

УДК 547.791.1 + 577.113.3 + 547.455.5 + 578.823

СИНТЕЗ 2-*N*-ЗАМЕЩЕННЫХ-4-ТОЗИЛ-5-ПОЛИФТОРАЛКИЛ-1,2,3-ТРИАЗОЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ ЭПШТЕЙНА-БАРРА

А.С.Канищев, А.П.Гудзь, Ю.Г.Шермолевич, С.Д.Загородняя*, А.В.Головань*, А.О.Курова*, Н.В.Нестерова*

Институт органической химии НАН Украины
02094, г. Киев, ул. Мурманская, 5. E-mail: sherm@ioch.kiev.ua

* Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины

Ключевые слова: 1,2,3-триазолы; *N*-Cl триазолы; фуранозиды; гликалы; винилэтиловый эфир; вирус Эпштейна-Барра

*Разработаны методы синтеза новых 2-*N*-замещенных производных 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов и исследована их противовирусная активность по отношению к вирусу Эпштейна-Барра. Найдены наиболее перспективные для дальнейших исследований соединения.*

SYNTHESIS OF 2-*N*-SUBSTITUTED-4-TOSYL-5-POLYFLUOROALKYL-1,2,3-TRIAZOLES AND STUDY OF THEIR ANTIVIRAL ACTIVITY IN RELATION TO THE EPSHTEIN-BARR VIRUS
O.S.Kanishchev, G.P.Gudz, Yu.G.Shermolovich, S.D.Zagorodnya, A.V.Golovan, A.O.Kurova, N.V.Nesterova

*The methods of synthesis of new 2-*N*-substituted derivatives of 4-tosyl-5-polyfluoroalkyl-1,2,3-triazoles have been developed and their antiviral activity in relation to the Epshtein-Barr virus has been investigated. The most perspective compounds for further research have been found.*

СИНТЕЗ 2-*N*-ЗАМІЩЕНИХ-4-ТОЗИЛ-5-ПОЛІФТОРОАЛКІЛ-1,2,3-ТРИАЗОЛІВ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРРА
О.С.Каніщев, Г.П.Гудзь, Ю.Г.Шермолевич, С.Д.Загородня, А.В.Головань, А.О.Курова, Н.В.Нестерова

*Розроблені методи синтезу нових 2-*N*-заміщених похідних 4-тозил-5-поліфтороалкіл-1,2,3-триазолів і досліджена їх антивірусна активність по відношенню до вірусу Епштейна-Барра. Знайдені найбільш перспективні для подальших досліджень сполуки.*

Ранее в ходе изучения свойств новых типов фторсодержащих гетероциклов – 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов мы обнаружили достаточно высокую активность некоторых их производных по отношению к вирусу Эпштейна-Барра (ВЭБ) [1]. Причем наибольшей активностью среди изученных соединений обладали не только 2-деокси-2-хлор-пиранозилпроизводные 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов **1**, но и соединение **2**, содержащее ациклический заместитель, хотя именно циклические аналоги нуклеозидов проявляют высокую противовирусную активность [2-4].

Представляло интерес выяснение противовирусной активности других производных 1,2,3-триазолов, содержащих у атома азота N2 экзоциклические заместители различной природы. В настоящей работе мы изучили новые возможности использования 1,2,3-триазолов **3a,b** и 2-хлор-

1,2,3-триазолов **4a-c** для синтеза 2-*N*-производных и исследовали их противовирусную активность.

1,2,3-Триазолы **3a,b** реагируют с 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил- β -D-рибофуранозой **5** с образованием фуранозилпроизводных **6a,b**, превращающихся после амонлиза в 2-(β -D-рибофуранозил)-4-тозил-5-трифторметил(дифторметил)-2*H*-1,2,3-триазолы **7a,b**. Взаимодействие осуществляется сплавлением эквимольной смеси реагентов с последующим кратковременным выдерживанием при 150°C в вакууме, не требующем катализа, вероятно, вследствие того, что 1,2,3-триазолы с электроноакцепторными заместителями в 4 и 5 положении кольца являются весьма сильными *NH*-кислотами [5]. Строение соединений **7a,b** подтверждено данными спектров ЯМР ^1H , ^{19}F , в которых значения констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов в положении 2 и 3 фуранового цикла (2.7 Гц)

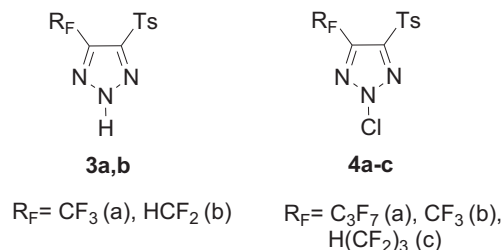
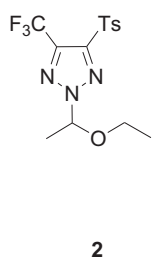
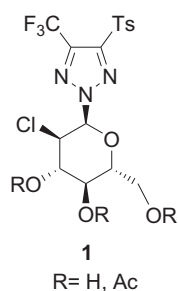


Рис. 1.

Рис. 2

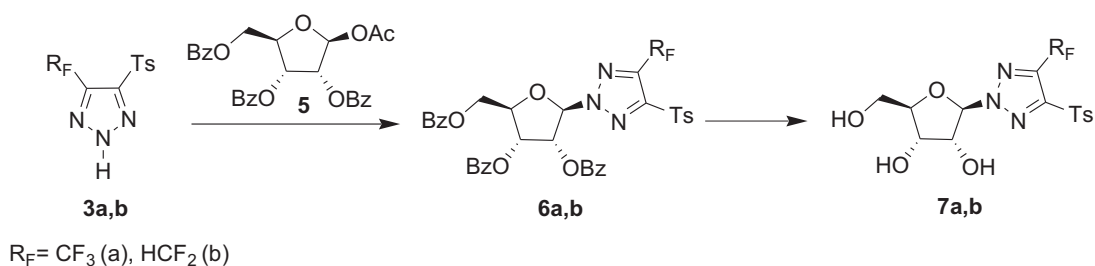


Схема 1

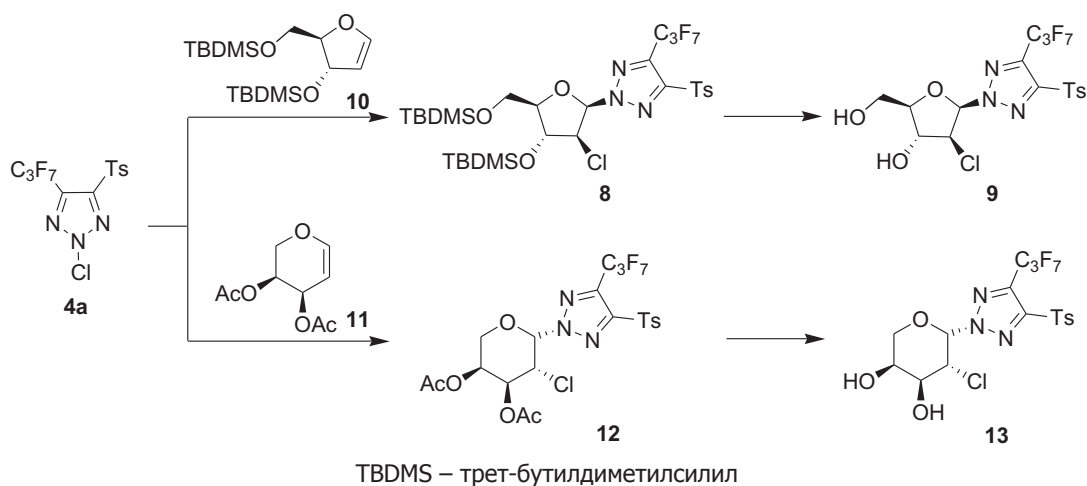


Схема 2

свидетельствуют о транс-расположении триазольного и гидроксильного заместителей [6] (схема 1).

В результате присоединения 2-хлор-1,2,3-триазола **4a** к фураногликалю **10** [7, 8] образуется продукт присоединения **8**, амонлиз которого приводит к хлорсодержащему аналогу соединений **7** – 2-(2-деокси-2-хлор-β-D-арабинофуранозил)-4-тозил-5-гептафторпропил-2H-1,2,3-триазолу **9**. В этом случае расположение заместителей у атомов углерода 1 и 2 фуранового цикла отличается от соединений **7**. КССВ протонов 1'-H и 2'-H составляет 6.4 Гц, что согласно литературным данным [8] соответствует цис-расположению атома хлора и триазольного заместителя. Наряду с β-аномером, спектрами ЯМР ¹H и ¹⁹F фиксируется около 20% продукта, для которого значение этой константы составляет 3.6 Гц (предположительно – α-аномер), а также минорные продукты реакции. Аналогичная цис-конфигурация атома хлора и триазольного заместителя характерна и для продукта присоединения 2-хлор-1,2,3-три-

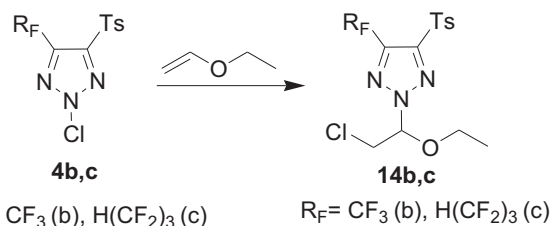


Схема 3

азола **4a** к гликалю **11** [9] – 2-(2-деокси-2-хлор-β-L-арабинопиранозил)-4-тозил-5-гептафторпропил-2H-1,2,3-триазолу **13**. КССВ протонов 1'-H и 2'-H в нем составляет 5.3 Гц (для α-аномера – 9.5 Гц; образуется в количестве 35%), что согласуется с литературными данными [10] для подобных 2-деокси-2-хлор-пиранозилпроизводных (схема 2).

Ранее [11] на примере присоединения 2-хлор-4-тозил-5-гексафторпропил-2H-1,2,3-триазола **4c** к винилэтиловому эфиру нами была показана возможность региоселективного синтеза 2-(2-хлор-

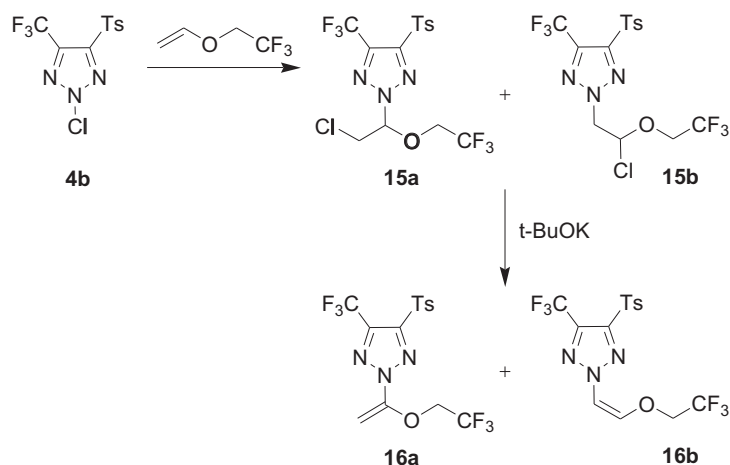


Схема 4

1-этоксипропил)-4-тозил-5-гексафторпропил-2*H*-1,2,3-триазола **14c** (схема 3).

Продукт аналогичного строения – 2-(2-хлор-1-этоксипропил)-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **14b** образуется при реакции винилэтилового эфира с 2-хлор-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазолом **4b**. Однако, при взаимодействии этого же триазола с 2,2,2-трифторэтилвиниловым эфиром оказалось, что наличие в последнем трифторметильного заместителя влияет на региохимию присоединения. Согласно данным ЯМР ^1H и ^{19}F спектроскопии наряду с 2-[2-хлор-1-(2,2,2-трифторэтоксипропил)-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазолом **15a** образуется до 33% изомерного 2-[2-хлор-2-(2,2,2-трифторэтоксипропил)-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазола **15b**. Обработкой смеси изомеров *tert*-бутилатом калия получены продукты дегидрохлорирования – 2-[1-(2,2,2-трифторэтоксипропил)винил]-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **16a** и 2-[2-(2,2,2-трифторэтоксипропил)винил]-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **16b** в виде смеси изомеров в соотношении 4:1 (схема 4).

N-Хлортриазолы **4a,b** могут быть использованы и для синтеза не содержащих хлора соединений. Они региоспецифически реагируют с

диэтиловым эфиром и тетрагидрофураном в присутствии TiCl_4 с образованием α -*N*-триазолилзамещенных простых эфиров **17** и **18a,b**. Подобная реакция 1-хлорбензотриазола с циклическими и ациклическими эфирами, катализируемая кислотами Льюиса, была ранее описана Катрички с сотр. [12]. Отметим, что 2-(1-этоксипропил)-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **17** недавно был получен нами другим методом – присоединением *NH*-триазола **3a** к винилэтиловому эфиру [13] (схема 5).

Новые синтезированные соединения были исследованы на цитотоксичность и наличие антивирусной активности по отношению к вирусу Эпштейна-Барра.

Клинической формой инфицирования ВЭБ является инфекционный мононуклеоз – распространенное среди детей заболевание. Он выступает как агент в возникновении лимфом, карцином и поражении центральной и периферической нервной системы человека [14]. Одним из зарегистрированных препаратов против ВЭБ инфекций является ациклический аналог нуклеозида ганцикловир [9-(1,3-дигидрокси-2-пропокси-метил) гуанин], который при клиническом применении отличается высоким уровнем токсич-

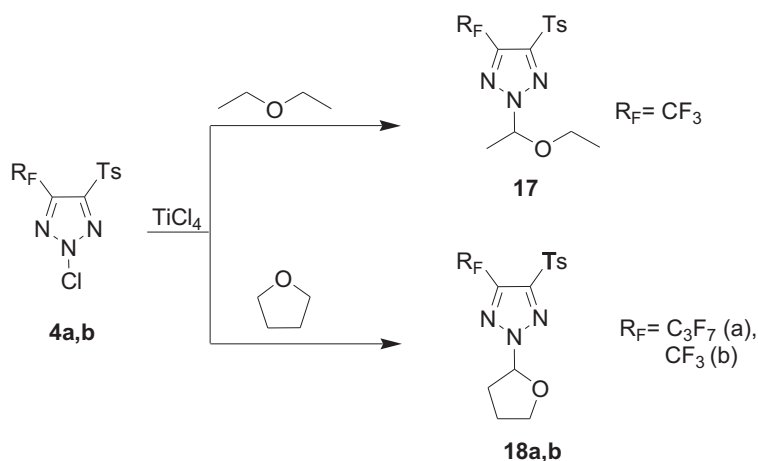


Схема 5

Таблица 1

Дозозависимое действие исследуемых препаратов на жизнеспособность культуры клеток Raji (окрашивание трипановым синим)

Концентрация, мкг/мл	Процент живых клеток при внесении соединений						
	9	13	7a	7b	18b	18a	14b
31.25	88	91	95	96	96	100	94
62.5	84	89	95	94	74	86	86
125	66	88	87	90	72	83	74
250	27	86	90	95	56	0	15
500	0	61	92	92	0	0	9
1000	0	20	66	93	0	0	0

ности [15]. Поэтому поиск новых антигерпетических препаратов остается актуальным.

Цитотоксичность соединений **7a,b**, **9**, **13**, **14b**, **18a,b** изучали с использованием растворов веществ в ДМСО в диапазоне концентраций 1000-16,5 мкг/мл. Мертвые клетки выявляли с использованием 0,4% раствора трипанового синего, поскольку данный краситель имеет свойство проникать сквозь мембрану мертвых клеток, при этом живые остаются интактными к нему. В табл. 1 представлены результаты детекции мертвых клеток при внесении разных концентраций исследуемых веществ.

Как видно из представленной таблицы, наименее токсичным является соединение **7b**, которое даже в концентрации 1000 мкг/мл снижает жизнеспособность клеточной популяции на 7%. Наиболее токсичным оказалось соединение **18a**, которое уже в концентрации 250 мкг/мл вызывает 100% гибели клеточной популяции.

Цитотоксичность анализируемых субстанций также была исследована по уровню активности митохондриальной системы клеток.

В табл. 2 представлены результаты проведенного анализа по исследованию влияния 2-*N*-замещенных 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов на функциональную активность митохондрий.

Установлено значительное снижение функциональной активности митохондрий в лимфобластоидной культуре клеток Raji при внесении разных концентраций исследуемых соединений. Анализируя полученные по двум методам результаты, можно сделать следующие выводы. Хлорсодержащие препараты **7a** и **7b** незначительно снижали жизнеспособность клеток, так как внесение их в концентрациях 500 и 1000 мкг/мл приводило к смерти малого количества клеточной популяции, при этом значительно угнеталась их митохондриальная активность. Соединения **18a** и **18b** в одинаковой степени приводят к гибели клеток и пропорциональному снижению активности митохондрий. Соединение **13** можно отнести к наименее токсичным в данной группе веществ, поскольку при его внесении в концентрации 500 мкг/мл, выявляется менее 50% мертвых

Таблица 2

Результаты анализа исследования влияния 2-*N*-замещенных 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов на функциональную активность митохондрий

Концентрация, мкг/мл	Оптическая плотность при 540 нм						
	9	13	7a	7b	18b	18a	14b
31.25	0.414±0.03	0.418±0.07	0.474±0.04	0.329±0.02	0.421±0.06	0.463±0.09	0.423±0.05
62.5	0.435±0.05	0.369±0.02	0.454±0.01	0.364±0.04	0.427±0.01	0.420±0.04	0.420±0.01
125	0.344±0.02	0.389±0.06	0.375±0.02	0.276±0.04	0.390±0.07	0.330±0.04	0.402±0.05
250	0.189±0.04	0.360±0.04	0.094±0.06	0.114±0.03	0.387±0.01	0.194±0.04	0.394±0.03
500	0.082±0.05	0.245±0.06	0.065±0.07	0.140±0.01	0	0.177±0.07	0.362±0.02
1000	0.075±0.04	0.115±0.05	0.069±0.01	0.130±0.07	0	0.131±0.03	0.210±0.02
Кэф. корр.	-0.85	-0.98	-0.77	-0.72	-0.89	-0.83	-0.98
CC ₅₀	250	780	125	460	400	250	977
Контроль клеток	0.344				0.448		

клеток и более чем 50% активных митохондрий. Показатель CC_{50} в обоих тестах близок и составляет 700 мкг/мл при подсчете с красителем трипановым синим и 780 мкг/мл – в МТТ-тесте.

Скрининговые исследования антивирусной активности соединений проводились в культуре клеток Raji, суперинфицированной ВЭБ, и культуре клеток В95-8, которые являются продуцентом данного вируса. Все вещества вносили в концентрации 50 мкг/мл.

Экспериментальными исследованиями установлено, что вещества **9**, **13**, **7a,b**, **18b**, **14b**, **15a,b**, **16a,b** в концентрации 50 мкг/мл в культуре клеток Raji, суперинфицированной ВЭБ, полностью ингибируют уровень накопления ДНК ВЭБ. Анализ антивирусной активности исследуемых веществ относительно ВЭБ в культуре клеток В95-8 показал, что в исследуемой концентрации соединения **9**, **14b** и **18b** полностью ингибировали вирусную инфекцию, а соединение **7a** – на 20%.

Таким образом, полученные методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) результаты анализа двух культур клеток как суперинфицированных ВЭБ, так и хронически продуцирующих его показали разную активность изученных соединений. Так, в модели острой инфекции (в культуре клеток Raji) почти все соединения имели выраженную анти-ВЭБ активность. В то же время только три соединения из исследованных (**9**, **14b** и **18b**) были активны и в культуре клеток В95-8, которая содержит ДНК-ВЭБ в эписомальной форме, ответственной за латентное состояние вируса. Иными словами, исследование данных соединений показало возможность их действия на вирус как при острой инфекции, так и в латентном состоянии. Дальнейшие исследования и анализ взаимосвязи между строением и антивирусной активностью соединений данного типа позволяют определить наиболее перспективные направления их модификации.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР 1H , ^{13}C записаны на спектрометре Bruker Avance 400 (на частотах 400.13 и 100.62 МГц соответственно) в растворах $CDCl_3$ или $(CD_3)_2CO$ (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры ЯМР ^{19}F записаны на приборе Varian Gemini-200 (188.14 МГц) с C_6F_6 в качестве внутреннего стандарта. Для колоночной хроматографии использовался силикагель марки Merck 60 (70-230 мкм). Для тонкослойной хроматографии использовались пластинки марки Macherey-Nagel; Polygram® Sil G/UV254. Масс-спектры GC/MS получены на приборе Hewlett-Packard 5890/5972 в режиме электронного удара при 70 эВ. Масс-спектры LC/MS – на приборе Agilent 1100 Series, оснащенном диодно-матричным и масс-селективным детек-

тором Agilent LC/MSD SL; метод ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) получены на приборе Micromass Q-TOF; метод ионизации ESI⁺. Данные элементного анализа для всех синтезированных соединений были получены с точностью до 0,5% от теоретически рассчитанных для C, H, N, S и Cl (если присутствовал).

Все реакции проводились в растворителях, очищенных по стандартным методикам.

2-(β-D-Рибофуранозил)-1,2,3-триазолов **7a,b**.

Смесь 2 ммоль 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил-β-D-рибофуранозы **6** и 2 ммоль *NH*-триазола **3a,b** выдерживали при перемешивании на масляной бане, нагретой до 150°C, до образования однородного расплава, а затем при той же температуре и перемешивании выдерживали еще 30 мин в вакууме (10 мм рт. ст.). После охлаждения к коричневому стеклообразному остатку образовавшегося продукта **6a,b** прибавляли 15 мл метанольного раствора NH_3 и перемешивали при комнатной температуре на протяжении 5 ч. Растворитель упаривали в вакууме, кристаллический остаток очищали хроматографированием.

2-(β-D-Рибофуранозил)-4-тозил-5-трифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **7a**.

Бесцветный порошок, выход – 0,4 г (47%). $R_f=0.5$ (этилацетат). Спектр ЯМР 1H ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: 2.46 с (3H, CH_{3Ar}), 3.61 д.д (1H, J=5.0, 12.3 Гц, 5'-H), 3.74 д.д (1H, J=3.7, 12.3 Гц, 5''-H), 4.16 д.д (1H, J=5.0, 8.8 Гц, 4'-H), 4.52 т (1H, J=5.0 Гц, 3'-H), 4.7 д.д (1H, J=2.7, 5.0 Гц 2'-H), 6.08 д (1H, J=2.7 Гц, 1'-H), 7.52 д (2H, J=8.0 Гц, C_6H_4), 7.93 д (J=8.0 Гц, 2H, C_6H_4). Спектр ЯМР ^{19}F ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: – 59.95 с (3F, CF_3). Спектр ЯМР ^{13}C ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: 21.58, 62.51, 71.41, 76.19, 87.77, 98.82, 120.26 кв (J_{CF}=269.5 Гц), 129.31, 131.09, 137.3 кв (J_{CF}=40.5 Гц), 147.14, 148.16. HRMS: найдено – 446.0603 [M+Na], вычислено – 446.0610 (для $C_{15}H_{16}N_3O_6F_3NaS$).

2-(β-D-Рибофуранозил)-4-тозил-5-дифторметил-2*H*-1,2,3-триазол **7b**.

Бесцветный порошок. Выход – 0,42 г (52%). $R_f=0.5$ (этилацетат). Спектр ЯМР 1H ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: 2.45 с (3H, CH_{3Ar}), 3.61 м (1H, 5'-H), 3.74 м (1H, 5''-H), 4.16 м (1H, 4'-H), 4.69 м (1H, 3'-H), 4.87 м (1H, 2'-H), 6.05 д (1H, J=2.7 Гц, 1'-H), 7.38 т (1H, $^2J_{HF}=53.5$, HCF_2), 7.51 д (2H, J=8.0 Гц, C_6H_4), 7.95 д (J=8.0 Гц, 2H, C_6H_4). Спектр ЯМР ^{19}F ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: –116.3 д (3F, J_{HF}=52.9 Гц, HCF_2). Спектр ЯМР ^{13}C ($(CD_3)_2CO$), δ, м.д.: 21.56, 62.74, 71.57, 76.17, 87.72, 98.54, 109.04 т (J_{CF}=238 Гц), 129.06, 131.11, 137.63, 142.10 т (J_{CF}=27.1 Гц), 146.95. HRMS: найдено 428.0701 [M+Na], вычислено 428.0704 (для $C_{15}H_{17}N_3O_6F_2NaS$).

2-(2-Деоокси-2-хлор-β-D-арабинофуранозил)-4-тозил-5-гептафторпропил-2*H*-1,2,3-триазол **9.** К раствору 0,6 г (1,74 ммоль) фураногликоля **10** [7] в 15 мл диоксана прибавляли

0,74 г (1,74 ммоль) 2-хлор-1,2,3-триазола **4a** и перемешивали 6 ч при 20°C. Растворитель упаривали в вакууме, к полученному маслу **8** (0,5 г) прибавляли 3 мл 50%-ной водной плавиковой кислоты в 8 мл ацетонитрила и перемешивали еще 6 ч при 20°C. Реакционную смесь разбавляли 40 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (3×100 мл), раствором NaCl (2×50 мл). Промытую органическую фазу сушили MgSO₄, растворитель упаривали в вакууме, полученный остаток очищали колоночной хроматографией.

Масло. Выход – 0,1 г (30%). R_f=0.5 (этилацетат/гептан, 4:1). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.45 с (3H, CH_{3Ar}), 3.88 д.д (1H, J=4.0, 12.8 Гц, 5'-H), 4.0 д.д (1H, J=2.8, 12.8 Гц, 5''-H), 4.17 д.д.д (1H, J=2.8, 4.0, 8.4 Гц, 4'-H), 4.59 д.д (1H, J=6.4, 9.3 Гц, 2'-H), 4.82 д.д (1H, J=8.4, 9.3 Гц, 3'-H), 6.4 д (J=6.4 Hz, 1H, 1'-H), 7.37 д (2H, J=8.4 Гц, C₆H₄), 7.89 д (2H, J=8.4 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CDCl₃), δ, м.д.: -125.48 м (2F, CF₂), -106.9 м (2F, CF₂), -80.1 м (3F, CF₃). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 21.83, 61.69, 62.12, 73.78, 84.93, 93.44, 108.3 т.кв (J_{CF}=268 Гц, ²J_{CF}=38 Гц), 111.6 т.т (J_{CF}=257 Гц, ²J_{CF}=33 Гц), 117.7 кв.т (J_{CF}=289 Гц, ²J_{CF}=34 Гц), 128.75, 130.27, 135.95, 135.88 т (²J_{CF}=32 Гц), 146.39, 149.41. HRMS: найдено – 564.0227 [M+Na], вычислено – 564.0207 (для C₁₇H₁₅N₃O₅F₇NaSCl).

2-(2-Деокси-2-хлор-β-L-арабинопиранозил)-4-тозил-5-гептафторпропил-2H-1,2,3-триазол 13. К раствору 0,155 г (0,77 ммоль) ди-*O*-ацетил-L-арабиналя **11** [9] в 15 мл диоксана при перемешивании прибавляли 0,33 г (0,77 ммоль) 2-хлор-1,2,3-триазола **4a** и перемешивали 5 ч при 20°C, после чего растворитель упаривали в вакууме. К полученному маслу **12** (0,43 г) прибавляли 5 мл метанольного раствора NH₃ и перемешивали 5 ч при температуре 20°C. Реакционную смесь разбавляли 40 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (3×100 мл), раствором NaCl (2×50 мл). Промытую органическую фазу сушили Na₂SO₄, растворитель упаривали в вакууме, полученный остаток очищали хроматографированием.

Бесцветный порошок. Выход – 0,1 г (25%). R_f=0.55 (этилацетат/гептан, 4:1). Спектр ЯМР ¹H ((CD₃)₂CO), δ, м.д.: 2.48 с (3H, CH_{3Ar}), 3.92 д.д (1H, J=2.8, 12.5 Гц, 5'-H), 4.1 м (1H, 5''-H), 4.45 д.д (J=2.8, 6.9 Гц, 1H, 4'-H), 4.71 д.д (1H, J=5.3, 10.0 Гц, 2'-H), 4.85 м (1H, 3'-H), 6.59 д (1H, J=5.3 Гц, 1'-H), 7.54 д (2H, J=8.0 Гц, C₆H₄), 7.94 д (J=8.0 Гц, 2H, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (EtOAc), δ, м.д.: -125.44 м (2F, CF₂), -106.48 м (2F, CF₂), -80.41 м (3F, CF₃). Спектр ЯМР ¹³C ((CD₃)₂CO), δ, м.д.: 21.63, 58.38, 68.42, 69.36, 92.57, 108.4 т.кв (J_{CF}=268 Гц, ²J_{CF}=38 Гц), 111.6 т.т (J_{CF}=257 Гц, ²J_{CF}=33 Гц), 117.7 кв.т (J_{CF}=289 Гц,

²J_{CF}=34 Гц), 129.5, 131.09, 137.2, 147.32, 150.21. HRMS: найдено 564.0201 [M+Na], вычислено 564.0207 (для C₁₇H₁₅N₃O₅F₇NaSCl).

2-[2-Хлор-1-(2,2,2-трифторэтокси)этил]-4-тозил-5-трифторметил-2H-1,2,3-триазол 15a и 2-[2-хлор-2-(2,2,2-трифторэтокси)этил]-4-тозил-5-трифторметил-2H-1,2,3-триазол 15b. К раствору 0,5 г (1,54 ммоль) *N*-хлортриазола **4b** в 10 мл CHCl₃ при перемешивании при 0°C прибавляли по каплям 0,35 г (2,77 ммоль) трифторэтилвинилового эфира в 1 мл CHCl₃. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 20°C, растворитель упаривали в вакууме, получали твердый остаток в виде смеси продуктов присоединения, разделить которые колоночной хроматографией не удалось.

Бесцветный порошок. Выход – 0,6 г (90%, соотношение изомеров – 2:1). R_f=0.45 (этилацетат/гептан, 1:1). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.45 с (3H, CH_{3Ar}), 2.47* с (3H, CH_{3Ar}), 3.85-4.27 м (8H, CH₂Cl, CH₂O обоих изомеров), 5.9 д.д (1H, J=5.3, 7.6 Гц, CHN), 6.66* д.д (1H, J=5.1, 8.5 Гц, CHN), 7.38 д (2H, J=8.0 Гц, C₆H₄), 7.42* д (2H, J=8.0 Гц, C₆H₄), 7.89* д (2H, J=8.4 Гц, C₆H₄), 7.92 д (2H, J=8.4 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CHCl₃), δ, м.д.: -76.37 с (6F, CF₃CH₂ обоих изомеров), -61.83 с (3F, CF₃C_{het}), -60.96* с (3F, CF₃C_{het}). LC/MS: m/z (%) **15a**: 451 [M⁺] (25), 402 (40), 352 (12), 227 (28), 198 (26), 161 (100), 139 (27), 91 (54); m/z (%) **15b**: 451 [M⁺] (0.1), 280 (0.9), 161 (100), 139 (11), 91 (36).

Дегидрохлорирование смеси изомеров 15a,b. К охлажденному до -5°C раствору 0,45 г (1 ммоль) смеси изомеров **15a,b** (2:1) в 4 мл смеси *t*-BuOH/ТГФ (1:1) прибавляли суспензию 0,125 г (1,12 ммоль) *t*-BuOK в 2 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 6 ч при 20°C, прибавляли 5 мл воды и экстрагировали эфиром (3×10 мл). Органические экстракты объединяли, промывали водой, сушили Na₂SO₄, растворитель упаривали в вакууме. Смесь продуктов дегидрохлорирования очищали кристаллизацией из гексана, в результате чего соединения **16a,b** были выделены в соотношении 4:1 в виде светло-желтого порошка. Выход – 0,133 г (32%).

2-[1-(2,2,2-Трифторэтокси)винил]-4-тозил-5-трифторметил-2H-1,2,3-триазол 16a (мажорный изомер). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.45 с (3H, CH_{3Ar}), 4.39 кв (2H, J=7.9 Гц, CH₂O), 4.6 д (1H, J=5.2 Гц, CH_ACH_B=C), 5.34 д (1H, J=5.2 Гц, CH_ACH_B=C), 7.38 д (2H, J=8.3 Гц, C₆H₄), 7.96 д (2H, J=8.3 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CHCl₃), δ, м.д.: -74.51 т (3F, J=7.5 Гц, CF₃CH₂), -60.98 с (3F, CF₃C_{het}).

2-[2-(2,2,2-Трифторэтокси)винил]-4-тозил-5-трифторметил-2H-1,2,3-триазол 16b (минорный изомер). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.47

* – **15b** (минорный продукт)

с (3H, CH₃Ar), 4.42 кв (2H, J=7.9 Гц, CH₂O), 4.89 д.д (2H, J=5.2, 8.8 Гц, CHN, CHO), 7.38 д (2H, J=8.3 Гц, C₆H₄), 7.88 д (2H, J=8.3 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CHCl₃), δ, м.д.: -74.1 т (3F, J=8.2 Гц, CF₃CH₂), -60.53 с (3F, CF₃C_{het}).

2-(Тетрагідрофуран-2-ил)-1,2,3-триазолы 18a,b. К раствору 2,3 ммоль ТГФ в CH₂Cl₂ (10 мл) прибавляли 0,46 ммоль TiCl₄ (1M раствор в CH₂Cl₂), N-хлортриазол **4a,b** (2.3 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре 7 ч. Реакционную смесь разбавляли эфиром (30 мл), промывали 0,5 M раствором NaOH (30 мл) и водой (2×30 мл), экстрагировали эфиром (3×30 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой и сушили Na₂SO₄. Растворитель упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией.

2-(Тетрагідрофуран-2-ил)-4-тозил-5-гептафторпропил-2H-1,2,3-триазол 18a. Бесцветный порошок. Выход – 0,6 г (56%). Т. пл. – 61-64°C (этилацетат/гексан, 1:1). R_f=0.55. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.05-2.15 м (1H, CH_ACH_BCHN), 2.45 с (3H, CH_{3Ar}), 2.28-2.55 м (3H, CH₂CH₂CHN, CH_ACH_BCHN), 4.08 м (1H, CH_ACH_BO), 4.18 м (1H, CH_ACH_BO), 6.32 д.д (1H, J=2.1, 6.4 Гц, CHN), 7.36 д (2H, J=8.2 Гц, C₆H₄), 7.91 д (2H, J=8.2 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CDCl₃), δ, м.д.: -126.71 м (2F, CF₂), -107.8 м (2F, CF₂), -81.49 м (3F, CF₃). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 21.7, 23.7, 32.1, 70.6, 95.0, 108.4 т.кв (J_{CF}=268 Гц, ²J_{CF}=39 Гц), 111.6 т.т (J_{CF}=256 Гц, ²J_{CF}=32.5 Гц), 117.8 кв.т (J_{CF}=289 Гц, ²J_{CF}=34 Гц), 128.8, 130.0, 135.4 т (²J_{CF}=31.9 Гц), 136.4, 145.9, 148.9. Найдено, %: С 41.6; Н 3.04; N 9.7. C₁₆H₁₄F₇N₃O₃S. Вычислено, %: С 41.65; Н 3.06; N 9.11.

2-(Тетрагідрофуран-2-ил)-4-тозил-5-трифторметил-2H-1,2,3-триазол 18b. Бесцветный порошок. Выход – 0,27 г (32%). Т. пл. – 98-100°C (этилацетат/гексан, 1:1). R_f=0.6. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д.: 2.06-2.14 м (1H, CH_ACH_BCHN), 2.44 с (3H, CH_{3Ar}), 2.31-2.57 м (3H, CH₂CH_ACH_BCHN), 4.07 м (1H, CH_ACH_BO), 4.2 м (1H, CH_ACH_BO), 6.3 д.д (1H, J=2.0, 6.5 Гц, CHN), 7.36 д (2H, J=8.2 Гц, C₆H₄), 7.93 д (2H, J=8.2 Гц, C₆H₄). Спектр ЯМР ¹⁹F (CH₂Cl₂), δ, м.д.: -61.73 с (CF₃). Найдено, %: С 46.73; Н 3.92; N 11.76. C₁₄H₁₄F₃N₃O₃S. Вычислено, %: С 46.54; Н 3.91; N 11.63.

Культуры клеток и вирус

Raji – недифференцированные лимфобластоидные клетки человека В-типа из лимфомы Беркитта, которые содержат геном вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ); В95-8 – лейкоциты обезьян мармазеток, трансформированные ВЭБ и хронически продуцирующие его.

Культуры клеток выращивали на ростовой среде, состоящей из 90% среды RPMI 1640 («Sigma», США), 10% сыворотки эмбриона коровы («Sigma», США) и антибиотиков пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл). Культивирование про-

водили при 37°C в термостате с добавлением 5% CO₂.

ВЭБ выделяли из суспензии лимфобластоидных клеток В95-8 с использованием индуктора – форбол-12-миристан-13-ацетата («Sigma», США), добавление которого проводили согласно инструкции и рекомендаций производителя [16].

Метод определения цитотоксичности

Жизнеспособность лимфобластоидных клеток при действии разных концентраций исследуемых препаратов определяли с использованием красителя трипанового синего («Sigma», США). Клетки окрашивали 0,4% раствором красителя в соотношении с суспензией 1:1 и просчитывали в камере Горяева в световом микроскопе.

Пролиферативную активность лимфобластоидных клеток Raji изучали с использованием МТТ. МТТ – 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиума бромид («Sigma», США) – искусственный субстрат, который используется для идентификации митохондриальной активности клеток [17].

Определение репродукции ВЭБ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ДНК из клеток выделяли с использованием набора «DNA-sorb-B DNA kit» («AmpliSens», Россия). Концентрация ДНК измерялась с использованием биофотометра («Eppendorf», Германия). Выявления ДНК ВЭБ проводили методом ПЦР с использованием набора «AmpliSens® EBV-EPh» («AmpliSens», Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Каждая анализируемая в ПЦР проба содержала 50 нанограмм ДНК.

Продукты амплификации и ДНК-маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва) были проанализированы в 1,7% (w/v) агарозном геле, который содержал 0,01% (v/v) этидиум бромид. Результаты визуализировались в трансиллюминаторе и обрабатывались в программе Gel Imager («DNA-technology», Россия).

Статистическая обработка данных выполнялась согласно стандартным подходам к вычислению статистических ошибок (стандартное отклонение) и изучением корреляции с использованием компьютерной программы Microsoft Excel [17].

Выводы

1. Получены новые производные 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов с циклическими, ациклическими и углеводными заместителями у атома азота N2, исследована их цитотоксичность и антивирусная активность по отношению к вирусу Эпштейна-Барра.

2. Результаты исследований показали, что в модели острой инфекции в культуре клеток Raji почти все соединения способны ингибировать

вирусную инфекцию, часть синтезированных соединений активна и при латентном состоянии вируса.

3. Дальнейший синтез новых N-замещенных 4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов, оцен-

ка их биологической активности, установление взаимосвязи между строением и проявляемой биологической активностью позволят определить наиболее перспективные направления модификации данных соединений.

Литература

1. Kanishev O.S., Gudz G.P., Shermolovich Yu.G. et al. // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2011. – Vol. 30. – P. 768-783.
2. Ölgen S., Chu C.K. // *Z. Naturforsch.* – 2001. – Bd. 56B. – P. 804-811.
3. Alvarez R., Velazquez S., San-Felix A. et al. // *J. Med. Chem.* – 1994. – Vol. 37. – P. 4185-4194.
4. Sanghv Y.S., Bhattacharya B.K., Kini G.D. et al. // *J. Med. Chem.* – 1990. – Vol. 33. – P. 336-344.
5. Lehmkuhl F.A., Witkowski J.T., Robins R.K. // *J. Heterocycl. Chem.* – 1972. – Vol. 9. – P. 1195-1201.
6. Шингарова И.Д., Ярцева И.В., Немерюк М.П. и др. // *ХГС*. – 1984. – №11. – С. 1556-1564.
7. Walker J.A., Chen J.J., Wise D.S., Townsend B.L. // *J. Org. Chem.* – 1996. – Vol. 61. – P. 2219-2221.
8. Watanabe K.A., Tsann-Long Su, Klein R.S. et al. // *J. Med. Chem.* – 1983. – Vol. 26. – P. 152-156.
9. Shull K.B., Zhijun Wu, Koreeda M. // *J. Carbohydrate Chemistry*. – 1996. – Vol. 15 (8). – P. 955-964.
10. Garcia-Muñoz G., Madroño R., Saldaña M.C., Stud M. // *J. Heterocycl. Chem.* – 1971. – Vol. 8. – P. 1031-1035.
11. Бандера Ю.П., Канищев А.С., Тимошенко В.М. и др. // *ХГС*. – 2007. – №9. – С. 1342-1352.
12. Katritzky A.R., Voronkov M.V., Pastor A., Tatham D. // *Heterocycles*. – 1999. – Vol. 51. – P. 1877-1882.
13. Канищев А.С., Тимошенко В.М., Бут С.А. та ін. // *ЖОФХ*. – 2008. – Т. 6, вип. 4 (24). – С. 65-70.
14. Kutok J.L., Wang F. // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2006. – Vol. 1. – P. 375-404.
15. Pagano J.S., Gershburg E. // *J. of Antimicrob. Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 56. – P. 277-281.
16. Нестерова Н.В., Дяченко Н.С. / Тез. докл. межд. науч.-практ. конф. «Новые технологии получения и применения биологически активных веществ». – Изд-во КНЦ Симферополь, 2002. – С. 118-128.
17. Загородня С.Д., Нестерова Н.В. // *Мікроб. журн.* – 2011. – Т. 2 (73). – с. 65-72.
18. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. – К.: Морион, 2001. – 408 с.
19. Secrist J.A., Shortnacy A.T., Montgomery J.A. // *J. Med. Chem.* – 1988. – Vol. 3. – P. 405-410.
20. Libnow S., Wille S., Christiansen A. et al. // *Synthesis*. – 2006. – P. 496-508.

Надійшла до редакції 22.11.2011 р.