли водой (2×30 мл), органический слой отделяли, высушивали над безводным сульфатом магния, концентрировали в вакууме и перекристаллизовывали из этанола.

Стадия (ж). Пирролиндазол (0.3 г, 1.0 экв.) прибавляли к раствору гидроксида калия (0.03 г, 1 экв.) в этаноле (10 мл), перемешивали при к. т. в течение 10–20 мин, выливали в холодную воду (10 мл), подкисляли 33% соляной кислотой до pH 6.5, осадок собирали, высушивали и перекристаллизовывали из этанола.

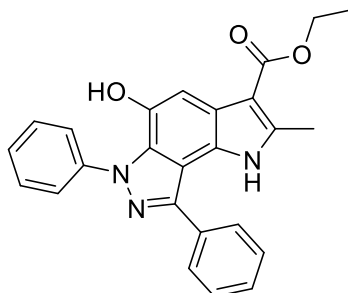
Стадия (з). К раствору пирролиндазола (0.3 г, 1.0 экв.) в НМП (4 мл) прибавляли карбонат калия (0.18 г, 2.0 экв.) и метил йодид (0.08 мл, 2.0 экв.), перемешивали при к. т. в течение 20 ч, выливали в холодный водный раствор хлорида натрия, осадок собирали, промывали водой, высушивали и очищали колоночной хроматографией на силикагеле в смеси гексан-этилацетат.

Стадия (и). Смесь пирролоиндазола (0.44 г, 1.0 экв.) и 10 масс. % Pd на активированном угле (0.05 г, 10 мол. %) в этаноле (100 мл) перемешивали в атмосфере водорода (3.9 атм.) при к. т. в течение 24 ч, отфильтровывали через силикагель с промыванием дихлорэтаном, концентрировали в вакууме и очищали колоночной хроматографией на силикагеле в смеси хлороформ-метанол.

Стадия (к). К суспензии пирролиндазола (0.15 г, 1.0 экв.) в уксусной кислоте (4 мл) добавляли 2,5-диметокситетрагидрофуран (0.05 мл, 1.1 экв.), перемешивали при 50 °С в течение 45 мин, концентрировали в вакууме и очищали колоночной хроматографией на силикагеле в смеси гексан-этилацетат.

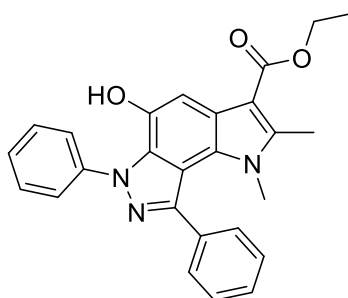
3.3.2 Аналитические данные синтезированных соединений

5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6,8-дифенилпирроло[2,3-е]индазол 4.1.



Желтое твердое вещество, выход 53%. Температура плавления 268-271 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{25}H_{22}N_3O_3]^+$ m/z 412.1656, найдено m/z 412.1654 ($\Delta = -0.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.85 (уш.с, 1H, NH), 9.70 (уш.с, 1H, 5-OH), 7.86 (м, 2H, H_{ar} , 4-H), 7.74-7.26 (м, 9H, 6-Ph, 8-Ph), 4.30 (к, $J = 7.0$, 2H, CH_2CH_3), 2.68 (с, 3H, 2- CH_3), 1.38 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.2, 143.7, 141.5, 140.9, 139.0, 133.4, 129.9, 129.2, 128.1, 127.8, 126.9, 126.1, 122.3, 118.9, 110.6, 104.0, 103.9, 58.7, 14.5, 13.8.

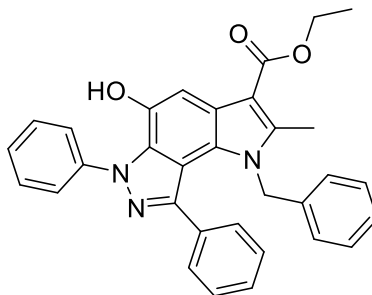
5-гидрокси-3-этоксикарбонил-1,2-диметил-6,8-дифенилпирроло[2,3-е]индазол 4.2.



Светло-бежевое твердое вещество, выход 50%. Температура плавления 270-272 °С (дихлорэтан). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{26}H_{24}N_3O_3]^+$ m/z 426.1812, найдено m/z 426.1813 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.76 (уш.с, 1H, 5-OH), 7.75-7.35 (м, 11H, 6-Ph, 8-Ph, 4-H), 4.30 (к, $J = 7.0$, 2H, CH_2CH_3), 3.13 (с, 3H, 1- CH_3), 2.57 (с, 3H, 2- CH_3), 1.37 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.0, 143.6,

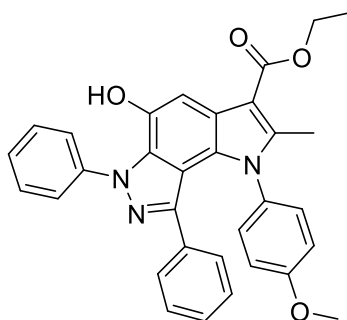
142.0, 140.9, 138.9, 135.9, 130.0, 128.6, 128.2, 127.8, 126.9, 126.2, 122.1, 121.5, 111.9, 103.9, 58.8, 34.8, 14.5, 11.9.

*1-бензил-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6,8-дифенилпирроло[2,3-*e*]индазол 4.3.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 47%. Температура плавления 256-258 °С (дихлорэтан). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{32}H_{28}N_3O_3]^+$ m/z 502.2125, найдено m/z 502.2132 ($\Delta = 1.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.84 (уш.с, 1H, 5-OH), 7.74 (с, 1H, 4-H), 7.66-7.21 (м, 10H, 6-Ph, 8-Ph), 7.21-7.00 (м, 3H, CH_2Ph), 6.30 (д, $J = 5.5$ Гц, 2H, CH_2Ph), 5.02 (уш.с, 2H, 1- CH_2Ph), 4.31 (к, $J = 7.1$ Гц, 2H, CH_2CH_3), 2.44 (с, 3H, 2- CH_3), 1.38 (т $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.0, 143.3, 141.9, 140.8, 139.3, 137.2, 135.6, 130.3, 129.7, 128.5, 128.3, 128.1, 127.7, 127.0, 126.9, 126.2, 125.1, 122.1, 121.8, 111.8, 105.1, 103.9, 59.0, 48.9, 14.4, 11.8.

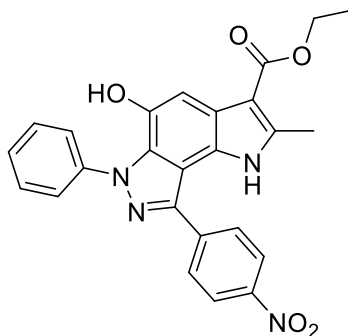
*5-гидрокси-3-этоксикарбонил-1-(4-метоксифенил)-2-метил-6,8-дифенилпирроло[2,3-*e*]индазол 4.4.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 25%. Температура плавления 277-279 °С (дихлорэтан). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для

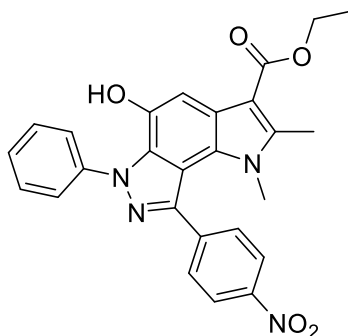
$[\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4]^+$ m/z 518.2074, найдено m/z 518.2077 ($\Delta = 0.6$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.85 (с, 1H, 5-OH), 7.75 (с, 1H, 4-H), 7.26-6.82 и 7.68-7.28 (м и м, 7H и 5H, 6-Ph, 8-Ph, HC(33), HC(37)), 6.47(д, $J = 8.8$ Гц, 2H, HC(34), HC(36)), 4.34 (к, $J = 7.1$ Гц, 2H, CH_2CH_3), 3.67 (с, 3H, 1- CH_3), 2.34 (с, 3H, 2- CH_3), 1.38 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.1, 158.5, 144.2, 142.5, 140.9, 139.5, 135.1, 130.5, 128.9, 127.7, 127.3, 126.9, 126.2, 122.4, 121.9, 114.3, 105.1, 103.7, 59.1, 54.8, 14.5, 13.1.

*5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-6-фенилтирроло[2,3-*e*]индазол 4.5.*



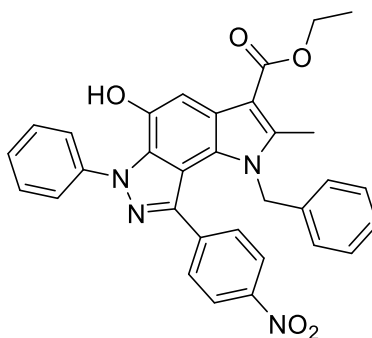
Оранжево-красное твердое вещество, выход 52%. Температура плавления 312-315 °С (бензол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5]^+$ m/z 457.1506, найдено m/z 457.1497 ($\Delta = -1.9$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 11.00 (уш.с, 1H, NH), 9.81 (с, 1H, 5-OH), 8.43 и 8.10 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H и 2H, 8- $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -*p*), 7.80-7.28 (м, 6H, 4-H, 6-Ph), 4.29 (к, 2H, OCH_2CH_3), 2.67 (с, 3H, 2- CH_3), 1.37 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.2, 147.0, 141.8, 141.7, 140.8, 140.0, 139.1, 130.2, 129.0, 128.0, 127.4, 126.3, 124.5, 122.9, 118.6, 110.7, 104.4, 104.1, 58.9, 14.5, 13.9.

*5-гидрокси-3-этоксикарбонил-1,2-диметил-8-(4-нитрофенил)-6-фенилтирроло[2,3-*e*]индазол 4.6.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 54%. Температура плавления 258-261 °С (дихлорэтан). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{26}H_{23}N_4O_5]^+$ m/z 471.1663, найдено m/z 471.1659 ($\Delta = -0.8$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.84 (с, 1H, 5-OH), 8.37 и 7.96 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H и 2H, 8- $C_6H_4NO_2$), 7.80-7.28 (м, 6H, 6-Ph, 4-H), 4.30 (к, 2H, CH_2CH_3), 3.21 (с, 3H, 1- CH_3), 2.61 (с, 3H, 2- CH_3), 1.37 (т, $J = 7.0$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.0, 147.3, 142.5, 142.3, 141.6, 140.7, 139.0, 131.1, 130.6, 127.9, 127.3, 126.3, 123.5, 121.9, 111.2, 104.2, 104.1, 58.9, 35.7, 14.4, 11.9.

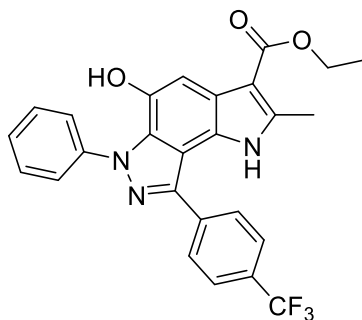
1-бензил-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-6-фенилтирроло[2,3-е]индазол 4.7.



Светло-бежевое твердое вещество, выход 46%. Температура плавления 226-228 °С (бензол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{32}H_{27}N_4O_5]^+$ m/z 547.1976, найдено m/z 547.1968 ($\Delta = -1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 9.90 (с, 1H, 5-OH), 8.01 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H, 8- $C_6H_4NO_2$), 7.76 (с, 1H, 4-H), 6.36, 7.14 и 7.28-7.71 (м, к и м, 2H, 3H и 7H, CH_2Ph , 6-Ph, 8- $C_6H_4NO_2$), 5.05 (уш.с, 2H, CH_2Ph), 4.31 (к, 2H, CH_2CH_3), 2.45 (с, 3H, 2- CH_3), 1.38 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 164.9,

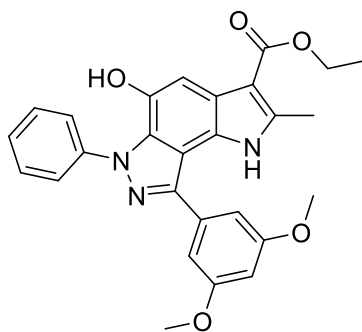
147.2, 142.1, 142.0, 141.3, 140.6, 139.3, 136.6, 130.9, 130.6, 128.4, 128.3, 127.8, 127.3, 127.1, 126.3, 124.9, 122.9, 122.1, 121.9, 111.3, 104.2, 59.1, 49.2, 14.4, 11.9.

5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-8-[4-(трифторметил)фенил]пирроло[2,3-е]индазол 4.8.



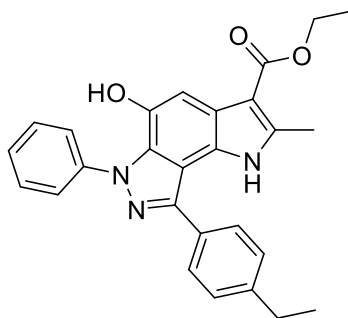
Светло-бежевое твердое вещество, выход 50%. Температура плавления 228-232 °С (уксусная кислота). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{26}H_{21}F_3N_3O_3]^+$ m/z 480.1530, найдено m/z 480.1520 ($\Delta = -2.0$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 10.95 (с, 1H, NH), 9.67 (уш.с, 1H, 5-OH), 8.07 (д, $J = 8.0$ Гц, 2H, 8- $C_6H_4CF_3$ - p), 7.82 (д, $J = 8.0$ Гц, 2H, 8- $C_6H_4CF_3$ - p), 7.69-7.44 (м, 6H, 4-Н, 6-Ph), 4.33 (к, 2H, CH_2CH_3), 2.70 (с, 3H, 2- CH_3), 1.42 (т, $J = 7.2$ Гц, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 165.1, 142.2, 141.6, 140.8, 139.0, 137.3, 130.1, 128.5, 127.9, 127.1, 126.4, 126.2, 126.1, 122.5, 118.6, 110.5, 104.1, 103.9, 58.7, 14.5, 13.8.

8-(3,5-диметоксифенил)-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-пирроло[2,3-е]индазол 4.9.



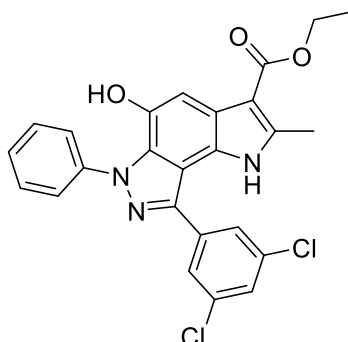
Светло-бежевое твердое вещество, выход 57 %. Температура плавления 264-267 °С (уксусная кислота). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{26}N_3O_5]^+$ m/z 472.1867, найдено m/z 472.1874 ($\Delta = 1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.34 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 2.66 (с, 3H, 2- CH_3), 3.81 (уш.с, 6H, 2OCH $_3$), 4.29 (к, 2H, OCH $_2CH_3$, $J = 7.1$ Гц), 6.61 (с, 1H, 8- $C_6H_3(OMe-m)_2$), 6.97 (с, 2H, 8- $C_6H_3(m-OMe)_2$), 7.35-7.70 (м, 6H, 4-H, 6-Ph), 9.70 (с, 1H, 5-OH), 11.03 (уш.с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (126 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.6, 14.6, 30.8, 35.8, 55.2, 58.8, 101.2, 103.9, 104.0, 105.4, 110.6, 118.9, 122.3, 126.2, 127.0, 127.9, 129.9, 135.1, 139.0, 140.9, 141.6, 143.7, 160.9, 162.3, 165.2.

8-(4-этилфенил)-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол **4.10**.



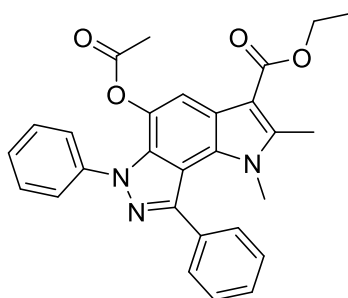
Светло-бежевое твердое вещество, выход 62 %. Температура плавления 292-295 °С (этанол/ацетон). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{26}N_3O_3]^+$ m/z 440.1969, найдено m/z 440.1974 ($\Delta = 1.2$ м.д.). 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.33 (м, 6H, 2CH $_3$), 2.73 (м, 5H, 2- CH_3 , CH_2CH_3), 4.31 (кв, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.3$ Гц), 7.25-7.68 (м, 8H, 6-Ph, 8- C_6H_4n-Et), 7.76 (д, 2H, 8- C_6H_4n-Et , $J = 8.0$ Гц), 9.66 (с, 1H, 5-OH), 10.83 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.7, 14.4, 15.2, 28.0, 58.7, 102.4, 103.4, 103.5, 110.1, 118.6, 121.8, 125.7, 125.9, 126.4, 127.1, 127.3, 127.4, 127.5, 127.6, 128.2, 129.5, 130.4, 138.6, 140.6, 141.1, 143.2, 143.4, 160.3, 164.9.

8-(3,5-дихлорфенил)-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол **4.11**.



Светло-бежевое твердое вещество, выход 68 %. Температура плавления 297-300 °С (этанол/ацетон). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{25}H_{20}Cl_2N_3O_3]^+$ m/z 480.0876, найдено m/z 480.0868 ($\Delta = -1.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.38 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 2.65 (с, 3H, 2- CH_3), 4.29 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 7.32-7.88 (м, 9H, 4-H, 6-Ph, 8- $C_6H_3(m-Cl)_2$), 9.75 (уш.с, 1H, 5-OH), 11.17 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 14.5, 58.8, 103.9, 104.2, 110.4, 118.4, 122.5, 125.5, 126.1, 126.5, 127.1, 127.6, 127.8, 127.9, 128.7, 129.8, 134.7, 136.6, 138.9, 140.6, 141.0, 141.6, 165.0.

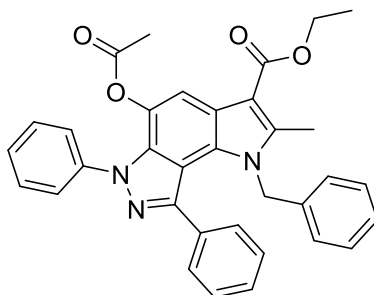
5-(ацетилокси)-3-этоксикарбонил-1,2-диметил-6,8-дифенил-пирроло[2,3-*e*]индазол **4.12**.



Бежевое твердое вещество, выход 96 %. Температура плавления 214-216 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{28}H_{26}N_3O_4]^+$ m/z 468.1918, найдено m/z 468.1918 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.35 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 1.59 (с, 3H, 5- $OCOCH_3$), 2.64 (с, 3H, 2- CH_3), 3.22 (с, 3H, 1- CH_3), 4.32 (к, 2H, CH_2CH_3), 7.37-7.83 (м, 10H, 6-Ph, 8-Ph),

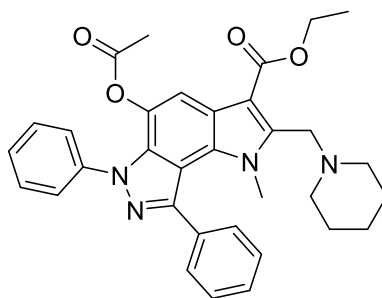
8.00 (с, 1H, 4-H). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ , м.д.: 11.9, 14.4, 19.5, 35.1, 59.2, 104.6, 111.6, 114.2, 120.2, 126.2, 126.8, 128.3, 128.8, 130.1, 130.3, 131.6, 135.3, 139.5, 143.5, 143.8, 164.7, 168.9.

5-(ацетилокси)-3-этоксикарбонил-1-бензил-2-метил-6,8-дифенил-пирроло[2,3-е]индазол 4.13.



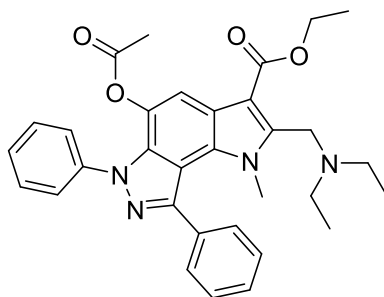
Бежевое твердое вещество, выход 97 %. Температура плавления 165-167 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4]^+$ m/z 544.2231, найдено m/z 544.2226 ($\Delta = -0.9$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.35 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 1.59 (с, 3H, 5- OCOCH_3), 2.62 (с, 3H, 2- CH_3), 4.33 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 5.13 (уш.с, 2H, 1- CH_2Ph), 6.35 и 7.00-7.73 (уш.с и м, 2H и 13H, 6-Ph, 8-Ph, CH_2Ph), 8.00 (с, 1H, 4-H). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 11.8, 14.3, 19.5, 49.1, 59.4, 105.8, 111.5, 114.3, 120.4, 125.0, 126.1, 126.8, 127.0, 128.1, 128.3, 128.5, 128.7, 129.7, 130.7, 131.7, 134.9, 136.7, 139.4, 143.3, 143.4, 164.6, 168.9.

5-(ацетилокси)-3-этоксикарбонил-1-метил-6,8-дифенил-2-(пиперидин-1-илметил)-пирроло[2,3-е]индазол 4.14.



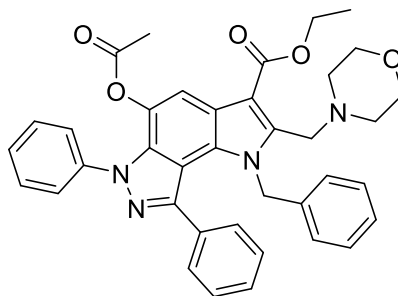
Бежевое твердое вещество, выход 74 %. Температура плавления 203-205 °С (этанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{33}H_{35}N_4O_4]^+$ m/z 551.2653, найдено m/z 551.2645 ($\Delta = -1.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.25-1.50 (м, 9H, CH_2CH_3 , 3'- CH_2 , 4'- CH_2 , 5'- CH_2), 1.56 (с, 3H, 5- $OCOCH_3$), 2.32 (уш.с, 4H, 2'- CH_2 , 6'- CH_2), 3.34 (с, 3H, 1- CH_3), 3.95 (с, 2H, 2- CH_2), 4.31 (к, 2H, CH_2CH_3), 7.44-7.76 (м, 10H, 6-Ph, 8-Ph), 7.92 (с, 1H, 4-H). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 14.5, 19.5, 23.9, 25.7, 35.4, 51.4, 53.6, 59.4, 107.1, 111.8, 114.5, 120.1, 126.9, 128.3, 128.4, 128.8, 128.9, 130.3, 130.6, 131.9, 135.5, 139.6, 141.8, 144.1, 164.5, 169.0.

*5-ацетокси-3-этоксикарбонил-2-((диэтиламино)метил)-1-метил-6,8-дифенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.15.*



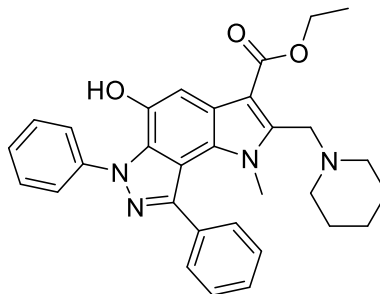
Светло-бежевое твердое вещество, выход 79 %. Температура плавления 185-187 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{32}H_{35}N_4O_4]^+$ m/z 539.2653, найдено m/z 539.2651 ($\Delta = -0.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 0.91 (с, 4H, 2 CH_2CH_3), 1.35 (т, 3H, $OSCH_2CH_3$, $J = 7.0$ Гц), 1.57 (с, 3H, 5- $OCOCH_3$), 4.09 (уш.с, 2H, $OSCH_2CH_3$), 4.32 (к, 2H, $OSCH_2NEt_2$, $J = 7.0$ Гц), 7.38-7.83 (м, 10H, 6-Ph, 8-Ph), 7.91 (с, 1H, 4-H). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 11.4, 14.3, 19.4, 35.6, 45.9, 46.9, 59.4, 106.9, 111.6, 114.4, 120.0, 126.8, 128.2, 128.8, 130.2, 130.5, 131.8, 135.3, 139.4, 142.9, 143.9, 164.5, 168.9.

5-(ацетилокси)-3-этоксикарбонил-1-бензил-2-(морфолин-4-илметил)-6,8-дифенил-пирроло[2,3-е]индазол **4.16**.



Светло-бежевое твердое вещество, выход 89 %. Температура плавления 134-136 °С (гексан/бензол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{38}H_{37}N_4O_5]^+$ m/z 629.2759, найдено m/z 629.2760 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.36 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 1.57 (с, 3H, 5- $OCOCH_3$), 2.28 (уш.с, 4H, $N(CH_2)_2O$), 3.81 (уш.с, 2H, 2- CH_2), 4.33 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 5.29 (уш.с, 2H, 1- CH_2Ph), 6.29 и 6.98-7.74 (д и м, 2H и 13H, 6-Ph, 8-Ph, 1- CH_2Ph , $J = 3.6$ Гц), 8.02 (с, 1H, 4-H). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 14.3, 19.5, 49.6, 50.9, 52.8, 59.7, 65.9, 108.5, 111.5, 114.5, 120.1, 124.8, 126.7, 126.9, 127.0, 127.9, 128.2, 128.4, 128.7, 129.8, 130.9, 132.0, 134.8, 137.6, 139.4, 140.5, 143.7, 164.3, 168.9.

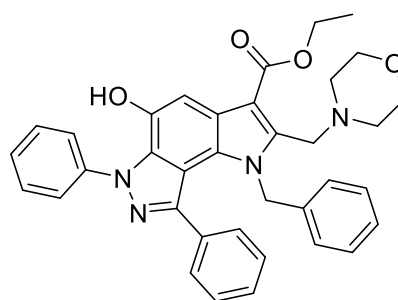
5-гидрокси-3-этоксикарбонил-1-метил-6,8-дифенил-2-(пиперидин-1-илметил)-пирроло[2,3-е]индазола гидрохлорид **4.17**.



Белое твердое вещество, выход 64 %. Температура плавления 285 °С (разложение). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{31}H_{33}N_4O_3]^+$ m/z 509.2547, найдено m/z 509.2552 ($\Delta = 0.9$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.43 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 1.79 (уш.с, 6H, 3'- CH_2 , 4'- CH_2 , 5'- CH_2),

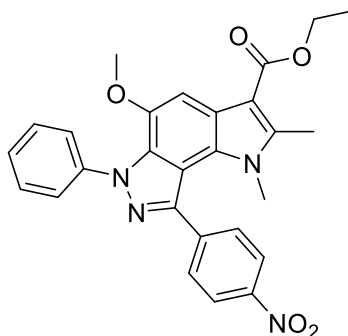
3.07 (уш.с, 2H, 2'-CH₂), 3.39 (уш.с, 5H, 1-CH₃, 6'-CH₂), 4.39 (к, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.0$ Гц), 4.74 (уш.с, 2H, CH₂), 7.28-7.84 (м, 11H, 6-Ph, 8-Ph, 4-H), 10.03 (уш.с, 2H, 5-OH). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 14.3, 21.1, 22.1, 36.3, 49.4, 52.5, 59.9, 103.3, 111.9, 121.3, 126.3, 127.2, 127.9, 128.2, 128.6, 130.0, 130.3, 131.3, 131.8, 135.6, 140.3, 140.7, 144.1, 164.7.

*1-бензил-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-(морфолин-4-илметил)-6,8-дифенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.18.*



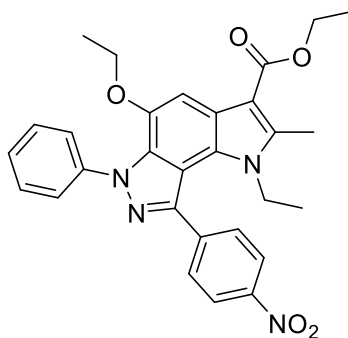
Белое твердое вещество, выход 63 %. Температура плавления 145-146 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{36}H_{35}N_4O_4]^+$ m/z 587.2653, найдено m/z 587.2656 ($\Delta = 0.5$ м.д.). ¹H-ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 1.38 (т, 3H, CH₂CH₃, $J = 7.0$ Гц), 2.28 (уш.с, 4H, N(CH₂)₂O), 3.26 (уш.с, 4H, N(CH₂)₂O), 3.79 (уш.с, 2H, CH₂), 4.31 (к, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.1$ Гц), 5.18 (уш.с, 2H, CH₂Ph), 6.09-6.41 и 6.95-7.68 (м и м, 2H и 13H, 6-Ph, 8-Ph, 1-CH₂Ph), 7.76 (с, 1H, 4-H), 9.93 (уш.с, 1H, 5-OH). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 14.4, 49.4, 51.1, 52.8, 59.3, 65.9, 103.8, 107.5, 111.7, 121.5, 123.0, 124.8, 126.3, 126.5, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.5, 129.7, 130.7, 135.4, 138.1, 139.3, 139.5, 140.7, 143.6, 164.8.

*5-метокси-3-этоксикарбонил-1,2-диметил-8-(4-нитрофенил)-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.19.*



Бежевое твердое вещество, выход 57 %. Температура плавления 292-295 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{25}N_4O_5]^+$ m/z 485.1819, найдено m/z 485.1831 ($\Delta = 2.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.38 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 2.66 (с, 3H, 2- CH_3), 3.22 (с, 3H, 1- CH_3), 3.74 (с, 3H, 5- OCH_3), 4.31 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 7.35-7.66 (м, 5H, 6-Ph), 7.71 (с, 1H, 4-H), 7.96 и 8.40 (д и д, 2H и 2H, 8- $C_6H_4n-NO_2$, $J = 8.6$ Гц). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 12.0, 13.8, 14.4, 30.8, 35.8, 55.6, 59.1, 101.3, 104.6, 111.2, 121.5, 123.6, 124.5, 126.3, 127.7, 128.1, 129.1, 130.8, 131.2, 140.8, 141.8, 142.1, 142.7, 147.5, 162.4, 165.0.

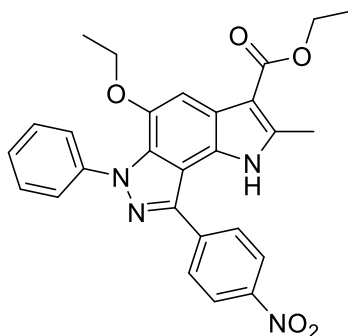
*5-этокси-3-этоксикарбонил-1-этил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-6-фенил-тирроло[2,3-*e*]индазол 4.20.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 10 %. Температура плавления 175-177 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{29}H_{29}N_4O_5]^+$ m/z 513.2132, найдено m/z 513.2137 ($\Delta = 1.0$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 0.72 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 1.05 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 1.37 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Гц), 2.65 (с, 3H, 2- CH_3), 3.76 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 4.01 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 4.30 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 7.43-7.68 (м,

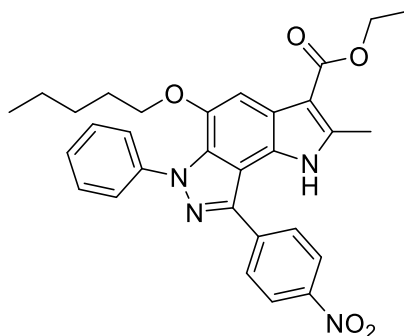
5H, 6-Ph), 7.73 (с, 1H, 4-H), 7.98 (д, 2H, 8-C₆H₄n-NO₂, $J = 8.6$ Гц), 8.38 (д, 2H, 8-C₆H₄n-NO₂, $J = 8.6$ Гц). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 11.4, 13.9, 14.2, 14.6, 58.9, 64.0, 102.2, 105.1, 111.0, 121.0, 121.8, 123.1, 126.5, 127.5, 127.7, 131.3, 140.7, 140.9, 141.3, 141.5, 142.5, 147.6, 164.8.

*5-этокси-3-этоксикарбонил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.21.*



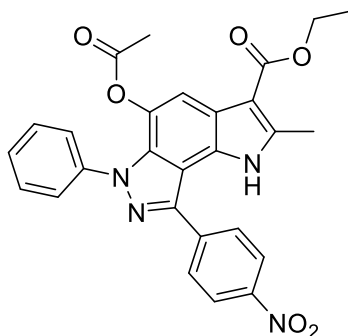
Светло-бежевое твердое вещество, выход 9 %. Температура плавления 252-256 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{25}N_4O_5]^+$ m/z 485.1819, найдено m/z 485.1824 ($\Delta = 1.0$ м.д.). ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 1.06 (т, 3H, CH₂CH₃, $J = 6.9$ Гц), 1.37 (т, 3H, CH₂CH₃, $J = 7.1$ Гц), 2.69 (с, 3H, 2-CH₃), 4.01 (к, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.0$ Гц), 4.31 (к, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.0$ Гц), 7.33-7.77 (м, 6H, 4-H, 6-Ph), 8.11 (д, 2H, 8-C₆H₄n-NO₂, $J = 8.7$ Гц), 8.43 (д, 2H, 8-C₆H₄n-NO₂, $J = 8.7$ Гц), 11.05 (уш.с, 1H, NH). ¹³C-ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 13.8, 14.1, 14.4, 30.8, 35.8, 58.9, 64.1, 102.2, 104.5, 110.4, 119.2, 122.4, 124.5, 126.6, 127.8, 127.9, 129.0, 130.7, 139.8, 140.7, 141.0, 141.6, 141.9, 147.0, 162.3, 165.1.

*3-этоксикарбонил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-5-(пентилокси)-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.22.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 19 %. Температура плавления 177-179 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{30}H_{31}N_4O_5]^+$ m/z 527.2289, найдено m/z 527.2293 ($\Delta = 0.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 0.78 (т, 3H, $O(CH_2)_4CH_3$, $J = 7.1$ Гц), 0.80-1.20 (м, 6H, $OCH_2(CH_2)_3CH_3$), 1.37 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 2.68 (с, 3H, 2- CH_3), 3.94 (т, 2H, $OCH_2(CH_2)_3CH_3$, $J = 5.9$ Гц), 4.29 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.0$ Гц), 7.28-7.75 (м, 6H, 4-Н, 6-Ph), 8.10 и 8.43 (д и д, 2H и 2H, 8- $C_6H_4n-NO_2$, $J = 8.7$ Гц), 11.11 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 14.4, 21.9, 27.5, 28.3, 58.9, 68.2, 69.8, 101.4, 104.5, 110.3, 119.0, 122.4, 124.5, 126.6, 127.9, 129.0, 130.7, 139.7, 140.9, 141.2, 141.5, 141.8, 147.0, 165.0.

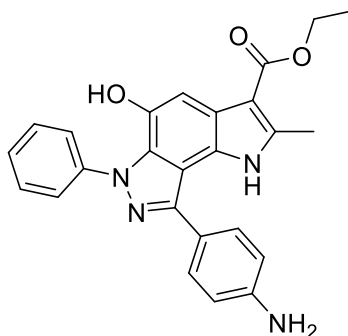
*5-(ацетилокси)-3-этоксикарбонил-2-метил-8-(4-нитрофенил)-6-фенил-тирроло[2,3-*e*]индазол 4.23.*



Светло-бежевое твердое вещество, выход 55 %. Температура плавления 223-225 °С (уксусная кислота). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{23}N_4O_6]^+$ m/z 449.1612, найдено m/z 449.1610 ($\Delta = -0.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.39 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 1.61 (с, 3H, 5- $OCOCH_3$), 2.72 (с, 3H, 2- CH_3), 4.31 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 7.53-7.68 (м,

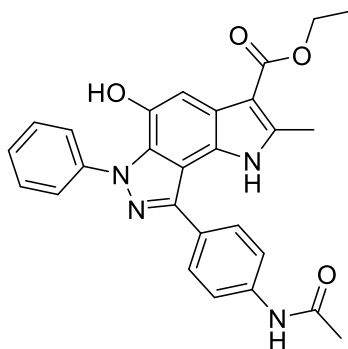
5H, 6-Ph), 7.85 (с, 1H, 4-H), 8.10 (д, 2H, 8-C₆H₄*n*-NO₂, $J = 8.0$ Гц), 8.44 (д, 2H, 8-C₆H₄*n*-NO₂, $J = 8.0$ Гц), 11.37 (с, 1H, NH). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 13.8, 14.5, 19.6, 59.2, 104.8, 110.4, 114.5, 121.6, 122.8, 124.6, 126.7, 128.6, 128.9, 129.3, 130.4, 131.6, 139.3, 139.4, 141.9, 143.2, 147.3, 164.8, 169.0.

*8-(4-аминофенил)-5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.24.*



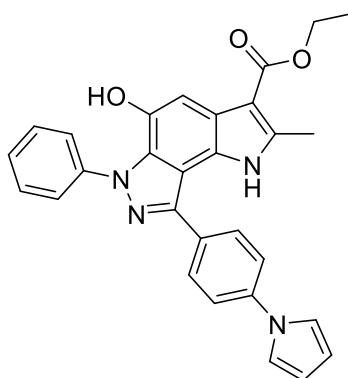
Белое твердое вещество, выход 59 %. Температура плавления 293-295 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{25}H_{23}N_4O_3]^+$ m/z 427.1765, найдено m/z 427.1771 ($\Delta = 1.4$ м.д.). ¹H-ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 1.37 (т, 3H, CH₂CH₃, $J = 7.2$ Гц), 2.68 (с, 3H, 2-CH₃), 4.30 (к, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.1$ Гц), 5.35 (с, 2H, NH₂), 6.74 (д, 2H, 8-C₆H₄*n*-NO₂, $J = 8.0$ Гц), 7.30-7.66 (м, 8H, 4-H, 6-Ph, 8-C₆H₄*n*-NO₂), 9.64 (с, 1H, 5-OH), 10.71 (с, 1H, NH). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 13.8, 14.6, 58.7, 103.8, 110.6, 114.4, 119.4, 120.7, 121.9, 126.0, 126.5, 127.8, 128.6, 129.7, 138.9, 141.1, 141.3, 144.7, 148.9, 165.3. ИК (KBr, ν , см⁻¹): 3450 (OH), 3387 и 3363 (NH₂), 3221 (NH), 1657 (C=O), 1497, 1454, 1175, 1130.

*5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-8-[4-(ацетиламино)фенил]-пирроло[2,3-*e*]индазол 4.25.*



Белое твердое вещество, выход 57 %. Температура плавления 291-294 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{27}H_{25}N_4O_4]^+$ m/z 469.1870, найдено m/z 469.1878 ($\Delta = 1.8$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.38 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 2.14 (с, 3H, 8- C_6H_4n -(NH-COCH $_3$)), 2.68 (с, 3H, 2-CH $_3$), 4.29 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 7.31-7.88 (м, 10H, 4-Н, 6-Ph, 8- C_6H_4n -(NH-COCH $_3$)), 9.69 (с, 1H, 5-OH), 10.15 (с, 1H, -NH-COCH $_3$), 10.85 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 14.6, 24.1, 58.7, 103.8, 119.0, 119.5, 122.2, 126.1, 126.8, 127.8, 128.0, 128.3, 129.9, 139.0, 139.4, 141.0, 141.5, 143.7, 165.2, 168.4.

5-гидрокси-3-этоксикарбонил-2-метил-6-фенил-8-[4-(1H-пиррол-1-ил)фенил]-пирроло[2,3-е]индазол 4.26.



Белое твердое вещество, выход 59 %. Температура плавления 270-272 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{29}H_{25}N_4O_3]^+$ m/z 477.1921, найдено m/z 477.1914 ($\Delta = -1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.39 (т, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 2.59 (с, 3H, 2-CH $_3$), 4.29 (к, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Гц), 6.32 (д, 2H, H_{ar} , $J = 8.00$ Гц), 7.30-7.93 (м, 12H, 4-Н, 6-Ph, 8- C_6H_4 , H_{ar}), 9.70 (с,

1H, 5-OH), 10.92 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 14.5, 58.7, 103.9, 104.1, 110.7, 118.8, 118.9, 119.8, 122.3, 126.1, 126.9, 127.8, 129.1, 129.9, 130.2, 138.9, 139.6, 140.9, 141.5, 143.1, 165.2.

3.3.3 Рентгеноструктурный анализ

3.3.3.1 Монокристалльная дифракция

Структуру **4.1** подтверждали методом рентгеноструктурного анализа (монокристалл) с использованием дифрактометра Stadi P (STOE & Cie), оснащенного детектором Pilatus100K (DECTRIS). Сбор данных и обработку изображений проводили с использованием программного пакета X-Area 1.67 (STOE & Cie), Данные масштабировали для минимизации разницы в интенсивности симметрично-эквивалентных отражений методом мультисканирования с использованием программного пакета Lana (STOE & Cie). Структуру соединения определяли прямым методом и корректировали полноматричным методом наименьших квадратов по F^2 с анизотропным смещением параметров для неводородных атомов. Все атомы водорода помещали в расчетные положения и корректировали в модели с фиксированными параметрами изотопного смещения (C–H 0.93–0.98, $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{Род.})$), положение атома водорода гидроксильной группы определяли синтезом Фурье и корректировали свободно. Все расчеты проводили с использованием программного пакета SHELX [352].

3.3.3.2 Порошковая дифракция

Структуру **4.24** подтверждали методом рентгеноструктурного анализа (порошок) с использованием дифрактометра Empyrean (Malvern Panalytical), оснащенного линейным детектором X'celerator (Malvern Panalytical). Порошковую структуру приводили к триклинной элементарной ячейке, кристаллическую структуру определяли в пространственной группе $P1$ с использованием алгоритма имитации отжига и корректировали по описанной процедуре [353,354] с использованием программного пакета MRUA [355]. В окончательной корректировке по Ритвельду с ограничением связей

выраженную текстуру образца учитывали с помощью симметричного гармонического разложения до четвертого порядка [356,357].

3.3.4 Клеточные и вирусные культуры

Клетки MDCK (Институт Фридриха Леффлера) выращивали в минимальной эссенциальной среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина и 1 % заменимых аминокислот. Эксперименты с вирусами гриппа А проводили в клетках MDCK в минимальной эссенциальной среде Игла с добавлением 2.3 % гидрокарбоната натрия, 2 мкг/мл трипсина, 2 mM L-глутамина и 1 % заменимых аминокислот (далее испытательная среда).

Вирусы гриппа A/Hong Kong/1/68 (Schaper and Brümmer) и A/Jena/8178/09 (выделен и предоставлен Энди Крумбхольцем [314]) выращивали до титра 2.0×10^7 и 6.3×10^7 TCID₅₀/мл соответственно в клетках MDCK, аликвоты вирусов хранили при -80°C . Эритроциты человека были получены в Институте трансфузионной медицины Университетской клиники Йены и непосредственное перед экспериментом промывались три раза натрий-фосфатным буфером.

3.3.5 Цитотоксичность

Клетки MDCK высевали с плотностью 2.3×10^4 клеток на лунку в 100 мкл ростовой среды в 96-луночные планшеты с плоским дном и выращивали в течение 48 ч при 37°C в 5 % CO₂, ростовую среду удаляли и добавляли 100 мкл испытательной среды (контроль, 6 повторений) или 50 мкл испытательной среды и 50 мкл раствора исследуемого соединения в тестовой среде (6 последовательных полулогарифмических разведений, максимальная концентрация 100 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях), инкубировали 72 ч при 37°C в 5 % CO₂, супернатант аспирировали, клеточные монослои трижды промывали 300 мкл физиологического раствора хлорида натрия для удаления погибших клеток, клетки фиксировали и окрашивали в один прием 50 мкл раствора 0.03 % кристаллического фиолетового в 20 %

водном метаноле в течение 10 мин, промывали 6 раз 300 мкл воды, обрабатывали 100 мкл буфера для лизиса (897.9 мг цитрата натрия и 1.25 мл 1Н соляной кислоты в 98.05 мл 47.5 % водного этанола) в течение 20 мин и определяли оптическую плотность отдельных лунок спектрофотометрически при 540 и 630 нм. Все работы проводили с использованием автоматического иммуноферментного анализатора DSX (DYNEX Technologies). Жизнеспособность клеток определяли как отношение оптической плотности исследуемой концентрации к среднему значению оптической плотности в 6 контрольных образцах. Каждый эксперимент проводили в 2 независимых повторениях.

3.3.6 Ингибирование цитопатического эффекта вируса гриппа А

Определение величины ингибирования цитопатического эффекта, вызванного вирусом гриппа А, проводили аналогично определению цитотоксичности, используя 50 мкл испытательной среды в качестве отрицательного и положительного контролей (по 6 повторений) или 50 мкл раствора озельтамивира, занамивира или исследуемого соединения (6 последовательных полулогарифмических разведений, максимальная концентрация 100 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях), которые затем инокулировали 50 мкл испытательной среды (отрицательный контроль) или 50 мкл суспензии вируса A/Hong Kong/1/68 или A/Jena/8178/09 в испытательной среде (0.008 и 0.005 TCID₅₀ на клетку соответственно). Каждый эксперимент проводили в 3 независимых повторениях.

3.3.7 Ингибирование вирусной нейраминидазы по гемагглютинации

Оценку влияния исследуемых соединений на активность нейраминидазы выполняли методом, основанного на обусловленной вирусом гемагглютинации. В лунки в 96-луночных полистирольных планшетах с V-образным дном помещали 25 мкл натрий-фосфатного буфера (контроль) или 25 мкл раствора исследуемого соединения (6 последовательных полулогарифмических разведений, максимальная концентрация 100 мкМ,

каждая концентрация в двух повторениях), озельтамивира или занамивира (6 последовательных полулогарифмических разведений, максимальная концентрация 1 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях) в натрий-фосфатном буфере, добавляли 25 мкл раствора вируса A/Jena/8178/09 (4 ед. гемагглютации), инкубировали 20 мин при 37 °С в 5 % CO₂, добавляли 50 мкл 1% раствора эритроцитов человека, выдерживали 2 ч при 4 °С, фиксировали гемагглютацию, инкубировали 24 ч при 37 °С в 5 % CO₂ и фиксировали обращение гемагглютации. Каждый эксперимент проводили в 2 независимых повторениях.

3.3.8 Ингибирование нейраминидазы *S. Pneumoniae* по гемагглютинации

Оценку влияния исследуемых соединений на активность нейраминидазы выполняли методом, основанного на обусловленной лектином гемагглютации. В лунки в 96-луночных полистирольных планшетах с плоским дном помещали 50 мкл натрий-фосфатного буфера (контроль) или 50 мкл раствора исследуемого соединения (6 последовательных полулогарифмических разведений, максимальная (двойная) концентрация 200 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях), добавляли 50 мкл раствора осажденных этанолом белков *S. Pneumoniae* (двойная концентрация, обеспечивающая гемагглютацию, штамм DSM20566, серотип 1, ATCC 33400, Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) в натрий-фосфатном буфере, инкубировали 20 мин при 37 °С в 5 % CO₂, добавляли 5 мкл 25 % раствора эритроцитов человека, гомогенизировали, инкубировали 4 ч при 37 °С в 5 % CO₂, 20 мкл отбирали и добавляли к 20 мкл 50 мкг/мл раствора лектина *A. hypogaea* (Sigma-Aldrich), инкубировали 16 ч при 4 °С и фиксировали обращение гемагглютации. Каждый эксперимент проводился в 3 независимых повторениях для активных соединений и в 2 независимых повторениях для неактивных соединений.

3.3.9 Докинг

В качестве источника координат атомов нейраминидаз вируса гриппа А H1N1, NanA и NanB *S. Pneumoniae* использовали кристаллографические данные PDB 4B7Q [316], 2VVZ [358] и 2JKB [359] соответственно. Предварительный докинг осуществляли с использованием программного пакета Autodock4 [360], набор из 8 наиболее вероятных комплексов использовали в качестве исходных параметров для молекулярно-динамических расчетов. Молекулярно-динамическое моделирование проводили на отрезке 100 нс для каждой модели с шагом интегрирования 1 фс с использованием программного пакета NAMD 3.0 Alpha MD [361], дополнительные прогоны по 150 нс проводили для стабильных комплексов, полученных в ходе моделирования, но отличавшихся от предсказанных предварительным докингом. Макромолекулы описывали параметрами силовых поля CHARMM36 [362,363] для белков, CGenFF [364] для 4.24 и TIP3P [365] для растворителя (вода).

3.3.10 Антибактериальные исследования

S. Pneumoniae (штамм DSM20566, серотип 1, ATCC 33400, Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) выращивали на пластинах кровяного агара Columbia с добавлением 5 % крови овцы (Becton Dickinson) в течение 16 ч при 37 °C в 5 % CO₂, после чего разбавляли бульоном с сердечно-мозговым экстрактом до мутности 1.5×10^8 КОЕ (эквивалентно стандарту мутности МакФарланда 0.5).

3.3.10.1 Ингибирование планктонного роста

Раствор *S. Pneumoniae* без (контроль, 6 повторений) и с добавлением исследуемого соединения (6 последовательных двухкратных разбавлений, максимальная концентрация 50 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях) инкубировали в 96-луночных планшетах с V-образным дном в течение 18 ч при 37 °C в 5 % CO₂ и измеряли оптическую плотность при 620 нм.

3.3.10.2 Ингибирование образования биопленок

Раствор *S. Pneumoniae* разбавляли пятидесятикратно триптон-соевым бульоном и инкубировали в 96-луночных планшетах с плоским дном в течение 2 ч при 37 °С в 5 % CO₂, удаляли супернатант, прибавляли 200 мкл триптон-соевого бульона без (контроль, 6 повторений) и с добавлением исследуемого соединения (6 последовательных двухкратных разбавлений, максимальная концентрация 50 мкМ, каждая концентрация в двух повторениях), инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в 5 % CO₂, промывали водой, окрашивали биопленки кристаллическим фиолетовым в течение 16 ч, промывали водой, смывали краситель лизирующим буфером и измеряли оптическую плотность смыва при 550 нм.

3.4 К разделу 2.3

3.4.1 Синтетические процедуры

Все соединения были синтезированы согласно схеме 2.3.1 по методикам, описанным ниже.

N-(2-карбоксифенил)глицин **5.i.2** (стадия а) [366], 2-N-пропионамидо-бензойные кислоты **5.i.3** (стадия б) [367], 3-гидроксииндол-2-карбальдегиды **5.i.5** (стадия г) [343], 2-аминохлорацетофеноны **5.i.7** (стадия ж) [368], N-(2-(2-хлорацетил)фенил)ацетамиды **5.i.8** (стадия з) [368], 1-ацетил-3-индолиноны **5.i.9** (стадия и) [368], 7-азаиндол-3-карбоксальдегид **5.i.12** (стадия к) [369], 1-ацетил-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-3-карбальдегид **5.i.13** (стадия л) [370] и 1-ацетил-1,2-дигидро-3Н-пирроло[2,3-б]пиридин-3-он **5.i.14** (стадия м) [371] были синтезированы по литературным методикам.

Стадия (в). К смеси уксусного ангидрида (10 экв., 25 мл) и триметиламина (2 экв., 5 мл) прибавляли соответствующую бензойную кислоту (1 экв.), кипятили в течение 30 мин, концентрировали в вакууме, обрабатывали водой и экстрагировали 3 раза дихлорметаном, промывали органическую фазу 3 раза водой, высушивали над безводным сульфатом

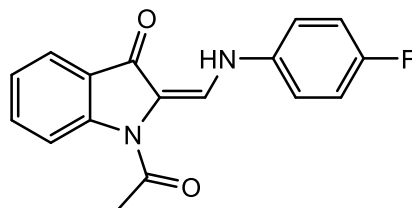
натрия, концентрировали в вакууме и очищали колоночной хроматографией на силикагеле в бензоле.

Стадия (д). Смесь соответствующего 1-индолин-3-она ацетата (1 экв.), пиперидина (1.5 экв.) и диметилацетата пиперидин-карбоксальдегида (3 экв.) в бензоле (5 мл) кипятили в течение 3 ч, концентрировали в вакууме и использовали без дополнительной очистки.

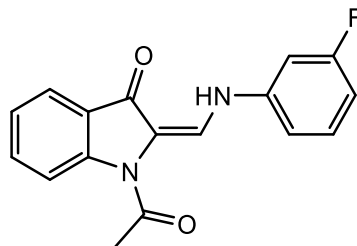
Стадия (е). К концентрированной смеси (*стадия (г)*, 1 экв. 1-индолин-3-ону) добавляли соответствующий анилин (1.2 экв.) в смеси уксусной кислоты (2.5 мл) и изопропанола (5 мл), кипятили в течение 20 мин, охлаждали до к. т., осадок отфильтровывали, промывали изопропанолом и этиловым эфиром и перекристаллизовывали из изопропанола.

3.4.2 Аналитические данные синтезированных соединений

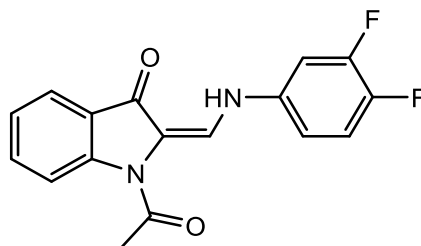
1-Ацетил-2-(((4-фторфенил)амино)метилен)индолин-3-он **5.9**



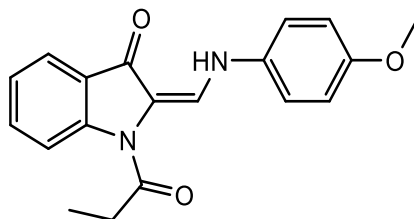
Белое твердое вещество, выход 68%. Температура плавления 167-168 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{14}FN_2O_2]^+$ m/z 297.1034, найдено m/z 297.1040 ($\Delta = 1.9$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д: 2.69 (3H, с, CH_3CO), 7.29 (5H, м, CH, 4 CH_{ar}), 7.56-7.88 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.93 (1H, д, $J = 9.6$ Гц, CH_{ar}), 11.81 (1H, д, $J = 11.4$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 26.8, 116.2, 116.6, 116.7, 118.2, 118.4, 122.4, 123.6, 124.8, 133.5, 136.5, 143.2, 156.3, 161.1, 168.6, 180.0.

1-Ацетил-2-(((3-фторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.10

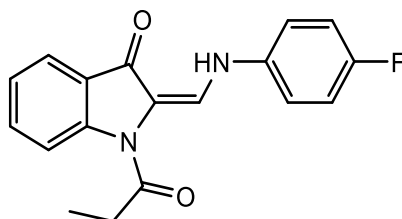
Белое твердое вещество, выход 44%. Температура плавления 122-123 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{14}FN_2O_2]^+$ m/z 297.1034, найдено m/z 297.1046 ($\Delta = 4.0$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 6.89 (1H, т, $J = 7.7$ Гц, 5- CH_{ar}), 6.99-7.54 (4H, м, 4 CH_{ar}), 7.54-7.84 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.93 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.91 (1H, уш.с, CH), 11.73 (1H, с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.8, 103.2, 103.7, 109.8, 110.2, 112.4, 116.5, 116.8, 122.5, 123.6, 124.7, 131.3, 131.5, 133.8, 135.1, 141.6, 141.8, 143.5, 160.6, 165.4, 168.6, 180.6.

1-Ацетил-2-(((3,4-дифторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.11

Белое твердое вещество, выход 62%. Температура плавления 168-169 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{13}F_2N_2O_2]^+$ m/z 315.0940, найдено m/z 315.0951 ($\Delta = 3.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.66 (3H, с, CH_3CO), 7.08 (1H, д, $J = 8.9$ Гц, 2'- CH_{ar}), 7.20-7.54 (3H, м, 3 CH_{ar}), 7.54-7.80 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.91 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.80 (1H, с, CH), 11.65 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.6, 105.9, 106.3, 112.9, 112.9, 113.0, 113.0, 116.5, 116.9, 118.1, 118.5, 122.5, 123.6, 124.7, 133.8, 135.6, 137.2, 143.8, 168.5, 180.6.

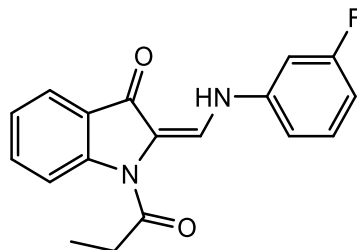
1-Пропионил-2-(((4-метоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.12

Белое твердое вещество, выход 50%. Температура плавления 184-185 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{19}N_2O_2]^+$ m/z 295.1441, найдено m/z 295.1442 ($\Delta = 0.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.20 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2CO), 3.05 (2H, к, $J = 7.0$ Гц, CH_3CH_2CO), 3.76 (3H, с, CH_3O), 6.99 (2H, д, $J = 8.9$ Гц, $2CH_{ar}$), 7.14-7.46 (3H, м, $3CH_{ar}$), 7.55-7.73 (1H, м, CH_{ar}), 7.79 (1H, d, $J = 7.6$ Гц, $4-CH_{ar}$), 7.96 (1H, д, $J = 8.6$ Гц, $7-CH_{ar}$), 9.04 (1H, уш.с, CH), 11.96 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.7, 30.8, 55.2, 115.0, 115.8, 116.5, 117.8, 122.1, 123.1, 125.0, 132.9, 137.0, 142.4, 156.0, 172.0.

1-Пропионил-2-(((4-фторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.13

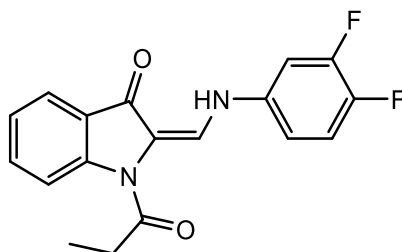
Белое твердое вещество, выход 36%. Температура плавления 146-148 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{16}FN_2O_2]^+$ m/z 311.1190, найдено m/z 311.1195 ($\Delta = 1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.19 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2CO), 3.05 (2H, к, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2CO), 7.09-7.55 (5H, м, $5CH_{ar}$), 7.68 (1H, т, $J = 7.8$ Гц, $5-CH_{ar}$), 7.79 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, $4-CH_{ar}$), 7.97 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, $7-CH_{ar}$), 9.02 (1H, уш.с, CH), 11.90 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.9, 31.0, 116.2, 116.4, 116.7, 116.9, 118.3, 118.5, 122.5, 123.5, 124.1, 124.9, 127.2, 127.7, 133.6, 136.4, 136.4, 136.7, 143.0, 156.3, 161.1, 172.3, 180.1.

1-Пропионил-2-(((3-фторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.14



Белое твердое вещество, выход 16%. Температура плавления 118-120 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{16}FN_2O_2]^+$ m/z 311.1190, найдено m/z 311.1195 ($\Delta = 1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.18 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2CO), 2.97 (2H, к, $J = 7.5$ Гц, CH_3CH_2CO), 6.90 (1H, т, $J = 8.4$ Гц), 7.00-7.54 (4H, м, 4 CH_{ar}), 7.54-7.84 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.92 (1H, д, $J = 8.4$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.95 (1H, уш.с, CH), 11.77 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.9, 31.0, 103.2, 103.8, 109.8, 110.2, 112.5, 116.9, 122.6, 123.5, 124.6, 131.3, 131.5, 133.9, 135.3, 141.7, 141.9, 143.4, 160.6, 165.5, 172.3, 180.7.

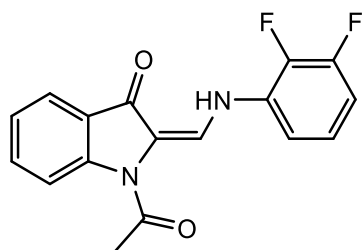
1-Пропионил-2-(((3,4-дифторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.15



Белое твердое вещество, выход 17%. Температура плавления 149-150 °С. (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{15}F_2N_2O_2]^+$ m/z 329.1096, найдено m/z 329.1106 ($\Delta = 3.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.17 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2CO), 2.97 (2H, к, $J = 7.5$ Гц, CH_3CH_2CO), 6.95-7.20 (1H, м, CH_{ar}), 7.20-7.57 (3H, м, 3 CH_{ar}), 7.57-7.83 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.92 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.87 (1H, уш.с, CH), 11.71 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 8.9, 25.4, 31.0, 106.8, 106.2, 112.8, 112.9, 116.8, 116.8,

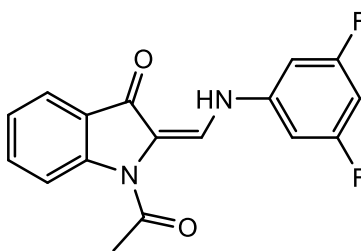
118.1, 118.5, 122.5, 122.8, 123.5, 124.1, 124.6, 133.8, 135.7, 137.1, 137.3, 143.2, 143.3, 143.5, 147.4, 147.6, 148.0, 148.3, 152.2, 152.5, 172.2, 180.5.

1-Ацетил-2-(((2,3-дифторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.16



Белое твердое вещество, выход 24%. Температура плавления 176-177 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{13}F_2N_2O_2]^+$ m/z 315.0940, найдено m/z 315.0948 ($\Delta = 2.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.68 (3H, с, CH_3CO), 6.90-4.49 (4H, м, 4 CH_{ar}), 7.50-8.05 (3H, м, 3 CH_{ar}), 8.93 (1H, уш.с, CH), 11.90 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.3, 110.6, 110.9, 11.6, 16.2, 117.5, 122.5, 123.4, 124.2, 124.9, 125.0, 125.1, 125.2, 129.9, 130.0, 133.9, 134.1, 137.5, 137.8, 142.4, 142.7, 143.7, 147.5, 147.7, 152.3, 152.5, 168.1, 181.3.

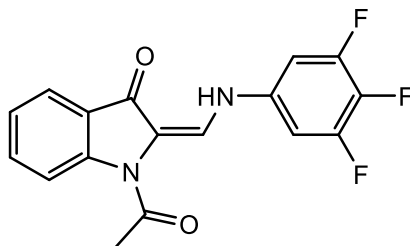
1-Ацетил-2-(((3,5-дифторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.17



Белое твердое вещество, выход 24%. Температура плавления 209-210 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{13}F_2N_2O_2]^+$ m/z 315.0940, найдено m/z 315.0939 ($\Delta = -0.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 6.82 (1H, тт, $J = 9.3, 2.2$ Гц, 4'- CH_{ar}), 6.93-7.18 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.30 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.51-7.84 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.95 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.77 (1H, уш.с, CH), 11.58 (1H, уш.с,

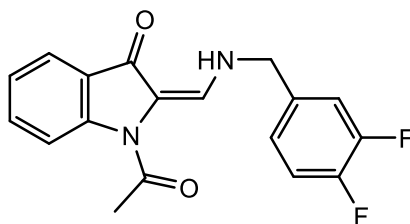
NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, DMSO-d_6) δ м.д.: 26.2, 97.4, 97.9, 99.3, 99.7, 99.9, 116.3, 117.1, 122.3, 123.4, 124.2, 133.8, 133.9, 144.0, 168.3, 181.0.

1-Ацетил-2-(((3,4,5-трифторфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.18

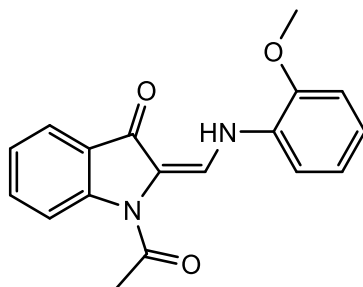


Белое твердое вещество, выход 16%. Температура плавления 184-185 °C (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2]^+$ m/z 333.0845, найдено m/z 333.0856 ($\Delta = 3.3$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6) δ м.д: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 6.99-7.52 (3H, м, 3CH_{ar}), 7.52-7.87 (2H, м, 2CH_{ar}), 7.97 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.71 (1H, уш.с, CH), 11.55 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, DMSO-d_6) δ м.д.: 26.7, 95.4, 101.2, 101.7, 116.7, 117.2, 122.6, 123.7, 124.4, 126.3, 127.9, 132.4, 134.2, 134.6, 136.7, 137.3, 144.0, 148.4, 153.3, 168.6, 181.0.

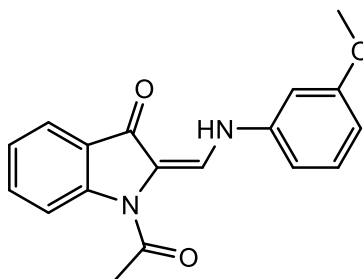
1-Ацетил-2-(((3,4-дифторбензил)амино)метилен)индолин-3-он 5.19



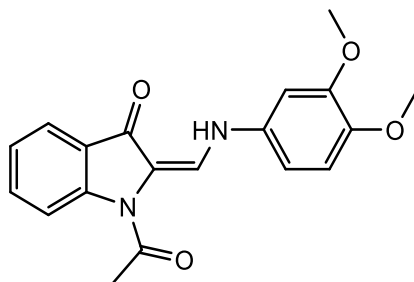
Белое твердое вещество, выход 31%. Температура плавления 154-155 °C (этилацетат). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2]^+$ m/z 329.1096, найдено m/z 329.1090 ($\Delta = -1.8$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6) δ м.д: 2.62 (3H, с, CH_3CO), 4.62 (2H, уш.с, CH_2), 6.91-8.16 (7H, м, 7CH_{ar}), 8.66 (1H, уш.с, CH), 10.35 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, DMSO-d_6) δ м.д.: 26.9, 50.7, 114.2, 116.4, 116.8, 117.5, 117.8, 122.0, 123.2, 124.2, 124.3, 125.6, 132.5, 136.6, 142.0, 146.4, 168.1, 178.3.

1-Ацетил-2-(((2-метоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.20

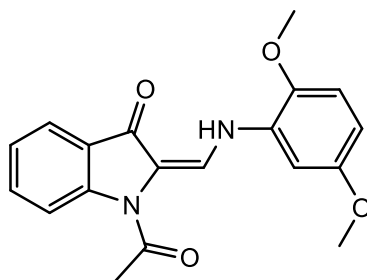
Белое твердое вещество, выход 58%. Температура плавления 179-180 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{17}N_2O_3]^+$ m/z 309.1234, найдено m/z 309.1232 ($\Delta = -0.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.68 (3H, с, CH_3CO), 3.93 (3H, с, CH_3O), 6.86-7.52 (6H, м, 6 CH_{ar}), 7.63 (1H, т, $J = 7.7$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.77 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 9.03 (1H, д, $J = 12.6$ Гц, CH), 12.02 (1H, д, $J = 12.7$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.9, 56.0, 111.7, 113.3, 116.5, 116.9, 121.4, 122.5, 123.6, 123.9, 125.0, 128.7, 133.4, 134.7, 143.1, 148.0, 168.6, 180.0.

1-Ацетил-2-(((3-метоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.21

Белое твердое вещество, выход 46%. Температура плавления 104-105 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{17}N_2O_3]^+$ m/z 309.1234, найдено m/z 309.1234 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.68 (3H, с, CH_3CO), 3.81 (3H, с, CH_3O), 6.61-6.98 (3H, м, 3 CH_{ar}), 7.11-7.48 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.49-7.86 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.93 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.95 (1H, уш.с, CH), 11.73 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.3, 55.0, 102.2, 108.4, 109.3, 116.2, 122.2, 123.2, 124.6, 130.4, 133.3, 135.6, 140.8, 143.2, 160.4, 168.2, 180.0.

1-Ацетил-2-(((3,4-диметоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.22

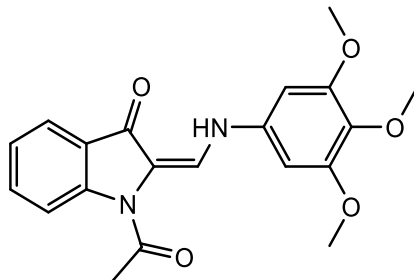
Белое твердое вещество, выход 71%. Температура плавления 199-200 °С (метанол:ДМФА). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{19}N_2O_4]^+$ m/z 339.1339, найдено m/z 339.1345 ($\Delta = 1.9$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 3.75 и 3.83 (3H, с, $2CH_3O$), 6.55-7.16 (3H, м, $3CH_{ar}$), 7.29 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, $5-CH_{ar}$), 7.48-8.07 (3H, м, $3CH_{ar}$), 8.91 (1H, уш.с, CH), 11.85 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.6, 55.9, 56.2, 102.7, 108.3, 113.7, 116.1, 116.5, 122.3, 123.4, 125.2, 133.2, 133.8, 137.0, 43.0, 146.2, 150.2, 168.4, 179.5.

1-Ацетил-2-(((2,5-диметоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.23

Белое твердое вещество, выход 47%. Температура плавления 176-177 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{19}N_2O_4]^+$ m/z 339.1339, найдено m/z 339.1352 ($\Delta = 3.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.69 (3H, с, CH_3CO), 3.76 и 3.89 (3H и 3H, с и с, $2CH_3O$), 6.62 (1H, дд, $J = 8.9, 2.7$ Гц, $3'-CH_{ar}$), 6.90 (1H, д, $J = 2.7$ Гц, $6'-CH_{ar}$), 7.01 (1H, д, $J = 8.9$ Гц, $4'-CH_{ar}$), 7.31 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, $6-CH_{ar}$), 7.64 (1H, т, $J = 7.8$ Гц, $5-CH_{ar}$), 7.77 (1H, д, $J = 7.6$ Гц, $4-CH_{ar}$), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, $7-CH_{ar}$), 8.94 (1H, д, $J = 11.9$ Гц, CH), 11.94 (1H, д, $J = 12.3$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.5,

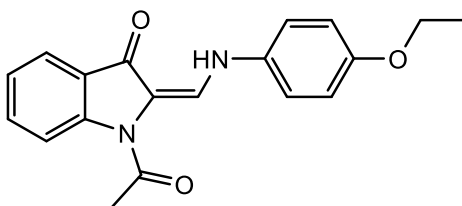
55.4, 56.4, 100.2, 107.7, 112.8, 116.3, 116.8, 122.3, 123.3, 124.8, 129.5, 133.3, 134.2, 142.3, 143.2, 154.0, 168.3, 180.0.

1-Ацетил-2-(((3,4,5-триметоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.24



Белое твердое вещество, выход 73%. Температура плавления 219-220 °С (метанол:ДМФА). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{21}N_2O_5]^+$ m/z 369.1445, найдено m/z 369.1444 ($\Delta = -0.3$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 3.66 (3H, с, CH_3O), 3.84 (6H, с, $2CH_3O$), 6.58 (2H, с, 2',6'- CH_{ar}), 7.29 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.52-7.82 (2H, м, $2CH_{ar}$), 7.92 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.89 (1H, уш.с, CH), 11,54 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.3, 55.9, 59.9, 95.9, 116.1, 122.0, 123.2, 124.7, 130.0, 133.0, 134.5, 135.6, 136.2, 143.0, 153.6, 168.1, 179.6.

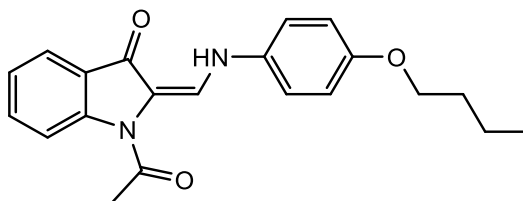
1-Ацетил-2-(((4-этоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.25



Белое твердое вещество, выход 75%. Температура плавления 156-157 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{19}N_2O_3]^+$ m/z 323.1390, найдено m/z 323.1403 ($\Delta = 4.0$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.33 (3H, т, $J = 6.9$ Гц, CH_3O), 2.69 (3H, с, CH_3CO), 4.01 (2H, к, CH_3CH_2), 6.96 (2H, д, $J = 8.7$ Гц, 3',5'- CH_{ar}), 7.29 (3H, м, $3CH_{ar}$), 7.49-7.85 (2H, м, $2CH_{ar}$), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.95 (1H, уш.с, CH), 11.91

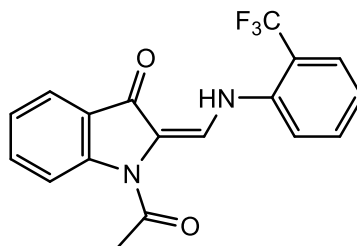
(1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 14.7, 26.9, 63.3, 115.6, 115.9, 116.5, 118.0, 122.3, 123.5, 125.1, 132.9, 133.1, 137.0, 142.7, 155.4, 168.5, 179.3.

1-Ацетил-2-(((4-бутоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.26



Белое твердое вещество, выход 74%. Температура плавления 136-137 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3]^+$ m/z 351.1703, найдено m/z 351.1704 ($\Delta = 0.2$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 0.94 (3H, т, $J = 7.3$ Гц, CH_3), 1.44 (2H, сек, 2H, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 1.69 (2H, кв, $J = 6.6$ Гц, CH_2), 2.67 (3H, с, CH_3CO), 3.95 (2H, т, $J = 6.3$ Гц, CH_2O), 6.95 (2H, д, $J = 8.6$ Гц, 2CH_{ar}), 7.26 (3H, м, 3CH_{ar}), 7.51-7.83 (2H, м, 2CH_{ar}), 7.91 (1H, д, $J = 8.4$ Гц, 7-CH_{ar}), 8.92 (1H, уш.с, CH), 11.90 (1H, с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.6, 18.7, 26.7, 30.8, 67.7, 115.8, 116.0, 116.4, 118.0, 122.3, 123.4, 125.2, 133.1, 137.0, 142.8, 155.7, 168.4, 179.3.

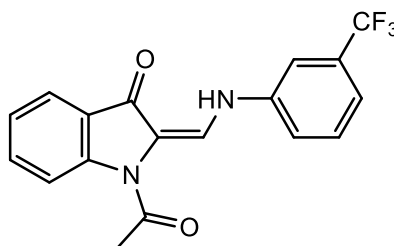
1-Ацетил-2-(((2-(трифторметил)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.27



Белое твердое вещество, выход 43%. Температура плавления 209-210 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2]^+$ m/z 347.1002, найдено m/z 347.1009 ($\Delta = 1.9$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.71 (3H, с, CH_3CO), 7.16-7.50 (2H, м, 2CH_{ar}), 7.59-7.89 (5H, м, 5CH_{ar}), 7.98 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7-CH_{ar}), 9.03 (1H, д, $J = 11.2$ Гц, CH), 12.24 (1H, д, $J =$

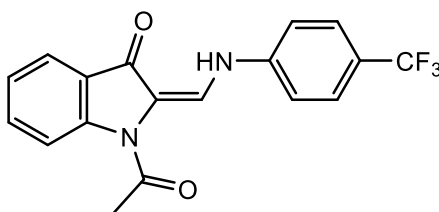
11.3 Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.5, 116.3, 116.8, 117.8, 121.3, 122.6, 123.2, 123.5, 124.2, 126.5, 126.6, 126.7, 134.0, 134.1, 134.7, 137.8, 143.8, 168.3, 181.3.

1-Ацетил-2-(((3-(трифторметил)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.28

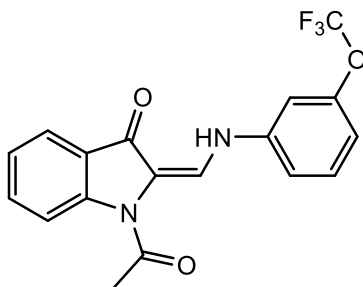


Белое твердое вещество, выход 52%. Температура плавления 156-157 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2]^+$ m/z 347.1002, найдено m/z 347.1005 ($\Delta = 1.0$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.69 (3H, с, CH_3CO), 7.07-7.51 (2H, м, 2CH_{ar}), 7.52-7.86 (5H, м, 5CH_{ar}), 7.95 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.97 (1H, уш.с, CH), 11.75 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.7, 113.0, 113.1, 116.6, 117.0, 119.6, 119.7, 120.1, 122.6, 123.6, 124.6, 130.8, 133.9, 134.9, 140.7, 143.7, 168.6, 180.8.

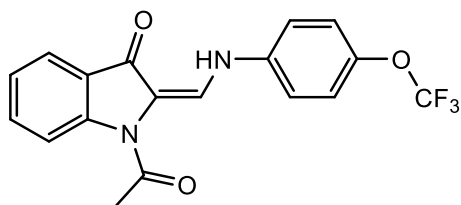
1-Ацетил-2-(((4-(трифторметил)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.29



Белое твердое вещество, выход 40%. Температура плавления 195-197 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычислено для $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2]^+$ m/z 347.1002, найдено m/z 347.1005 ($\Delta = 0.8$ м.д.). ^1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 7.14-8.06 (8H, м, 8CH_{ar}), 8.96 (1H, д, $J = 11.2$ Гц, CH), 11.73 (1H, д, $J = 11.6$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.6, 116.1, 116.3, 117.2, 122.5, 123.5, 124.4, 126.7, 133.9, 134.0, 143.0, 143.6, 168.4, 180.9.

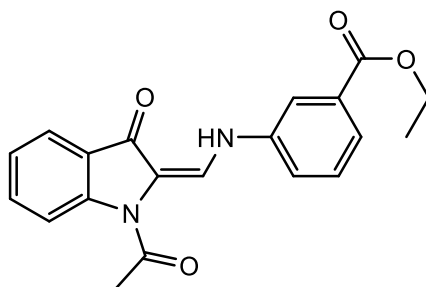
1-Ацетил-2-(((3-(трифторметокси)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.30

Белое твердое вещество, выход 47%. Температура плавления 119-120 °С (гексан:изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{14}F_3N_2O_3]^+$ m/z 363.0951, найдено m/z 363.0948 ($\Delta = -0.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.68 (3H, с, CH_3CO), 7.04 (1H, д, $J = 8.2$ Гц, 4'- CH_{ar}), 7.30 (3H, м, 3 CH_{ar}), 7.50 (1H, т, $J = 8.1$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.58-7.84 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.91 (1H, д, $J = 6.2$ Гц, CH), 11.67 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.8, 109.2, 115.2, 116.6, 117.0, 122.6, 123.6, 124.6, 131.4, 133.9, 134.9, 141.7, 143.7, 149.4, 168.6, 180.8.

1-Ацетил-2-(((4-(трифторметокси)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.31

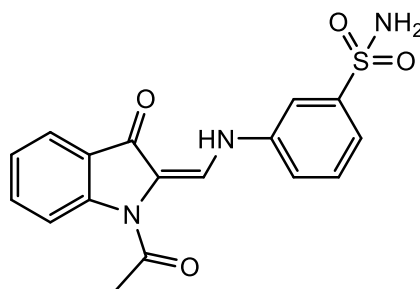
Белое твердое вещество, выход 55%. Температура плавления 179-181 °С (этилацетат). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{14}F_3N_2O_3]^+$ m/z 363.0951, найдено m/z 363.0955 ($\Delta = 1.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.69 (3H, с, CH_3CO), 7.13-7.57 (5H, м, 5 CH_{ar}), 7.57-7.86 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.93 (1H, уш.с, CH), 11.77 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.4, 116.3, 116.7, 117.4, 117.7, 122.1, 122.3, 122.6, 123.3, 124.6, 133.5, 135.4, 138.9, 143.4, 143.9, 168.3, 180.4.

Этиловый эфир 3-(((1-Ацетил-3-оксоиндолин-2-илиден)метил)амино)бензойной кислоты **5.32**

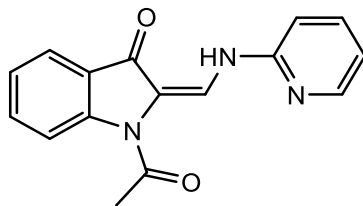


Белое твердое вещество, выход 63%. Температура плавления 159-160 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{19}N_2O_4]^+$ m/z 351.1340, найдено m/z 351.1342 ($\Delta = 0.6$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.36 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 2.69 (3H, с, CH_3CO), 4.35 (2H, к, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 7.30 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.42-7.83 (6H, м, 6 CH_{ar}), 7.90 (1H, д, $J = 8.4$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.99 (1H, с, CH), 11.78 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 26.3, 60.6, 116.2, 116.7, 120.1, 120.5, 122.3, 123.3, 123.7, 124.5, 129.9, 131.3, 133.4, 135.0, 140.0, 143.3, 164.9, 168.2, 180.4.

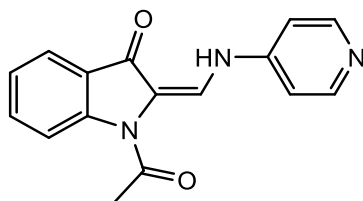
3-(((1-Ацетил-3-оксоиндолин-2-илиден)метил)амино)бензенсульфонамид **5.33**



Белое твердое вещество, выход 48%. Температура плавления 214-215 °С (ацетонитрил:ДМФА). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{17}H_{16}N_3O_4S]^+$ m/z 358.0856, найдено m/z 358.0854 ($\Delta = -0.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.70 (3H, с, CH_3CO), 7.16-8.08 (8H, м, 8 CH_{ar}), 9.05 (1H, уш.с, CH), 11.84 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.9, 112.9, 116.6, 117.1, 119.8, 120.3, 122.7, 123.7, 124.6, 126.0, 130.6, 134.0, 135.1, 140.3, 143.5, 145.7, 168.7, 180.8.

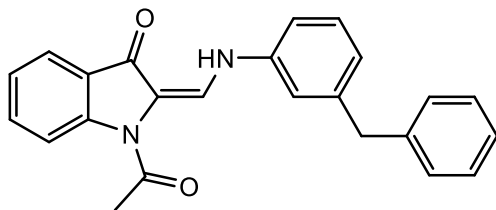
1-Ацетил-2-((пиридин-2-иламино)метилен)индолин-3-он 5.34

Белое твердое вещество, выход 73%. Температура плавления 162-164 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{14}N_3O_2]^+$ m/z 280.1081, найдено m/z 280.1076 ($\Delta = -1.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 6.90-7.49 (3H, м, $3CH_{ar}$), 7.51-8.07 (4H, м, $4CH_{ar}$), 8.35 (1H, т, $J = 5.9$ Гц, 7- CH_{ar}), 9.47 (1H, д, $J = 11.4$ Гц, CH), 11.76 (1H, д, $J = 11.5$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.9, 111.9, 116.5, 117.4, 118.8, 122.7, 123.5, 124.5, 132.9, 134.0, 138.8, 143.8, 148.3, 151.1, 168.4, 181.3.

1-Ацетил-2-((пиридин-4-иламино)метилен)индолин-3-он 5.35

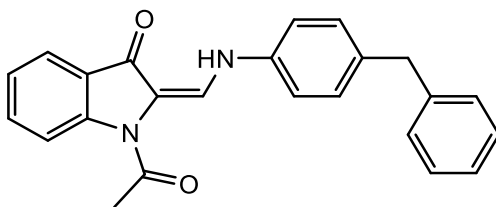
Белое твердое вещество, выход 30%. Температура плавления 267-268 °С (разлож.) (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{14}N_3O_2]^+$ m/z 280.1081, найдено m/z 280.1084 ($\Delta = 1.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.69 (3H, с, CH_3CO), 7.30 (3H, м, $3CH_{ar}$), 7.59-7.86 (2H, м, $2CH_{ar}$), 7.95 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, CH_{ar}), 8.44 (2H, д, $J = 6.0$ Гц, $2CH_{ar}$), 8.95 (1H, д, $J = 11.6$ Гц, CH), 12.0 (1H, д, $J = 12.0$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.3, 110.4, 116.4, 117.7, 122.5, 123.5, 124.1, 132.7, 134.2, 144.2, 14.2, 150.5, 168.4, 181.6.

1-Ацетил-2-(((3-бензилфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.36



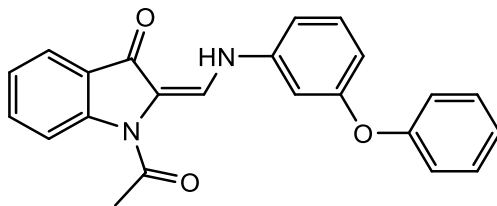
Белое твердое вещество, выход 68%. Температура плавления 154-155 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{24}H_{21}N_2O_2]^+$ m/z 369.1598, найдено m/z 369.1604 ($\Delta = 1.5$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.68 (3H, с, CH_3CO), 3.96 (2H, с, CH_2), 6.97 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, CH_{ar}), 7.04-7.49 (9H, м, $9CH_{ar}$), 7.65 (1H, т, $J = 7.4$ Гц, $5-CH_{ar}$), 7.77 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, $4-CH_{ar}$), 7.92 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, $7-CH_{ar}$), 8.99 (1H, уш.с, CH), 11.81 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.8, 40.9, 113.9, 116.4, 116.5, 116.7, 122.4, 123.5, 124.3, 124.8, 126.0, 128.4, 128.7, 129.9, 133.5, 135.9, 139.7, 140.8, 143.1, 143.2, 168.5, 180.0.

1-Ацетил-2-(((4-бензилфенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.37



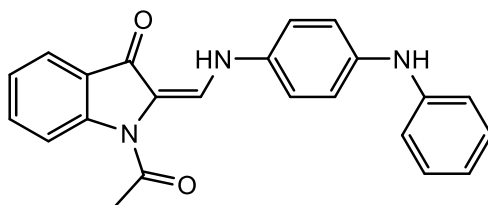
Белое твердое вещество, выход 57%. Температура плавления 143-145 °С (этилацетат). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{24}H_{21}N_2O_2]^+$ m/z 369.1598, найдено m/z 369.1609 ($\Delta = 2.9$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 3.91 (2H, с, CH_2), 7.03-7.46 (10H, м, $10CH_{ar}$), 7.49-7.84 (2H, м, $2CH_{ar}$), 7.92 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, $7-CH_{ar}$), 8.99 (1H, д, $J = 9.6$ Гц, CH), 11.85 (1H, д, $J = 11.9$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.8, 40.3, 116.2, 116.5, 22.4, 123.5, 124.9, 125.9, 128.4, 128.6, 130.0, 133.4, 136.2, 137.0, 137.7, 141.2, 143.0, 168.5, 179.8.

1-Ацетил-2-(((3-феноксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.38



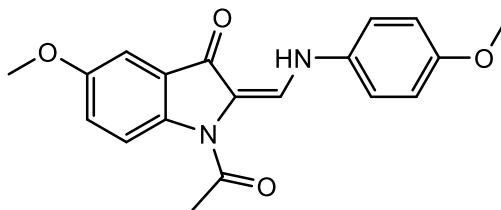
Белое твердое вещество, выход 68%. Температура плавления 149-150 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{23}H_{19}N_2O_3]^+$ m/z 371.1390, найдено m/z 371.1390 ($\Delta = 0.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д: 2.66 (3H, с, CH_3CO), 6.85-7.20 (5H, м, 5 CH_{ar}), 7.20-7.43 (5H, м, 5 CH_{ar}), 7.62 (1H, т, $J = 7.7$ Гц, 5- CH_{ar}), 7.73 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, 4- CH_{ar}), 7.87 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.94 (1H, уш.с, CH), 11.86 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 26.9, 116.3, 116.5, 118.1, 120.3, 122.4, 12.2, 123.5, 124.9, 130.0, 133.4, 135.6, 136.4, 143.0, 152.7, 157.1, 168.5, 179.8.

1-Ацетил-2-(((4-(фениламино)фенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.39



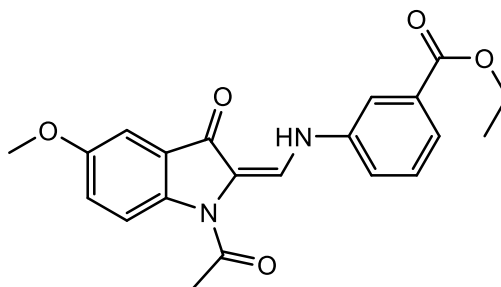
Белое твердое вещество, выход 73%. Температура плавления 184-185 °С (изопропанол:ДМФА). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{23}H_{20}N_3O_2]^+$ m/z 370.1550, найдено m/z 370.1547 ($\Delta = -0.7$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д: 2.70 (3H, с, CH_3CO), 6.81 (1H, т, $J = 7.2$ Гц, 5- CH_{ar}), 6.96-7.41 (9H, м, 9 CH_{ar}), 7.65 (1H, т, $J = 8.5$ Гц, 6- CH_{ar}), 7.78 (1H, д, $J = 7.7$ Гц, 4- CH_{ar}), 7.94 (1H, д, $J = 8.5$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.21 (1H, уш.с, NH), 8.99 (1H, с, CH), 12.02 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, $DMCO-d_6$) δ м.д.: 26.9, 115.8, 116.4, 117.9, 118.2, 119.6, 122.2, 123.5, 125.1, 129.2, 132.2, 133.1, 136.8, 140.1, 142.6, 143.4, 168.6, 179.0.

1-Ацетил-5-метокси-2-(((4-метоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.40



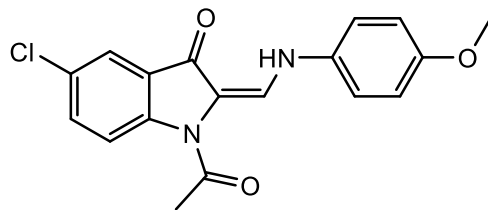
Белое твердое вещество, выход 48%. Температура плавления 161-162 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{19}N_2O_4]^+$ m/z 339.1339, найдено m/z 339.1343 ($\Delta = 1.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.62 (3H, с, CH_3CO), 3.76 (3H, с, CH_3O), 3.82 (3H, с, CH_3O), 6.96 (2H, д, $J = 8.8$ Гц, 2',6'- CH_{ar}), 7.20 (4H, м, 4 CH_{ar}), 7.79 (д, $J = 9.4$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.89 (1H, уш.с, CH), 11.55 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.6, 55.3, 55.6, 103.9, 115.1, 116.4, 117.7, 118.1, 121.4, 126.0, 133.0, 137.2, 155.7, 156.1, 168.0, 179.0.

Этиловый эфир 3-(((1-Ацетил-5-метокси-3-оксоиндолин-2-илиден)метил)амино)бензойной кислоты 5.41



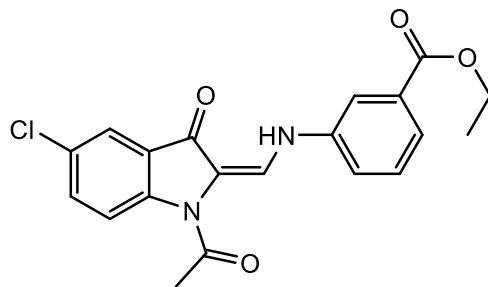
Белое твердое вещество, выход 32%. Температура плавления 169-170 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{21}H_{21}N_2O_5]^+$ m/z 381.1445, найдено m/z 381.1453 ($\Delta = 2.1$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.35 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, $\underline{CH_3}CH_2$), 2.62 (3H, с, CH_3CO), 3.80 (3H, с, CH_3O), 4.33 (2H, к, $J = 7.1$ Гц, $CH_3\underline{CH_2}$), 7.17 (2H, дд, $J = 12.9, 3.9$ Гц, 2 CH_{ar}), 7.33-7.95 (5H, м, 5 CH_{ar}), 8.94 (1H, д, $J = 10.8$ Гц, CH), 11.72 (1H, д, $J = 11.8$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 14.0, 26.4, 55.7, 60.9, 104.5, 116.5, 117.4, 120.8, 121.9, 123.9, 125.8, 130.1, 131.6, 135.3, 138.1, 140.2, 155.9, 165.2, 167.9, 180.4.

1-Ацетил-5-хлор-2-(((4-метоксифенил)амино)метилен)индолин-3-он 5.42



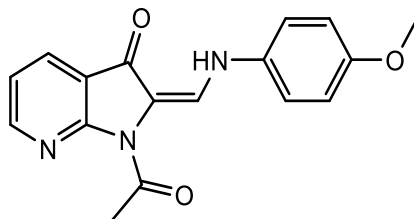
Белое твердое вещество, выход 45%. Температура плавления 167-168 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{18}H_{16}ClN_2O_3]^+$ m/z 343.0844, найдено m/z 343.0852 ($\Delta = 2.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.67 (3H, с, CH_3CO), 3.77 (3H, с, CH_3O), 6.98 (2H, д, $J = 8.9$ Гц, 3',5'- CH_{ar}), 7.26 (2H, д, $J = 8.7$ Гц, 2',6'- CH_{ar}), 7.49-7.82 (2H, м, 4,5- CH_{ar}), 7.96 (1H, д, $J = 8.9$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.89 (1H, уш.с, CH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 26.5, 55.5, 115.7, 116.3, 118.4, 121.3, 126.6, 128.1, 132.4, 132.9, 137.9, 141.2, 156.6, 168.1, 171.5.

Этиловый эфир 3-(((1-Ацетил-5-хлор-3-оксоиндолин-2-илиден)метил)амино)бензойной кислоты 5.43



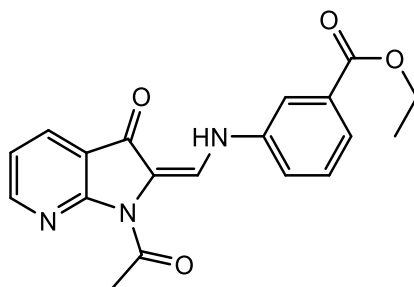
Белое твердое вещество, выход 50%. Температура плавления 175-176 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{20}H_{18}ClN_2O_4]^+$ m/z 385.0950, найдено m/z 385.0944 ($\Delta = -1.6$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.37 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 2.68 (3H, с, CH_3CO), 4.37 (2H, к, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 7.38-7.83 (6H, м, 6 CH_{ar}), 7.96 (1H, д, $J = 8.9$ Гц, 7- CH_{ar}), 8.97 (1H, уш.с, CH), 11.80 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.9, 26.3, 60.7, 116.7, 117.1, 118.2, 120.9, 121.5, 124.2, 126.1, 128.1, 129.9, 131.5, 132.9, 136.0, 139.9, 141.8, 165.0, 168.3, 178.7.

1-Ацетил-2-(((2-метоксифенил)амино)метилен)-1,2-дигидро-3H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-он 5.44



Белое твердое вещество, выход 44%. Температура плавления 171-172 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{16}N_3O_2]^+$ m/z 282.1237, найдено m/z 282.1245 ($\Delta = 3.0$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 2.88 (3H, с, CH_3CO), 3.77 (3H, с, CH_3O), 7.00 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, 3',5'- CH_{ar}), 7.34 (3H, м, 3 CH_{ar}), 8.21 (1H, д, $J = 7.5$ Гц, 4- CH_{ar}), 8.66 (1H, с, 6- CH_{ar}), 9.18 (1H, уш.с, CH), 11.89 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 27.0, 55.2, 115.0, 115.5, 116.6, 117.9, 119.2, 131.2, 131.3, 132.1, 137.6, 151.5, 154.1, 156.2, 168.4, 176.4.

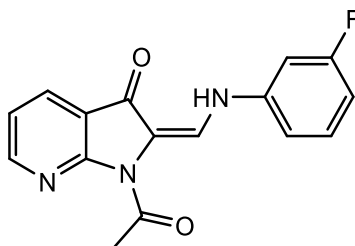
Этиловый эфир 3-(((1-ацетил-3-оксо-1,3-дигидро-2H-пирроло[2,3-b]пиридин-2-илиден)метил)амино)бензойной кислоты 5.45



Белое твердое вещество, выход 33%. Температура плавления 152-153 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{19}H_{18}N_3O_4]^+$ m/z 352.1292, найдено m/z 352.1288 ($\Delta = -1.2$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 1.35 (3H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 2.83 (3H, с, CH_3CO), 4.33 (2H, к, $J = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 7.16-7.87 (5H, м, 5 CH_{ar}), 8.10 (1H, д, $J = 7.6$ Гц, 4- CH_{ar}), 8.57 (1H, д, $J = 4.7$ Гц, 6- CH_{ar}), 9.11 (1H, уш.с, CH), 11.92 (1H, уш.с, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д.: 13.8, 27.0, 60.6, 116.1, 116.3, 116.7,

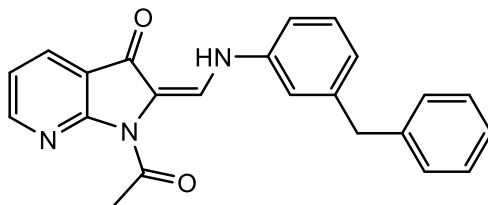
119.3, 120.6, 123.9, 129.9, 131.3, 131.6, 135.6, 139.7, 152.1, 154.7, 164.8, 168.5, 177.8.

1-Ацетил-2-(((3-фторфенил)амино)метилен)-1,2-дигидро-3H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-он 5.46



Белое твердое вещество, выход 18%. Температура плавления 154-155 °С (изопропанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{16}H_{13}FN_3O_2]^+$ m/z 298.0986, найдено m/z 298.0982 ($\Delta = -1.4$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.81 (3H, с, CH_3CO), 6.88 (1H, тд, $J = 8.6, 2.2$ Гц, 5'- CH_{ar}), 6.07-7.21 (2H, м, 2 CH_{ar}), 7.21-7.57 (2H, м, 2 CH_{ar}), 8.10 (1H, дд, $J = 7.7, 1.7$ Гц, 4- CH_{ar}), 8.58 (1H, дд, $J = 4.8, 1.7$ Гц, 6- CH_{ar}), 9.06 (1H, д, $J = 10.3$ Гц, CH), 11.58 (1H, д, $J = 11.0$ Гц, NH). ^{13}C -ЯМР (50 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 27.5, 103.4, 103.9, 110.1, 110.5, 112.4, 116.4, 116.9, 119.6, 131.4, 131.6, 131.9, 135.9, 141.3, 141.6, 152.4, 154.9, 160.5, 165.4, 168.7, 178.0.

1-Ацетил-2-(((3-бензилфенил)амино)метилен)-1,2-дигидро-3H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-он 5.47



Белое твердое вещество, выход 38%. Температура плавления 128-130 °С (метанол). (+)ИЭР-МС (TOF): $[M+H]^+$ вычислено для $[C_{23}H_{20}N_3O_2]^+$ m/z 370.1550, найдено m/z 370.1560 ($\Delta = 2.8$ м.д.). 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д: 2.83 (3H, с, CH_3CO), 3.95 (2H, с, CH_2), 7.82-7.48 (10H, м, 10 CH_{ar}), 8.12 (1H,

дд, $J = 7.6, 1.7$ Гц, 4-CH_{ar}), 8.57 (1H, дд, $J = 4.8, 1.7$ Гц, 6-CH_{ar}), 9.14 (1H, д, $J = 11.9$ Гц, CH), 11.73 (1H, д, $J = 12.0$ Гц, NH). ¹³C-ЯМР (50 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 27.5, 40.9, 113.9, 116.0, 116.8, 117.1, 119.5, 124.6, 126.1, 128.4, 128.7, 129.9, 131.8, 136.6, 139.5, 140.8, 143.2, 152.1, 154.5, 168.7, 177.4.

3.4.3 Клеточные и вирусные культуры

Клетки MDCK, вирусы гриппа A/Puerto Rico/8/34 (Институт вирусологии, Марбургский университет) и A/Jena/8178/09 выращивали аналогично п. 3.3.4. Вирус гриппа A/California/04/09, адаптированный под мышей, был предоставлен НИИ Гриппа им. А. А. Смородинцева РАН.

3.4.4 Скрининг противовирусной активности

Анализ, основанный на хемолюминесцентном методе, проводили с использованием набора NA-Star (Applied Biosystems). К 25 мкл раствора исследуемого соединения (10 последовательных полулогарифмических разбавлений) в буфере (26 mM 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, 4 mM хлорида кальция, pH 6.0) добавляли 25 мкл раствора вируса (сигнал/шум 40/1), инкубировали 20 мин при 37 °C, добавляли 5 мкл пятисоткратно разбавленного субстрата NA-Star, инкубировали 30 мин при к. т., добавляли 55 мкл ускоряющего субстрата NA-Star и определяли хемилюминесценцию с использованием микропланшетного ридера FLUOstar Omega (BMG Labtech). Каждый эксперимент проводился в 3 независимых повторениях.

3.4.5 Цитотоксичность

Анализ проводили с использованием набора CellTiter96 AQueous One Solution (Promega) по протоколу производителя. Клетки MDCK высевали в 96-луночные планшеты (104 клетки на лунку) и инкубировали 24 ч при 37 °C в 5 % CO₂, добавляли 100 мкл раствора исследуемого соединения в культуральной среде (последовательные полуторократные разведения, диапазон концентраций от 400 до 10 мкг/мл), инкубировали 48 ч при 37 °C в 5 % CO₂, среду удаляли, добавляли 100 мкл культуральной среды и 20 мкл

реактива CellTiter96 AQueous One, инкубировали 30 мин при 37 °C в 5 % CO₂ и измеряли оптическую плотность при 490 нм с использованием микропланшетного ридера Benchmark Plus (Bio-Rad). Каждый эксперимент проводился в 3 независимых повторениях.

3.4.6 Ингибирование вирусной нейраминидазы по гемагглютинации

Оценку влияния исследуемых соединений на активность нейраминидазы выполняли методом, основанным на обусловленной вирусом гемагглютинации аналогично п. 3.3.7 на вирусе A/Puerto Rico/8/34.

3.4.7 Оценка эффективности *in vivo*

Все работы с животными и клеточными культурами проводились в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике НИИ Вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАН. Исследования проводились на самках специфических безпатогенных мышей BALB/c (Стезар) возрастом от 5 до 6 недель. До начала эксперимента животные содержались на стандартном виварийном сухом гранулированном корме.

Для исследования были отобраны 52 особи (4 группы по 13) с массой тела 19 – 21 г. Животных слегка анестезировали и прививали интраназально 30 мкл раствора 10⁴ TCID₅₀/мл адаптированного к мышам A/California/04/09 в натрий-фосфатном буфере. Препараты вводили в течение 5 дней дважды в день перорально, начиная за 4 ч до и через 4 ч после инокуляции, в дозировке 50 мг/кг для исследуемых соединений (раствор в 10% полисорбата 80 в воде для инъекций) и 20 мг/кг для положительного контроля (озельтамивир, раствор в воде для инъекций). Животные находились под наблюдением на предмет заболеваемости и смертности в течение 16 дней, массу тела измеряли ежедневно в течение 5 дней после заражения и каждые два дня в течение оставшегося периода наблюдений. Животных, потерявших 30 % массы тела или более эвтаназировали.

На 4 день после инокуляции у 3 особей из каждой группы собирали в стерильных условиях целые легкие, тщательно промывали стерильным

натрий-фосфатным буфером, гомогенизировали и суспендировали в 1 мл холодного стерильного натрий-фосфатного буфера, центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g, супернатанты серийно разводили и инокулировали в 96-луночные планшеты с монослоями клеток MDCK и определяли титр вируса.

3.3.8 Докинг

В качестве источника координат атомов нейраминидазы вируса гриппа А использовали кристаллографические данные PDB 3B7E [324] с добавлением атомов водорода в допущении нейтрального pH для ионизируемых групп. Молекулярно-динамическое моделирование проводили на отрезке 300 – 400 нс для каждой модели с шагом интегрирования 1 фс с использованием программного пакета NAMD 3.0 Alpha MD [361], отслеживание взаимодействий между ферментом и ингибитором и отнесение взаимодействия к стабильному осуществлялось для лигандов, связанных более 50 нс. Макромолекулы описывали параметрами силовых поля CHARMM36 [362,363] для белков, CGenFF [364] для исследуемых соединений и TIP3P [365] для растворителя (вода).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружены и всесторонне изучены три новых потенциальных класса противовирусных препаратов: N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амины (активность против ВИЧ), пирроло[2,3-е]индазолы и 3-индолинолы (активность против вируса гриппа).

Основные выводы по работе:

- 1) Обнаружен и описан новый класс эффективных ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ на основе N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминового ядра. Предложено три альтернативных масштабируемых пути синтеза в зависимости от природы заместителя в анилиновом фрагменте.
- 2) Показано, что N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-амины обладают высокой активностью в отношении ВИЧ, в том числе резистентных штаммов. Их низкая нейротоксичность и способность проникать через гематоэнцефалический барьер при высокой противовирусной активности говорит о потенциально возможном элиминировании вируса из нейронов при низком риске возникновения неврологических осложнений.
- 3) Впервые синтезирован и изучен новый класс полизамещенных производных пирроло[2,3-е]индазолов, обладающих высокой ингибирующей активностью в отношении нейраминидазы вируса гриппа и нейраминидазы пневмококка, что делает их перспективными в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения бактериально осложненных вирусных инфекций.
- 4) Разработан метод синтеза оригинальных производных 3-индолинонов и показана их ингибирующая активность в отношении вируса гриппа. Установлено, что их мишенью является ранее не используемая в качестве мишени полость-430 нейраминидазы вируса, и их существенная эффективность и потенциал для дальнейшей разработки продемонстрированы *in vivo* на модели вирусной пневмонии на мышах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, д.фарм.н., к.х.н. В. А. Макарову за неоценимую помощь и поддержку в ходе выполнения диссертационного исследования. Автор выражает благодарность своим коллегам: Ш. Экинсу, Т. Лейну, Ф. Урбине, Т. Джонсу (Collaborations Pharmaceuticals Inc.); Дж. Нельсон, Р. Микеру, Э. Сачи (Университет Северной Каролины в Чапел-Хилле); Ж. Санне (Университет Калгари); М. Шмидтке, М. Рихтер, Б. Йан, Э. Дитрих (Университетская клиника Йены); М. Хреновой (ФИЦ Биотехнологии РАН); В. Чернышеву (Московский Государственный Университет им. Ломоносова); И. Леновой, И. Фалынсковой (НИИ Вакцин и сывороток им. Мечникова). Автор выражает особую благодарность коллективу Лаборатории биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН: О. Рябовой, Н. Монаховой, Е. Казаковой, А. Лепешкину, Л. Борец и А. Егоровой.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ac – ацетильная группа

ADME-Tox – абсорбция, распределение, метаболизм, выведение и токсичность

Alloc – N-аллилоксикарбонильная группа

Bn – бензильная группа

Boc – трет-бутилоксикарбоксил

Bz – бензоильная группа

Cbz – карбоксибензильная группа

CYP – цитохром P450

dba – дибензилиденацетон

DIBAL – диизобутилаллюминий гидрид

dppp – 1,3-бис(дифенилфосфино)пропан

Fmoc – флуоренилметоксикарбонильная группа

Fmoc – флуоренметоксикарбонильная группа

HA – гемагглютинин

HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

hERG – (ген, кодирующий) специфические калиевые каналы сердца человека

MDCK – клеточная линия почек собаки Мадина-Дарби

MAP2 – белок, ассоциированный с микротрубочками, тип 2

Ms – мезильная группа

MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2*H*-тетразолий

NA – нейраминидаза

NP – нуклеокапсидный белок

Pr – *n*-пропильная группа

Res – 2-хлортритилхлоридная смола

TOF – времяпролетный анализатор масс

Trt – трифенилметильная группа

Ts – тозилъная группа

t-SNE – стохастическое вложение соседей с распределением Стъюдента

XPhos – дициклогексил[2',4',6'-трис(пропан-2-ил)[1,1'-бифенил]-2-ил]фосфин

АлАТ – аланин аминотрансфераза

АПФК – пропиѡлфосфоноый ангидрид

АРВТ – антиретровирусная терапия

АсАТ – аспартат аминотрансфераза

БСИ – *N*-Бромсукцинимид

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГБТ – 1-гидроксибензотриазол

ГБТУ – (2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-

тетраметилуронийгексафторфосфат

ДБУ – диазабициклоундецен

ДБУ – диазабициклоундецен

ДИК – диизопропилкарбодиимид

ДИЭА – диизопропилэтиламин (основание Хунига)

ДКА – дикетокислота

ДМАА – *N,N*-Диметилацетамид

ДМАП – 4-диметиламинопиридин

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – *N,N*-диметилформаид

ДМЭ – 1,2-диметоксиэтан

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТ – дикий тип

ДТТ – дитиотреитол

ДФФА – дифенилфосфорилазид

ИВИ – ингибитор вирусной интегразы

ИВП – ингибитор вирусной протеазы
ИОТ – ингибитор обратной транскриптазы
ИПС – изопропиловый спирт
ИС – ингибитор слияния
ИСМЖ – искусственная спинномозговая жидкость (137 мМ NaCl, 5.0 мМ KCl, 2.3 мМ CaCl₂, 1.3 мМ MgCl₂, 20 мМ глюкозы)
ИФА – иммуноферментный анализ
ИЭР-МС – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением
КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
к. т. – комнатная температура
кДНК – комплиментарная ДНК
кРНК – комплиментарная РНК
КСА – камфорсульфоновая кислота
ЛДА – диизопропиламид лития
мРНК – матричная РНК
МТБЭ – метил-трет-бутиловый эфир
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НММ – N-метилморфолин
НМП – N-метилпирролидон
НПКО – нижний предел количественного определения
ОТ – обратная транскриптаза
ПИК – преинтеграционный комплекс
пКДИ – полимерный карбодиимид
ППДР – площадь поверхности, доступной для растворителя
ППТС – пиридиний п-толуолсульфонат
ПТСК – п-толуолсульфоновая кислота
ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы
РНК – рибонуклеиновая кислота
РСВ – респираторно-синцитиальный вирус

СОС – стандартная ошибка среднего
СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
СФХ – сверхкритическая флюидная хроматография
СЯН – сегментоядерные нейтрофилы
ТБАФ – тетрабутиламмонийфторид
ТГФ – тетрагидрофуран
ТМДС – 1,1,3,3-тетраметилдисилоксан
ТМСОТФ – триметилсилил трифторметансульфонат
ТФУ – трифторуксусная кислота
ТХЦК - трихлоризоциануровая кислота
ФПА – фенилпропаноламин
ХДМК – гексахлордиметилкарбонат (трифосген)
ЧХУ – четыреххлористый углерод
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭДК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D. Antivirals and antiviral strategies // *Nat Rev Microbiol.* 2004. Vol. 2, № 9. P. 704–720.
2. De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs // *Nat Rev Drug Discov.* 2002. Vol. 1, № 1. P. 13–25.
3. *Здравоохранение в России. 2021: Статистический сборник.* Москва: Росстат, 2021. 171 с.
4. *Здравоохранение в России. 2023: Статистический сборник.* Москва: Росстат, 2023. 179 с.
5. Rambaut A. et al. The causes and consequences of HIV evolution // *Nat Rev Genet.* 2004. Vol. 5, № 1. P. 52–61.
6. Li G. et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective // *Retrovirology.* 2015. Vol. 12, № 1. P. 18.
7. Potter C.W. A history of influenza // *J Appl Microbiol.* 2001. Vol. 91, № 4. P. 572–579.
8. Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. A virus obtained from influenza patients // *The Lancet.* 1933. Vol. 222, № 5732. P. 66–68.
9. Zambon M.C. Epidemiology and pathogenesis of influenza // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999. Vol. 44, № suppl_2. P. 3–9.
10. Barré-Sinoussi F. et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) // *Science.* 1983. Vol. 220, № 4599. P. 868–871.
11. Maeda K. et al. Discovery and Development of Anti-HIV Therapeutic Agents: Progress Towards Improved HIV Medication // *CTMC.* 2019. Vol. 19, № 18. P. 1621–1649.
12. Gallo R.C. et al. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) // *Science.* 1983. Vol. 220, № 4599. P. 865–867.

13. Mitsuya H. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985. Vol. 82, № 20. P. 7096–7100.
14. Yarchoan R. et al. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex // The Lancet. 1986. Vol. 327, № 8481. P. 575–580.
15. Graves M.C. et al. An 11-kDa form of human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* is sufficient for enzymatic activity. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988. Vol. 85, № 8. P. 2449–2453.
16. Farmerie W.G. et al. Expression and Processing of the AIDS Virus Reverse Transcriptase in *Escherichia coli* // Science. 1987. Vol. 236, № 4799. P. 305–308.
17. Autran B. et al. Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4⁺ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease // Science. 1997. Vol. 277, № 5322. P. 112–116.
18. Komanduri K.V. et al. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4⁺ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 // Nat Med. 1998. Vol. 4, № 8. P. 953–956.
19. Lederman M.M. et al. Immunologic Responses Associated with 12 Weeks of Combination Antiretroviral Therapy Consisting of Zidovudine, Lamivudine, and Ritonavir: Results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315 // Journal of Infectious Diseases. 1998. Vol. 178, № 1. P. 70–79.
20. Bhaskaran K. et al. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population // JAMA. 2008. Vol. 300, № 1. P. 51–59.
21. Walensky R.P. et al. The Survival Benefits of AIDS Treatment in the United States // J INFECT DIS. 2006. Vol. 194, № 1. P. 11–19.

22. Gupta R. et al. Emergence of Drug Resistance in HIV Type 1–Infected Patients after Receipt of First-Line Highly Active Antiretroviral Therapy: A Systematic Review of Clinical Trials // *Clin. Infect. Dis.*. 2008. Vol. 47, № 5. P. 712–722.
23. Hazuda D.J. et al. Inhibitors of Strand Transfer That Prevent Integration and Inhibit HIV-1 Replication in Cells // *Science*. 2000. Vol. 287, № 5453. P. 646–650.
24. Min S. et al. Pharmacokinetics and Safety of S/GSK1349572, a Next-Generation HIV Integrase Inhibitor, in Healthy Volunteers // *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. Vol. 54, № 1. P. 254–258.
25. Baba M. et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96, № 10. P. 5698–5703.
26. Dorr P. et al. Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity // *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. Vol. 49, № 11. P. 4721–4732.
27. Shaik M.M. et al. Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike // *Nature*. 2019. Vol. 565, № 7739. P. 318–323.
28. Wu L. et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5 // *Nature*. 1996. Vol. 384, № 6605. P. 179–183.
29. Trkola A. et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5 // *Nature*. 1996. Vol. 384, № 6605. P. 184–187.
30. Bleul C.C. et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry // *Nature*. 1996. Vol. 382, № 6594. P. 829–833.
31. Deng H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 // *Nature*. 1996. Vol. 381, № 6584. P. 661–666.

32. Doranz B.J. et al. A Dual-Tropic Primary HIV-1 Isolate That Uses Fusin and the β -Chemokine Receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as Fusion Cofactors // Cell. 1996. Vol. 85, № 7. P. 1149–1158.
33. Choe H. et al. The β -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates // Cell. 1996. Vol. 85, № 7. P. 1135–1148.
34. Dragic T. et al. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 // Nature. 1996. Vol. 381, № 6584. P. 667–673.
35. Alkhatib G. et al. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1 // Science. 1996. Vol. 272, № 5270. P. 1955–1958.
36. Feng Y. et al. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor // Science. 1996. Vol. 272, № 5263. P. 872–877.
37. Kilby J.M., Eron J.J. Novel Therapies Based on Mechanisms of HIV-1 Cell Entry // N Engl J Med. 2003. Vol. 348, № 22. P. 2228–2238.
38. Jahn R., Lang T., Südhof T.C. Membrane Fusion // Cell. 2003. Vol. 112, № 4. P. 519–533.
39. Chan D.C. et al. Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein // Cell. 1997. Vol. 89, № 2. P. 263–273.
40. Chan D.C., Kim P.S. HIV Entry and Its Inhibition // Cell. 1998. Vol. 93, № 5. P. 681–684.
41. Hallenberger S. et al. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160 // Nature. 1992. Vol. 360, № 6402. P. 358–361.
42. Mitsuya H., Broder S. Strategies for antiviral therapy in AIDS // Nature. 1987. Vol. 325, № 6107. P. 773–778.
43. Mehellou Y., De Clercq E. Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go? // J. Med. Chem. 2010. Vol. 53, № 2. P. 521–538.

44. Brik A., Wong C.-H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery // *Org. Biomol. Chem.* 2003. Vol. 1, № 1. P. 5–14.
45. Wlodawer A. et al. Conserved Folding in Retroviral Proteases: Crystal Structure of Synthetic HIV-1 Protease // *Science*. 1989. Vol. 245, № 4918. P. 616–621.
46. Nijhuis M., Deeks S., Boucher C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness: // *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2001. Vol. 14, № 1. P. 23–28.
47. Quiñones-Mateu M.E. et al. Viral Drug Resistance and Fitness // *Advances in Pharmacology*. Elsevier, 2008. Vol. 56. P. 257–296.
48. Shafer R.W. et al. A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies // *HIV Seq Compend*. 2001. Vol. 2001. P. 1–51.
49. Doyon L. et al. Novel Gag-Pol frameshift site in human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors // *J Virol*. 1998. Vol. 72, № 7. P. 6146–6150.
50. Gatanaga H. et al. Amino Acid Substitutions in Gag Protein at Non-cleavage Sites Are Indispensable for the Development of a High Multitude of HIV-1 Resistance against Protease Inhibitors // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, № 8. P. 5952–5961.
51. Zhang Y.M. et al. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites // *J Virol*. 1997. Vol. 71, № 9. P. 6662–6670.
52. Tamiya S. et al. Amino Acid Insertions near Gag Cleavage Sites Restore the Otherwise Compromised Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Resistant to Protease Inhibitors // *J Virol*. 2004. Vol. 78, № 21. P. 12030–12040.
53. Clavel F., Race E., Mammano F. HIV drug resistance and viral fitness // *Advances in Pharmacology*. Elsevier, 2000. Vol. 49. P. 41–66.

54. Fan X., Song Y.-L., Long Y.-Q. An Efficient and Practical Synthesis of the HIV Protease Inhibitor Atazanavir via a Highly Diastereoselective Reduction Approach // *Org. Process Res. Dev.* 2008. Vol. 12, № 1. P. 69–75.
55. Koh Y. et al. Novel *bis* -Tetrahydrofuranylurethane-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with Potent Activity against Multi-PI-Resistant Human Immunodeficiency Virus In Vitro // *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 10. P. 3123–3129.
56. Ghosh A.K., Osswald H.L., Prato G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 11. P. 5172–5208.
57. De Meyer S. et al. TMC114, a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor Active against Protease Inhibitor-Resistant Viruses, Including a Broad Range of Clinical Isolates // *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 6. P. 2314–2321.
58. Ghosh A.K. et al. Enhancing Protein Backbone Binding—A Fruitful Concept for Combating Drug-Resistant HIV // *Angew Chem Int Ed.* 2012. Vol. 51, № 8. P. 1778–1802.
59. Deeks E.D. Darunavir: A Review of Its Use in the Management of HIV-1 Infection // *Drugs.* 2014. Vol. 74, № 1. P. 99–125.
60. Koh Y. et al. *In Vitro* Selection of Highly Darunavir-Resistant and Replication-Competent HIV-1 Variants by Using a Mixture of Clinical HIV-1 Isolates Resistant to Multiple Conventional Protease Inhibitors // *J Virol.* 2010. Vol. 84, № 22. P. 11961–11969.
61. De Meyer S. et al. Resistance Profile of Darunavir: Combined 24-Week Results from the POWER Trials // *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2008. Vol. 24, № 3. P. 379–388.
62. Mitsuya Y. et al. Prevalence of Darunavir Resistance—Associated Mutations: Patterns of Occurrence and Association with Past Treatment // *J INFECT DIS.* 2007. Vol. 196, № 8. P. 1177–1179.

63. Tie Y. et al. High Resolution Crystal Structures of HIV-1 Protease with a Potent Non-peptide Inhibitor (UIC-94017) Active Against Multi-drug-resistant Clinical Strains // *Journal of Molecular Biology*. 2004. Vol. 338, № 2. P. 341–352.
64. Koh Y. et al. Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 39. P. 28709–28720.
65. Ghosh A.K., Leshchenko S., Noetzel M. Stereoselective Photochemical 1,3-Dioxolane Addition to 5- Alkoxyethyl-2(5 *H*)-furanone: Synthesis of Bis-tetrahydrofuranyl Ligand for HIV Protease Inhibitor UIC-94017 (TMC-114) // *J. Org. Chem*. 2004. Vol. 69, № 23. P. 7822–7829.
66. Ghosh A.K. et al. Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P2-ligands and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998. Vol. 8, № 6. P. 687–690.
67. Espeseth A.S. et al. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. Vol. 97, № 21. P. 11244–11249.
68. Hazuda D.J. et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101, № 31. P. 11233–11238.
69. McColl D.J., Chen X. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: Bringing IN a new era of antiretroviral therapy // *Antiviral Research*. 2010. Vol. 85, № 1. P. 101–118.
70. Pommier Y., Johnson A.A., Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/Aids // *Nat Rev Drug Discov*. 2005. Vol. 4, № 3. P. 236–248.
71. Chiu T., Davies D. Structure and Function of HIV-1 Integrase // *CTMC*. 2004. Vol. 4, № 9. P. 965–977.

72. Engelman A., Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights // *Nat Rev Microbiol.* 2012. Vol. 10, № 4. P. 279–290.
73. Grobler J.A. et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. Vol. 99, № 10. P. 6661–6666.
74. Hare S. et al. Structural and Functional Analyses of the Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) // *Mol Pharmacol.* 2011. Vol. 80, № 4. P. 565–572.
75. Cushman M., Sherman P. Inhibition of HIV-1 integration protein by aurintricarboxylic acid monomers, monomer analogs, and polymer fractions // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1992. Vol. 185, № 1. P. 85–90.
76. Fesen M.R. et al. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. Vol. 90, № 6. P. 2399–2403.
77. Goldgur Y. et al. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96, № 23. P. 13040–13043.
78. Steigbigel R.T. et al. Raltegravir with Optimized Background Therapy for Resistant HIV-1 Infection // *N Engl J Med.* 2008. Vol. 359, № 4. P. 339–354.
79. Summa V. et al. Discovery of Raltegravir, a Potent, Selective Orally Bioavailable HIV-Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-AIDS Infection // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, № 18. P. 5843–5855.
80. Antiviral drugs: from basic discovery through clinical trials / ed. Kazmierski W.M. Hoboken, NJ: Wiley, 2011. 438 p.
81. Belyk K.M. et al. Potassium salt of an hiv integrase inhibitor: pat. WO2006060712A2 USA. 2006.
82. DeJesus E. et al. Antiviral Activity, Pharmacokinetics, and Dose Response of the HIV-1 Integrase Inhibitor GS-9137 (JTK-303) in Treatment-Naive and

- Treatment-Experienced Patients // Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2006. Vol. 43, № 1. P. 1–5.
83. Unger N.R. et al. Elvitegravir for the treatment of HIV // Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2016. Vol. 17, № 17. P. 2359–2370.
 84. Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012. Vol. 2, № 4. P. a007161–a007161.
 85. INSTI Resistance Notes - HIV Drug Resistance Database [Electronic resource]. URL: <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/> (accessed: 13.04.2024).
 86. Fransen S. et al. Loss of Raltegravir Susceptibility by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Conferred via Multiple Nonoverlapping Genetic Pathways // J Virol. 2009. Vol. 83, № 22. P. 11440–11446.
 87. Abram M.E. et al. Impact of Primary Elvitegravir Resistance-Associated Mutations in HIV-1 Integrase on Drug Susceptibility and Viral Replication Fitness // Antimicrob Agents Chemother. 2013. Vol. 57, № 6. P. 2654–2663.
 88. Shimura K. et al. Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (JTK-303/GS-9137) // J Virol. 2008. Vol. 82, № 2. P. 764–774.
 89. Vandekerckhove L. GSK-1349572, a novel integrase inhibitor for the treatment of HIV infection // Curr Opin Investig Drugs. 2010. Vol. 11, № 2. P. 203–212.
 90. Dow D.E., Bartlett J.A. Dolutegravir, the Second-Generation of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTIs) for the Treatment of HIV // Infect Dis Ther. 2014. Vol. 3, № 2. P. 83–102.
 91. Choi E. et al. Recent advances in the discovery of small-molecule inhibitors of HIV-1 integrase // Future Science OA. 2018. Vol. 4, № 9. P. FSO338.
 92. MARAS N., Selic L., CUSAK A. Processes for preparing dolutegravir and cabotegravir and analogues thereof: pat. WO2016113372A1 USA. 2016.

93. Dietz J.-P. et al. Six-Step Gram-Scale Synthesis of the Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Dolutegravir Sodium // *Org. Process Res. Dev.* 2021. Vol. 25, № 8. P. 1898–1910.
94. Wang X. et al. Three-step synthetic procedure to prepare dolutegravir, cabotegravir, and bictegravir // *Green Chemistry Letters and Reviews.* 2022. Vol. 15, № 2. P. 312–319.
95. Shimura K. et al. Resistance Profiles of Novel Electrostatically Constrained HIV-1 Fusion Inhibitors // *Journal of Biological Chemistry.* 2010. Vol. 285, № 50. P. 39471–39480.
96. Nishikawa H. et al. Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2009. Vol. 41, № 4. P. 891–899.
97. Liu S. et al. Different from the HIV Fusion Inhibitor C34, the Anti-HIV Drug Fuzeon (T-20) Inhibits HIV-1 Entry by Targeting Multiple Sites in gp41 and gp120 // *Journal of Biological Chemistry.* 2005. Vol. 280, № 12. P. 11259–11273.
98. Derdeyn C.A. et al. Sensitivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Fusion Inhibitors Targeted to the gp41 First Heptad Repeat Involves Distinct Regions of gp41 and Is Consistently Modulated by gp120 Interactions with the Coreceptor // *J Virol.* 2001. Vol. 75, № 18. P. 8605–8614.
99. Pierson T.C., Doms R.W., Pöhlmann S. Prospects of HIV-1 entry inhibitors as novel therapeutics // *Reviews in Medical Virology.* 2004. Vol. 14, № 4. P. 255–270.
100. Liu S., Jiang S. High Throughput Screening and Characterization of HIV-1 Entry Inhibitors Targeting gp41: Theories and Techniques // *CPD.* 2004. Vol. 10, № 15. P. 1827–1843.
101. Si Z. et al. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101, № 14. P. 5036–5041.

102. Kuppanna A., Reddy M.B.R.K., Datta D. An improved process for the preparation of enfuvirtide: pat. WO2011095989A2 USA. 2011.
103. Zenin V. et al. Enfuvirtide biosynthesis in thermostable chaperone-based fusion // Biotechnology Reports. 2022. Vol. 35. P. e00734.
104. Strizki J.M. et al. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001. Vol. 98, № 22. P. 12718–12723.
105. Tagat J.R. et al. Piperazine-Based CCR5 Antagonists as HIV-1 Inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-Dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]- 4-[4-{2-methoxy-1(*R*)-4-(trifluoromethyl)phenyl}ethyl-3(*S*)-methyl-1-piperazinyl]- 4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a Potent, Highly Selective, and Orally Bioavailable CCR5 Antagonist // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47, № 10. P. 2405–2408.
106. Maeda K. et al. Spirodiketopiperazine-Based CCR5 Inhibitor Which Preserves CC-Chemokine/CCR5 Interactions and Exerts Potent Activity against R5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 In Vitro // J Virol. 2004. Vol. 78, № 16. P. 8654–8662.
107. Lalezari J. et al. Antiviral activity and safety of 873140, a novel CCR5 antagonist, during short-term monotherapy in HIV-infected adults // AIDS. 2005. Vol. 19, № 14. P. 1443–1448.
108. Nichols W.G. et al. Hepatotoxicity Observed in Clinical Trials of Aplaviroc (GW873140) // Antimicrob Agents Chemother. 2008. Vol. 52, № 3. P. 858–865.
109. Demarest J.F. et al. Virologic Failure in First-Line Human Immunodeficiency Virus Therapy with a CCR5 Entry Inhibitor, Aplaviroc, plus a Fixed-Dose Combination of Lamivudine-Zidovudine: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Regardless of Envelope Tropism // Antimicrob Agents Chemother. 2009. Vol. 53, № 3. P. 1116–1123.

110. Gulick R.M. et al. Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 HIV-1 Infection // *N Engl J Med*. 2008. Vol. 359, № 14. P. 1429–1441.
111. Fätkenheuer G. et al. Subgroup Analyses of Maraviroc in Previously Treated R5 HIV-1 Infection // *N Engl J Med*. 2008. Vol. 359, № 14. P. 1442–1455.
112. Cooper D.A. et al. Maraviroc versus Efavirenz, Both in Combination with Zidovudine-Lamivudine, for the Treatment of Antiretroviral-Naive Subjects with CCR5-Tropic HIV-1 Infection // *J. Infect. Dis.*. 2010. Vol. 201, № 6. P. 803–813.
113. Perros M. et al. Tryasolyl tropane derivatives as ccr5 modulators: pat. WO2001090106A2 USA. 2001.
114. Kohlstaedt L.A. et al. Crystal Structure at 3.5 Å Resolution of HIV-1 Reverse Transcriptase Complexed with an Inhibitor // *Science*. 1992. Vol. 256, № 5065. P. 1783–1790.
115. Jacobo-Molina A. et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. Vol. 90, № 13. P. 6320–6324.
116. Mitsuya H., Broder S. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986. Vol. 83, № 6. P. 1911–1915.
117. Cheng Y.C. et al. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs // *J Biol Chem*. 1987. Vol. 262, № 5. P. 2187–2189.
118. Balzarini J., Herdewijn P., De Clercq E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds // *J Biol Chem*. 1989. Vol. 264, № 11. P. 6127–6133.

119. Richman D.D. HIV chemotherapy // *Nature*. 2001. Vol. 410, № 6831. P. 995–1001.
120. Shafer R.W. et al. Combination Therapy with Zidovudine and Didanosine Selects for Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains with Unique Patterns of pol Gene Mutations // *Journal of Infectious Diseases*. 1994. Vol. 169, № 4. P. 722–729.
121. Shirasaka T. et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92, № 6. P. 2398–2402.
122. Schinazi R.F. et al. Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides // *Antimicrob Agents Chemother.* 1993. Vol. 37, № 4. P. 875–881.
123. Quan Y. et al. Endogenous reverse transcription assays reveal high-level resistance to the triphosphate of (-)2'-dideoxy-3'-thiacytidine by mutated M184V human immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.* 1996. Vol. 70, № 8. P. 5642–5645.
124. Schuurman R. et al. Rapid Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Load and Appearance of Drug-Resistant Virus Populations in Persons Treated with Lamivudine (3TC) // *Journal of Infectious Diseases*. 1995. Vol. 171, № 6. P. 1411–1419.
125. Ferrer E. et al. Genotype and Phenotype at Baseline and at Failure in Human Immunodeficiency Virus–Infected Antiretroviral-Naive Patients in a Randomized Trial Comparing Zidovudine and Lamivudine plus Nelfinavir or Nevirapine // *J INFECT DIS*. 2003. Vol. 187, № 4. P. 687–690.
126. Johnson M.S. et al. Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986. Vol. 83, № 20. P. 7648–7652.

127. Huang H. et al. Structure of a Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance // *Science*. 1998. Vol. 282, № 5394. P. 1669–1675.
128. Tuske S. et al. Structures of HIV-1 RT–DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir // *Nat Struct Mol Biol*. 2004. Vol. 11, № 5. P. 469–474.
129. Harrigan P.R. et al. Resistance Profile of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir (1592U89) after Monotherapy and Combination Therapy // *J. Infect. Dis*. 2000. Vol. 181, № 3. P. 912–920.
130. Wainberg M.A. et al. In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA // *Antivir Ther*. 1999. Vol. 4, № 2. P. 87–94.
131. Margot N.A. et al. Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral-experienced patients treated with tenofovir DF: // *AIDS*. 2002. Vol. 16, № 9. P. 1227–1235.
132. García-Lerma J.G. et al. A Novel Genetic Pathway of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Stavudine Mediated by the K65R Mutation // *J Virol*. 2003. Vol. 77, № 10. P. 5685–5693.
133. Larder B.A., Darby G., Richman D.D. HIV with Reduced Sensitivity to Zidovudine (AZT) Isolated During Prolonged Therapy // *Science*. 1989. Vol. 243, № 4899. P. 1731–1734.
134. Arion D. et al. Phenotypic Mechanism of HIV-1 Resistance to 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased Polymerization Processivity and Enhanced Sensitivity to Pyrophosphate of the Mutant Viral Reverse Transcriptase // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37, № 45. P. 15908–15917.
135. Meyer P.R. et al. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1998. Vol. 95, № 23. P. 13471–13476.

136. Boyer P.L. et al. Selective Excision of AZTMP by Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase // *J Virol*. 2001. Vol. 75, № 10. P. 4832–4842.
137. Schultze L.M. et al. Practical synthesis of the anti-HIV drug, PMPA // *Tetrahedron Letters*. 1998. Vol. 39, № 14. P. 1853–1856.
138. Brown Ripin D.H. et al. Process Improvements for the Manufacture of Tenofovir Disoproxil Fumarate at Commercial Scale // *Org. Process Res. Dev.* 2010. Vol. 14, № 5. P. 1194–1201.
139. De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection Presented at the Eleventh International Conference on Antiviral Research, San Diego, CA, 5–10 April 1998.1 // *Antiviral Research*. 1998. Vol. 38, № 3. P. 153–179.
140. Esnouf R. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors // *Nat Struct Mol Biol*. 1995. Vol. 2, № 4. P. 303–308.
141. Spence R.A. et al. Mechanism of Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by Nonnucleoside Inhibitors // *Science*. 1995. Vol. 267, № 5200. P. 988–993.
142. Witvrouw M. et al. Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV: // *AIDS*. 1999. Vol. 13, № 12. P. 1477–1483.
143. Sluis-Cremer N., Temiz N., Bahar I. Conformational Changes in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Binding // *CHR*. 2004. Vol. 2, № 4. P. 323–332.
144. Domaoal R. Structural and biochemical effects of human immunodeficiency virus mutants resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. Vol. 36, № 9. P. 1735–1751.
145. Lansdon E.B. et al. Crystal Structures of HIV-1 Reverse Transcriptase with Etravirine (TMC125) and Rilpivirine (TMC278): Implications for Drug Design // *J. Med. Chem*. 2010. Vol. 53, № 10. P. 4295–4299.

146. Sharma M., Saravolatz L.D. Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013. Vol. 68, № 2. P. 250–256.
147. Das K. et al. High-resolution structures of HIV-1 reverse transcriptase/TMC278 complexes: Strategic flexibility explains potency against resistance mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105, № 5. P. 1466–1471.
148. Zhang T. et al. The development of an effective synthetic route of rilpivirine // *BMC Chemistry*. 2021. Vol. 15, № 1. P. 22.
149. Wu X. et al. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents // *Theranostics*. 2017. Vol. 7, № 4. P. 826–845.
150. Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections // *Rev Med Virol*. 2002. Vol. 12, № 3. P. 159–166.
151. Waldmann M. et al. A nanomolar multivalent ligand as entry inhibitor of the hemagglutinin of avian influenza // *J Am Chem Soc*. 2014. Vol. 136, № 2. P. 783–788.
152. Lam T.T.-Y. et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China // *Nature*. 2013. Vol. 502, № 7470. P. 241–244.
153. Influenza (Seasonal) [Electronic resource]. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed: 13.04.2024).
154. von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors // *Nat Rev Drug Discov*. 2007. Vol. 6, № 12. P. 967–974.
155. McMichael A.J., Haynes B.F. Influenza vaccines: mTOR inhibition surprisingly leads to protection // *Nat Immunol*. 2013. Vol. 14, № 12. P. 1205–1207.
156. Das K. Antivirals targeting influenza A virus // *J Med Chem*. 2012. Vol. 55, № 14. P. 6263–6277.

157. Dreyfus P. [Treatment of influenzal infections by a moroxydine derivative] // *Sem Ther.* 1966. Vol. 42, № 1. P. 51–52.
158. Su S. et al. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics // *Virulence.* 2017. Vol. 8, № 8. P. 1580–1591.
159. Oxford J.S. Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: virology, pathology and epidemiology // *Rev Med Virol.* 2000. Vol. 10, № 2. P. 119–133.
160. Jagger B.W. et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response // *Science.* 2012. Vol. 337, № 6091. P. 199–204.
161. Medina R.A., García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments // *Nat Rev Microbiol.* 2011. Vol. 9, № 8. P. 590–603.
162. Wise H.M. et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA // *J Virol.* 2009. Vol. 83, № 16. P. 8021–8031.
163. Muramoto Y. et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA // *J Virol.* 2013. Vol. 87, № 5. P. 2455–2462.
164. Tong S. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses // *PLoS Pathog.* 2013. Vol. 9, № 10. P. e1003657.
165. Das K. et al. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets // *Nat Struct Mol Biol.* 2010. Vol. 17, № 5. P. 530–538.
166. Loregian A., Coen D.M. Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase // *Chem Biol.* 2006. Vol. 13, № 2. P. 191–200.
167. Rossignol J.-F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent // *Antiviral Research.* 2014. Vol. 110. P. 94–103.
168. Rossignol J.F. et al. Thiazolidines, a New Class of Anti-influenza Molecules Targeting Viral Hemagglutinin at the Post-translational Level // *Journal of Biological Chemistry.* 2009. Vol. 284, № 43. P. 29798–29808.

169. Dickey J.B., Towne E.B., Wright G.F. nitration of 2-aminothiazoles // *J. Org. Chem.* 1955. Vol. 20, № 4. P. 499–510.
170. Irabuena C. et al. Synthesis and antiplasmodial assessment of nitazoxanide and analogs as new antimalarial candidates // *Med Chem Res.* 2022. Vol. 31, № 3. P. 426–435.
171. Boriskin Y. et al. Arbidol: A Broad-Spectrum Antiviral Compound that Blocks Viral Fusion // *CMC.* 2008. Vol. 15, № 10. P. 997–1005.
172. Shi L. et al. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus in vitro and in vivo // *Arch Virol.* 2007. Vol. 152, № 8. P. 1447–1455.
173. Trofimov F.A. et al. Synthesis of a new antiviral agent, arbidole // *Pharm Chem J.* 1993. Vol. 27, № 1. P. 75–76.
174. Colman P.M., Ward C.W. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase // *Curr Top Microbiol Immunol.* 1985. Vol. 114. P. 177–255.
175. Palese P. et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase // *Virology.* 1974. Vol. 61, № 2. P. 397–410.
176. Liu C. et al. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding // *J Virol.* 1995. Vol. 69, № 2. P. 1099–1106.
177. Holzer C.T. et al. Inhibition of sialidases from viral, bacterial and mammalian sources by analogues of 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid modified at the C-4 position // *Glycoconj J.* 1993. Vol. 10, № 1. P. 40–44.
178. Lin L.-Z., Fang J.-M. Total Synthesis of Anti-Influenza Agents Zanamivir and Zanaphosphor via Asymmetric Aza-Henry Reaction // *Org. Lett.* 2016. Vol. 18, № 17. P. 4400–4403.
179. Varghese J.N., Epa V.C., Colman P.M. Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase // *Protein Sci.* 1995. Vol. 4, № 6. P. 1081–1087.

180. Kim C.U. et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity // *J Am Chem Soc.* 1997. Vol. 119, № 4. P. 681–690.
181. Kohno S. et al. Phase III randomized, double-blind study comparing single-dose intravenous peramivir with oral oseltamivir in patients with seasonal influenza virus infection // *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. Vol. 55, № 11. P. 5267–5276.
182. Barroso L. et al. Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment // *Antivir Ther.* 2005. Vol. 10, № 8. P. 901–910.
183. Yamashita M. et al. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity // *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. Vol. 53, № 1. P. 186–192.
184. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? // *Clin Infect Dis.* 2009. Vol. 48 Suppl 1. P. S3-13.
185. Ison M.G. Clinical use of approved influenza antivirals: therapy and prophylaxis // *Influenza Other Respir Viruses.* 2013. Vol. 7 Suppl 1, № Suppl 1. P. 7–13.
186. Watanabe A. et al. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: A double-blind, randomized, noninferiority clinical trial // *Clin Infect Dis.* 2010. Vol. 51, № 10. P. 1167–1175.
187. Sugaya N., Ohashi Y. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate (CS-8958) versus oseltamivir as treatment for children with influenza virus infection // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 6. P. 2575–2582.

188. Ikematsu H., Kawai N. Laninamivir octanoate: a new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza // *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011. Vol. 9, № 10. P. 851–857.
189. Hanessian S. et al. Design, synthesis, and neuraminidase inhibitory activity of GS-4071 analogues that utilize a novel hydrophobic paradigm // *Bioorg Med Chem Lett.* 2002. Vol. 12, № 23. P. 3425–3429.
190. Bhatt B. et al. Exploring the interactions of unsaturated glucuronides with influenza virus sialidase // *J Med Chem.* 2012. Vol. 55, № 20. P. 8963–8968.
191. Mohan S. et al. Carbocycles related to oseltamivir as influenza virus group-1-specific neuraminidase inhibitors. Binding to N1 enzymes in the context of virus-like particles // *J Med Chem.* 2010. Vol. 53, № 20. P. 7377–7391.
192. Russell R.J. et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design // *Nature.* 2006. Vol. 443, № 7107. P. 45–49.
193. Kerry P.S. et al. Structural basis for a class of nanomolar influenza A neuraminidase inhibitors // *Sci Rep.* 2013. Vol. 3. P. 2871.
194. Mohan S. et al. Serendipitous discovery of a potent influenza virus a neuraminidase inhibitor // *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014. Vol. 53, № 4. P. 1076–1080.
195. Schade D. et al. Development of novel potent orally bioavailable oseltamivir derivatives active against resistant influenza A // *J Med Chem.* 2014. Vol. 57, № 3. P. 759–769.
196. Cheng T.-J.R. et al. Development of oseltamivir phosphonate congeners as anti-influenza agents // *J Med Chem.* 2012. Vol. 55, № 20. P. 8657–8670.
197. Mena I. et al. Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication // *J Virol.* 1999. Vol. 73, № 2. P. 1186–1194.

198. Ozawa M. et al. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication // *J Virol*. 2007. Vol. 81, № 1. P. 30–41.
199. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication // *J Gen Virol*. 2002. Vol. 83, № Pt 4. P. 723–734.
200. Ye Q., Krug R.M., Tao Y.J. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA // *Nature*. 2006. Vol. 444, № 7122. P. 1078–1082.
201. Kao R.Y. et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target // *Nat Biotechnol*. 2010. Vol. 28, № 6. P. 600–605.
202. Cheng H. et al. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of 1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide derivatives as new anti-influenza A agents targeting virus nucleoprotein // *J Med Chem*. 2012. Vol. 55, № 5. P. 2144–2153.
203. Lejal N. et al. Structure-based discovery of the novel antiviral properties of naproxen against the nucleoprotein of influenza A virus // *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. Vol. 57, № 5. P. 2231–2242.
204. Shul'diakov A.A., Liapina E.P., Kuznetsov V.I. Current principles in the chemoprophylaxis of acute respiratory viral infections // *Ter Arkh*. 2013. Vol. 85, № 11. P. 27–33.
205. Semenova N.P. et al. Effect of the antiviral drug Ingaviruin on intracellular transformations and import into the nucleus of influenza A virus nucleocapsid protein // *Vopr Virusol*. 2010. Vol. 55, № 5. P. 17–20.
206. Loginova S.I. et al. Prophylactic and therapeutic efficacies of Ingavirin, a novel Russian chemotherapeutic, with respect to influenza pathogen A (H5N1) // *Antibiot Khimioter*. 2010. Vol. 55, № 7–8. P. 10–12.
207. Zarubaev V.V. et al. In vitro and in vivo effects of ingavirin on the ultrastructure and infectivity of influenza virus // *Vopr Virusol*. 2011. Vol. 56, № 5. P. 21–25.

208. Galegov G.A., Andronova V.L., Nebol'sin V.E. Antiviral effect of Ingavirin against seasonal influenza virus A/H1N1 in MDCK cell culture // Antibiot Khimioter. 2009. Vol. 54, № 9–10. P. 19–22.
209. Shishkina L.N. et al. In vitro and in vivo efficacy of Ingavirin against strains of pandemic influenza virus A(H1N1/09)v // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2011. № 2. P. 93–96.
210. Shishkina L.N. et al. In vivo efficacy of Ingavirin against pandemic A (H1N1/09)v influenza virus // Antibiot Khimioter. 2010. Vol. 55, № 5–6. P. 32–35.
211. Stouffer A.L. et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel // Nature. 2008. Vol. 451, № 7178. P. 596–599.
212. Tang Y. et al. The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue // J Biol Chem. 2002. Vol. 277, № 42. P. 39880–39886.
213. Holsinger L.J. et al. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis // J Virol. 1994. Vol. 68, № 3. P. 1551–1563.
214. Pielak R.M., Chou J.J. Influenza M2 proton channels // Biochim Biophys Acta. 2011. Vol. 1808, № 2. P. 522–529.
215. Schnell J.R., Chou J.J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus // Nature. 2008. Vol. 451, № 7178. P. 591–595.
216. Tataridis D. et al. Influence of an additional 2-amino substituent of the 1-aminoethyl pharmacophore group on the potency of rimantadine against influenza virus A // Bioorg Med Chem Lett. 2007. Vol. 17, № 3. P. 692–696.
217. Wang J. et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. Vol. 110, № 4. P. 1315–1320.
218. Wu Y. et al. Flipping in the pore: discovery of dual inhibitors that bind in different orientations to the wild-type versus the amantadine-resistant S31N

- mutant of the influenza A virus M2 proton channel // *J Am Chem Soc.* 2014. Vol. 136, № 52. P. 17987–17995.
219. Rey-Carrizo M. et al. 3-Azatetracyclo[5.2.1.1(5,8).0(1,5)]undecane derivatives: from wild-type inhibitors of the M2 ion channel of influenza A virus to derivatives with potent activity against the V27A mutant // *J Med Chem.* 2013. Vol. 56, № 22. P. 9265–9274.
 220. Wang J. et al. Discovery of novel dual inhibitors of the wild-type and the most prevalent drug-resistant mutant, S31N, of the M2 proton channel from influenza A virus // *J Med Chem.* 2013. Vol. 56, № 7. P. 2804–2812.
 221. Alves Galvão M.G., Rocha Crispino Santos M.A., Alves Da Cunha A.J. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly // *Cochrane Database of Systematic Reviews* / ed. Cochrane Acute Respiratory Infections Group. 2014. Vol. 2014, № 11.
 222. Bachrach U., Don S. Inactivation of influenza and Newcastle disease viruses by oxidized spermine // *Isr J Med Sci.* 1970. Vol. 6, № 3. P. 435–437.
 223. Bachrach U. Antiviral activity of oxidized polyamines // *Amino Acids.* 2007. Vol. 33, № 2. P. 267–272.
 224. Lin T.I., Heider H., Schroeder C. Different modes of inhibition by adamantane amine derivatives and natural polyamines of the functionally reconstituted influenza virus M2 proton channel protein // *J Gen Virol.* 1997. Vol. 78 (Pt 4). P. 767–774.
 225. Even-Or O. et al. Immunogenicity, protective efficacy and mechanism of novel CCS adjuvanted influenza vaccine // *Vaccine.* 2010. Vol. 28, № 39. P. 6527–6541.
 226. Even-Or O. et al. A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid-ceramide carbamoyl-spermine (CCS). II. Studies in mice and ferrets and mechanism of adjuvanticity // *Vaccine.* 2011. Vol. 29, № 13. P. 2474–2486.

227. Galabov A.S. et al. Antiviral activity of tetrahydro-2(1H)-pyrimidinones and related compounds // *Arzneimittelforschung*. 1984. Vol. 34, № 1. P. 9–14.
228. Karparov A. et al. Antiviral effect of 1-morpholinomethyl-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone (DD-13) in experimental alphaviral infections in white mice // *Arzneimittelforschung*. 1985. Vol. 35, № 8. P. 1269–1275.
229. Tverdislov V.A. et al. Effect of a new antiviral compound 1-morpholinomethyltetrahydro-2(1H)-pyrimidinone on the interaction of influenza virus proteins with flat lipid membranes // *Vopr. Virusol.* 1988. Vol. 33, № 3. P. 278–281.
230. Galabov A.S. et al. Alteration in the antigenic structure of M1 protein of influenza A virus mutant resistant to a new antiviral compound mopyridone // *Acta Virol.* 1994. Vol. 38, № 1. P. 5–10.
231. Tantcheva L.P., Rangelova D.S. Toxicity and enzyme-inducing effect of the antiviral compound mopyridone in mice // *Arzneimittelforschung*. 1996. Vol. 46, № 9. P. 931–933.
232. Peng Q. et al. Structural insight into RNA synthesis by influenza D polymerase // *Nat Microbiol.* 2019. Vol. 4, № 10. P. 1750–1759.
233. Reich S. et al. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase // *Nature*. 2014. Vol. 516, № 7531. P. 361–366.
234. Hengrung N. et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus // *Nature*. 2015. Vol. 527, № 7576. P. 114–117.
235. Fan H. et al. Structures of influenza A virus RNA polymerase offer insight into viral genome replication // *Nature*. 2019. Vol. 573, № 7773. P. 287–290.
236. Stevaert A., Naesens L. The Influenza Virus Polymerase Complex: An Update on Its Structure, Functions, and Significance for Antiviral Drug Design // *Med Res Rev.* 2016. Vol. 36, № 6. P. 1127–1173.
237. Furuta Y. et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705 // *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. Vol. 46, № 4. P. 977–981.

238. Furuta Y., Komeno T., Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017. Vol. 93, № 7. P. 449–463.
239. Furuta Y. et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus // *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 3. P. 981–986.
240. Vanderlinden E. et al. Distinct Effects of T-705 (Favipiravir) and Ribavirin on Influenza Virus Replication and Viral RNA Synthesis // *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 11. P. 6679–6691.
241. Goldhill D.H. et al. Determining the Mutation Bias of Favipiravir in Influenza Virus Using Next-Generation Sequencing // *J Virol.* 2019. Vol. 93, № 2. P. e01217-18.
242. Jin Z. et al. The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 7. P. e68347.
243. Sangawa H. et al. Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase // *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 11. P. 5202–5208.
244. Baranovich T. et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro // *J Virol.* 2013. Vol. 87, № 7. P. 3741–3751.
245. Furuta Y. et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor // *Antiviral Res.* 2013. Vol. 100, № 2. P. 446–454.
246. Tarbet E.B. et al. In vitro activity of favipiravir and neuraminidase inhibitor combinations against oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus // *Arch Virol.* 2014. Vol. 159, № 6. P. 1279–1291.
247. Smee D.F. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 1. P. 126–133.

248. Smee D.F. et al. Synergistic combinations of favipiravir and oseltamivir against wild-type pandemic and oseltamivir-resistant influenza A virus infections in mice // *Future Virol.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 1085–1094.
249. Tarbet E.B. et al. Combinations of favipiravir and peramivir for the treatment of pandemic influenza A/California/04/2009 (H1N1) virus infections in mice // *Antiviral Res.* 2012. Vol. 94, № 1. P. 103–110.
250. Park S. et al. Combination effects of peramivir and favipiravir against oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A(H1N1) infection in mice // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 7. P. e101325.
251. Marathe B.M. et al. Combinations of Oseltamivir and T-705 Extend the Treatment Window for Highly Pathogenic Influenza A(H5N1) Virus Infection in Mice // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 26742.
252. Baz M. et al. Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus // *Viruses.* 2018. Vol. 10, № 11. P. 610.
253. Kiso M. et al. Combination Therapy With Neuraminidase and Polymerase Inhibitors in Nude Mice Infected With Influenza Virus // *J Infect Dis.* 2018. Vol. 217, № 6. P. 887–896.
254. Wang Y. et al. Comparative Effectiveness of Combined Favipiravir and Oseltamivir Therapy Versus Oseltamivir Monotherapy in Critically Ill Patients With Influenza Virus Infection // *J Infect Dis.* 2020. Vol. 221, № 10. P. 1688–1698.
255. Furuta Y., Egawa H. Derives heterocycliques azotes de carboxamide ou certains de leurs sels et antiviraux les contenant les deux: pat. WO2000010569A1 USA. 2000.
256. Caldwell J.J., Veillard N., Collins I. Design and synthesis of 2(1H)-pyrazinones as inhibitors of protein kinases // *Tetrahedron.* 2012. Vol. 68, № 47. P. 9713–9728.

257. Shi F. et al. Synthesis and crystal structure of 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide // DD&T. 2014. Vol. 8, № 3. P. 117–120.
258. Finberg R.W. et al. Phase 2b Study of Pimodivir (JNJ-63623872) as Monotherapy or in Combination With Oseltamivir for Treatment of Acute Uncomplicated Seasonal Influenza A: TOPAZ Trial // J Infect Dis. 2019. Vol. 219, № 7. P. 1026–1034.
259. Clark M.P. et al. Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2 // J Med Chem. 2014. Vol. 57, № 15. P. 6668–6678.
260. Byrn R.A. et al. Preclinical activity of VX-787, a first-in-class, orally bioavailable inhibitor of the influenza virus polymerase PB2 subunit // Antimicrob Agents Chemother. 2015. Vol. 59, № 3. P. 1569–1582.
261. Liu Y. et al. The crystal structure of the PB2 cap-binding domain of influenza B virus reveals a novel cap recognition mechanism // J Biol Chem. 2015. Vol. 290, № 14. P. 9141–9149.
262. Severin C. et al. The cap-binding site of influenza virus protein PB2 as a drug target // Acta Crystallogr D Struct Biol. 2016. Vol. 72, № Pt 2. P. 245–253.
263. Wakai C. et al. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase // J Virol. 2011. Vol. 85, № 15. P. 7504–7512.
264. Janssen Research & Development, LLC. A Phase 3 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Pimodivir in Combination With the Standard-of-Care Treatment in Adolescent, Adult, and Elderly Hospitalized Patients With Influenza A Infection: Clinical trial registration NCT03376321. clinicaltrials.gov, 2021.
265. Noshi T. et al. S-033447/S-033188, a Novel Small Molecule Inhibitor of Cap-Dependent Endonuclease of Influenza A and B Virus: In Vitro Antiviral Activity Against Clinical Strains // Open Forum Infectious Diseases. 2016. Vol. 3, № suppl_1. P. 645.

266. Hayden F.G. et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents // *N Engl J Med*. 2018. Vol. 379, № 10. P. 913–923.
267. Johns B.A. et al. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors 3. A Diastereomeric Approach to Chiral Nonracemic Tricyclic Ring Systems and the Discovery of Dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) // *J. Med. Chem*. 2013. Vol. 56, № 14. P. 5901–5916.
268. Omoto S. et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 9633.
269. Koshimichi H. et al. Population Pharmacokinetic and Exposure-Response Analyses of Baloxavir Marboxil in Adults and Adolescents Including Patients With Influenza // *J Pharm Sci*. 2019. Vol. 108, № 5. P. 1896–1904.
270. Noshi T. et al. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit // *Antiviral Res*. 2018. Vol. 160. P. 109–117.
271. Mishin V.P. et al. Susceptibility of Influenza A, B, C, and D Viruses to Baloxavir1 // *Emerg Infect Dis*. 2019. Vol. 25, № 10. P. 1969–1972.
272. Takashita E. et al. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil // *Front Microbiol*. 2018. Vol. 9. P. 3026.
273. Gubareva L.V. et al. Assessing baloxavir susceptibility of influenza viruses circulating in the United States during the 2016/17 and 2017/18 seasons // *Euro Surveill*. 2019. Vol. 24, № 3. P. 1800666.
274. Koszalka P. et al. Baloxavir marboxil susceptibility of influenza viruses from the Asia-Pacific, 2012-2018 // *Antiviral Res*. 2019. Vol. 164. P. 91–96.
275. Fukao K. et al. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection // *J Antimicrob Chemother*. 2019. Vol. 74, № 3. P. 654–662.

276. 真河井 et al. Substituted polycyclic pyridone derivative and prodrug thereof: pat. WO2016175224A1 USA. 2016.
277. Deeva E. и др. Противовирусный препарат “Триазавирин”TM: от скрининга до клинической апробации // Razrab. Regist. Lek. Sredstv. Vol. 2, № 7. P. 144–151.
278. Tikhonova E.P. et al. Study of effectiveness of antiviral drugs (umifenovir, triazavirin) against acute respiratory viral infections // Kazan Med J. 2018. Vol. 99, № 2. P. 215–223.
279. Karpenko I. et al. Antiviral Properties, Metabolism, and Pharmacokinetics of a Novel Azolo-1,2,4-Triazine-Derived Inhibitor of Influenza A and B Virus Replication // Antimicrob Agents Chemother. 2010. Vol. 54, № 5. P. 2017–2022.
280. Чупахин (RU) О.Н. et al. Натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4h)-она, дигидрат, обладающая противовирусной активностью: pat. RU2294936C1 USA. 2007.
281. Петров (RU) А.Ю., Петров А.Ю. Противовирусное средство для профилактики и лечения клещевого энцефалита: pat. RU2444363C2 USA. 2012.
282. Петров (RU) А.Ю., Петров А.Ю. Противовирусное средство и способ профилактики и лечения вирусных инфекций: pat. RU2457844C2 USA. 2012.
283. Сабитов А.У. и др. Метаанализ рандомизированных клинических исследований эффективности препарата Риамилловир в этиотропной терапии гриппа: 5–6 // Антибиотики и Химиотерапия. 2021. Том 66, № 5–6. С. 58–71.
284. Сабитов А.У. и др. Метаанализ рандомизированных контролируемых клинических исследований эффективности препарата Риамилловир в этиотропной терапии острой респираторной вирусной инфекции: 5–6 // Антибиотики и Химиотерапия. 2021. Том 66, № 5–6. С. 48–57.

285. Vanangamudi M., Kurup S., Namasivayam V. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): a brief overview of clinically approved drugs and combination regimens // *Current Opinion in Pharmacology*. 2020. Vol. 54. P. 179–187.
286. Lee N., Hurt A.C. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: a clinical perspective // *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2018. Vol. 31, № 6. P. 520–526.
287. Shie J.-J., Fang J.-M. Development of effective anti-influenza drugs: congeners and conjugates – a review // *J Biomed Sci*. 2019. Vol. 26, № 1. P. 84.
288. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020. Vol. 39, № 7. P. 1201–1208.
289. Hernández-Gil J. et al. Two copper complexes from two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands: Different nuclearity and different DNA binding and cleavage capabilities // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013. Vol. 125. P. 50–63.
290. Lin R. et al. 1-Acyl-1 *H* -[1,2,4]triazole-3,5-diamine Analogues as Novel and Potent Anticancer Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and Evaluation of Biological Activities // *J. Med. Chem*. 2005. Vol. 48, № 13. P. 4208–4211.
291. Kok B.P. et al. Discovery of small-molecule enzyme activators by activity-based protein profiling // *Nat Chem Biol*. 2020. Vol. 16, № 9. P. 997–1005.
292. Zorn K.M. et al. Multiple Machine Learning Comparisons of HIV Cell-based and Reverse Transcriptase Data Sets // *Mol. Pharmaceutics*. 2019. Vol. 16, № 4. P. 1620–1632.
293. Robertson K., Liner J., Meeker R.B. Antiretroviral neurotoxicity // *J. Neurovirol*. 2012. Vol. 18, № 5. P. 388–399.
294. Rogers D., Hahn M. Extended-Connectivity Fingerprints // *J. Chem. Inf. Model*. 2010. Vol. 50, № 5. P. 742–754.

295. Zdrazil B. et al. The ChEMBL Database in 2023: a drug discovery platform spanning multiple bioactivity data types and time periods // *Nucleic Acids Research*. 2024. Vol. 52, № D1. P. D1180–D1192.
296. Division of AIDS Anti-HIV/OI/TB Therapeutics Database - Simple Search Page [Electronic resource]. URL: <https://chemdb.niaid.nih.gov/> (accessed: 13.04.2024).
297. Apostolova N. et al. Efavirenz and the CNS: what we already know and questions that need to be answered // *J. Antimicrob. Chemother.* 2015. Vol. 70, № 10. P. 2693–2708.
298. Lyubchanskaya V.M. et al. Indazolequinones in the Nenitzescu Reaction. Synthesis of Pyrrolo[2,3-e]- and Furo[2,3-e]indazoles // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2000. Vol. 36, № 11. P. 1276–1283.
299. Lyubchanskaya V.M., Alekseeva L.M., Granik V.G. The aza-Nenitzescu reaction. Synthesis of indazole derivatives by condensation of quinones with hydrazones // *Chem Heterocycl Compd.* 1999. Vol. 35, № 5. P. 570–574.
300. Egorova, Anna et al. CCDC 2246679: Experimental Crystal Structure Determination.
301. Egorova, Anna et al. CCDC 2249815: Experimental Crystal Structure Determination.
302. Richter M. et al. Complementary assays helping to overcome challenges for identifying neuraminidase inhibitors // *Future Virology*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 77–88.
303. Hers J.F.P., Masurel N., Mulder J. Bacteriology and histopathology of the respiratory tract and lungs in fatal Asian influenza // *The Lancet*. 1958. Vol. 272, № 7057. P. 1141–1143.
304. Lindsay M.I. Hong Kong Influenza: Clinical, Microbiologic, and Pathologic Features in 127 Cases // *JAMA*. 1970. Vol. 214, № 10. P. 1825.

305. Schwarzmans S.W. Bacterial Pneumonia During the Hong Kong Influenza Epidemic of 1968-1969: Experience in a City-County Hospital // Arch Intern Med. 1971. Vol. 127, № 6. P. 1037.
306. Brundage J.F., Shanks G.D. Deaths from Bacterial Pneumonia during 1918–19 Influenza Pandemic // Emerg. Infect. Dis. 2008. Vol. 14, № 8. P. 1193–1199.
307. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness // J INFECT DIS. 2008. Vol. 198, № 7. P. 962–970.
308. Klugman K.P., Astley C.M., Lipsitch M. Time from Illness Onset to Death, 1918 Influenza and Pneumococcal Pneumonia // Emerg. Infect. Dis. 2009. Vol. 15, № 2. P. 346–347.
309. Joseph C., Togawa Y., Shindo N. Bacterial and viral infections associated with influenza // Influenza Resp Viruses. 2013. Vol. 7, № s2. P. 105–113.
310. Short K.R., Kedzierska K., Van De Sandt C.E. Back to the Future: Lessons Learned From the 1918 Influenza Pandemic // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018. Vol. 8. P. 343.
311. MacIntyre C.R. et al. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09 // BMC Infect Dis. 2018. Vol. 18, № 1. P. 637.
312. Von Grafenstein S. et al. Interface dynamics explain assembly dependency of influenza neuraminidase catalytic activity // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2015. Vol. 33, № 1. P. 104–120.
313. Klenow L. et al. Influenza virus and pneumococcal neuraminidases enhance catalysis by similar yet distinct sialic acid–binding strategies // Journal of Biological Chemistry. 2023. Vol. 299, № 2. P. 102891.
314. Walther E. et al. Dual Acting Neuraminidase Inhibitors Open New Opportunities to Disrupt the Lethal Synergism between Streptococcus pneumoniae and Influenza Virus // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7.

315. Gut H. et al. Structural Basis for *Streptococcus pneumoniae* NanA Inhibition by Influenza Antivirals Zanamivir and Oseltamivir Carboxylate // *Journal of Molecular Biology*. 2011. Vol. 409, № 4. P. 496–503.
316. Van Der Vries E. et al. H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus: Resistance of the I223R Neuraminidase Mutant Explained by Kinetic and Structural Analysis // *PLoS Pathog* / ed. Rey F.A. 2012. Vol. 8, № 9. P. e1002914.
317. Zima V. et al. Investigation of flexibility of neuraminidase 150-loop using tamiflu derivatives in influenza A viruses H1N1 and H5N1 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 27, № 13. P. 2935–2947.
318. Keil J.M. et al. Sialidase Inhibitors with Different Mechanisms // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 20. P. 13574–13593.
319. Parker D. et al. The NanA Neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* Is Involved in Biofilm Formation // *Infect Immun*. 2009. Vol. 77, № 9. P. 3722–3730.
320. Wren J.T. et al. Pneumococcal Neuraminidase A (NanA) Promotes Biofilm Formation and Synergizes with Influenza A Virus in Nasal Colonization and Middle Ear Infection // *Infect Immun* / ed. Pirofski L. 2017. Vol. 85, № 4. P. e01044-16.
321. Walther E. et al. Antipneumococcal activity of neuraminidase inhibiting artocarpin // *International Journal of Medical Microbiology*. 2015. Vol. 305, № 3. P. 289–297.
322. Grienke U. et al. Discovery of prenylated flavonoids with dual activity against influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 27156.
323. Hoffmann A. et al. Discovery and Characterization of Diazenylaryl Sulfonic Acids as Inhibitors of Viral and Bacterial Neuraminidases // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8.
324. Xu X. et al. Structural Characterization of the 1918 Influenza Virus H1N1 Neuraminidase // *J Virol*. 2008. Vol. 82, № 21. P. 10493–10501.

325. Amaro R.E. et al. Remarkable Loop Flexibility in Avian Influenza N1 and Its Implications for Antiviral Drug Design // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 25. P. 7764–7765.
326. Amaro R.E. et al. Characterizing Loop Dynamics and Ligand Recognition in Human- and Avian-Type Influenza Neuraminidases via Generalized Born Molecular Dynamics and End-Point Free Energy Calculations // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 13. P. 4702–4709.
327. Air G.M. Influenza neuraminidase // Influenza Resp Viruses. 2012. Vol. 6, № 4. P. 245–256.
328. McAuley J.L. et al. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. P. 39.
329. Li Q. et al. The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site // Nat Struct Mol Biol. 2010. Vol. 17, № 10. P. 1266–1268.
330. Landon M.R. et al. Novel Druggable Hot Spots in Avian Influenza Neuraminidase H5N1 Revealed by Computational Solvent Mapping of a Reduced and Representative Receptor Ensemble // Chem Biol Drug Des. 2008. Vol. 71, № 2. P. 106–116.
331. Vavricka C.J. et al. Structural and Functional Analysis of Laninamivir and its Octanoate Prodrug Reveals Group Specific Mechanisms for Influenza NA Inhibition // PLoS Pathog / ed. Pekosz A. 2011. Vol. 7, № 10. P. e1002249.
332. Cheng L.S. et al. Ensemble-Based Virtual Screening Reveals Potential Novel Antiviral Compounds for Avian Influenza Neuraminidase // J. Med. Chem. 2008. Vol. 51, № 13. P. 3878–3894.
333. Le L. et al. Molecular Dynamics Simulations Suggest that Electrostatic Funnel Directs Binding of Tamiflu to Influenza N1 Neuraminidases // PLoS Comput Biol / ed. Amaro R.E. 2010. Vol. 6, № 9. P. e1000939.
334. Tran D.-T.T., Le L.T., Truong T.N. Discover binding pathways using the sliding binding-box docking approach: application to binding pathways of

- oseltamivir to avian influenza H5N1 neuraminidase // *J Comput Aided Mol Des*. 2013. Vol. 27, № 8. P. 689–695.
335. Ju H. et al. Discovery of C-1 modified oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 146. P. 220–231.
336. Wang B. et al. Design, synthesis, and evaluation of carboxyl-modified oseltamivir derivatives with improved lipophilicity as neuraminidase inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018. Vol. 28, № 21. P. 3477–3482.
337. Ju H. et al. Discovery of novel 1,2,3-triazole oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors targeting the 430-cavity // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 187. P. 111940.
338. Li M. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Acylhydrazone Derivatives as Potent Neuraminidase Inhibitors // *ACS Med. Chem. Lett*. 2020. Vol. 11, № 9. P. 1745–1750.
339. Ai W. et al. Discovery of novel “Dual-site” binding oseltamivir derivatives as potent influenza virus neuraminidase inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 191. P. 112147.
340. Malbari K. et al. In quest of small-molecules as potent non-competitive inhibitors against influenza // *Bioorganic Chemistry*. 2021. Vol. 114. P. 105139.
341. Ryabova S.Yu. et al. Acetals of lactams and acid amides. 61. Synthesis and transamination of indoxyls and pyrrol-2-in-4-ones // *Chem Heterocycl Compd*. 1990. Vol. 26, № 11. P. 1238–1244.
342. Isakovich I.P. et al. Synthesis and pharmacological activity of derivatives of 3-aminomethylene-1-(2',6'-dichlorophenyl)oxindole and 2-aminomethyleneindoxyl // *Pharm Chem J*. 1995. Vol. 29, № 2. P. 100–105.
343. Sitkina L.M. et al. Benzenoid-quinone tautomerism in azomethines and their structural analogs. 34. 3-hydroxy-1-methylindole-2-carbaldehyde imines // *Chem Heterocycl Compd*. 1985. Vol. 21, № 7. P. 763–766.

344. Kalgutkar A.S., Jones R., Sawant A. Chapter 5. Sulfonamide as an Essential Functional Group in Drug Design // Drug Discovery / ed. Smith D.A. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. P. 210–274.
345. Wei X. et al. Emergence of Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Patients Receiving Fusion Inhibitor (T-20) Monotherapy // Antimicrob Agents Chemother. 2002. Vol. 46, № 6. P. 1896–1905.
346. Popovic M., Read-Connole E., Gallo Robert C. T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III // The Lancet. 1984. Vol. 324, № 8417–8418. P. 1472–1473.
347. Popovic M. et al. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS // Science. 1984. Vol. 224, № 4648. P. 497–500.
348. Ratner L. et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III // Nature. 1985. Vol. 313, № 6000. P. 277–284.
349. Nunberg J.H. et al. Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors // J Virol. 1991. Vol. 65, № 9. P. 4887–4892.
350. Balamane M. et al. Panel of Prototypical Recombinant Infectious Molecular Clones Resistant to Nevirapine, Efavirenz, Etravirine, and Rilpivirine // Antimicrob Agents Chemother. 2012. Vol. 56, № 8. P. 4522–4524.
351. van der Maaten L., Hinton G. Visualizing Data using t-SNE // Mach. Learning Res. 2008. Vol. 9. P. 2579–2605.
352. Sheldrick G.M. A short history of *SHELX* // Acta Crystallogr A Found Crystallogr. 2008. Vol. 64, № 1. P. 112–122.
353. Tafeenko V.A. et al. Intermolecular —CH₃ ...O₂ N— contacts in two polymorphic modifications of (1*E*)-*N*'-[(*E*)-2-cyano-1-(dimethylamino)-2-nitrovinyl]-*N,N*-dimethylethanimidamide // Acta Crystallogr B Struct Sci. 2003. Vol. 59, № 4. P. 492–497.

354. Chernyshev V.V. et al. Structural characterization of prazosin hydrochloride and prazosin free base // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004. Vol. 93, № 12. P. 3090–3095.
355. Zlokazov V.B., Chernyshev V.V. *MRIA* - a program for a full profile analysis of powder multiphase neutron-diffraction time-of-flight (direct and Fourier) spectra // *J Appl Crystallogr*. 1992. Vol. 25, № 3. P. 447–451.
356. Ahtee M. et al. Correction for preferred orientation in Rietveld refinement // *J Appl Crystallogr*. 1989. Vol. 22, № 3. P. 261–268.
357. Järvinen M. Application of symmetrized harmonics expansion to correction of the preferred orientation effect // *J Appl Crystallogr*. 1993. Vol. 26, № 4. P. 525–531.
358. Xu G. et al. Structure of the catalytic domain of *Streptococcus pneumoniae* sialidase NanA // *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun*. 2008. Vol. 64, № 9. P. 772–775.
359. Gut H., King S.J., Walsh M.A. Structural and functional studies of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase B: An intramolecular *trans* -sialidase // *FEBS Letters*. 2008. Vol. 582, № 23–24. P. 3348–3352.
360. Morris G.M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J Comput Chem*. 2009. Vol. 30, № 16. P. 2785–2791.
361. Phillips J.C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD // *The Journal of Chemical Physics*. 2020. Vol. 153, № 4. P. 044130.
362. Denning E.J. et al. Impact of 2'-hydroxyl sampling on the conformational properties of RNA: Update of the CHARMM all-atom additive force field for RNA // *J Comput Chem*. 2011. Vol. 32, № 9. P. 1929–1943.
363. Best R.B. et al. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain

- χ_1 and χ_2 Dihedral Angles // J. Chem. Theory Comput. 2012. Vol. 8, № 9. P. 3257–3273.
364. Vanommeslaeghe K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields // J Comput Chem. 2010. Vol. 31, № 4. P. 671–690.
365. Jorgensen W.L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // The Journal of Chemical Physics. 1983. Vol. 79, № 2. P. 926–935.
366. Nuthakki V.K. et al. Synthesis and biological evaluation of indoloquinoline alkaloid cryptolepine and its bromo-derivative as dual cholinesterase inhibitors // Bioorganic Chemistry. 2019. Vol. 90. P. 103062.
367. Tighineanu E., Chiraleu F., Răileanu D. Double cyclisation of phenylglycine-o-carboxylic acids—I // Tetrahedron. 1980. Vol. 36, № 10. P. 1385–1397.
368. Sugasawa T. et al. Aminohaloborane in organic synthesis. 2. Simple synthesis of indoles and 1-acyl-3-indolinones using specific ortho .alpha.-chloroacetylation of anilines // J. Org. Chem. 1979. Vol. 44, № 4. P. 578–586.
369. Robinson M.M., Robison B.L. 7-Azaindole. I. Synthesis and Conversion to 7-Azatryptophan and Other Derivatives // J. Am. Chem. Soc. 1955. Vol. 77, № 2. P. 457–460.
370. Cheng X. et al. 7,7'-Diazaindirubin—A small molecule inhibitor of casein kinase 2 in vitro and in cells // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2014. Vol. 22, № 1. P. 247–255.
371. Desarbre E., Mérour J.Y. Synthesis and reactivity of 1-substituted-3H-pyrrolo[2,3-b] pyridin-3-one // Tetrahedron Letters. 1994. Vol. 35, № 13. P. 1995–1998.