



УДК 577.113.3

НУКЛЕОЗИДЫ 1,2,4-ТРИАЗОЛА: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ

© 2013 г. И. Д. Константинова**, М. В. Чудинов**, И. В. Фатеев*, А. В. Матвеев**,
Н. И. Журило**, В. И. Швец**, А. И. Мирошников*

*Институт биоорганической химии РАН (ИБХ РАН), 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Московский государственный университет тонких химических технологий

имени М.В. Ломоносова (МИТХТ им. М.В. Ломоносова), Москва

Поступила в редакцию 22.02.2012 г. Принята к печати 31.07.2012 г.

Определены возможности и ограничения химико-ферментативного способа синтеза новых структурных аналогов противовирусного препарата рибавирина (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид). Описан синтез различных амидов 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты и ее 5-замещенных аналогов – потенциальных субстратов пуридиннуклеозидфосфорилазы. Изучена сравнительная эффективность способов получения таких амидов, а также способы введения функциональных групп в положение С5 гетероциклической системы. Синтезированы новые аналоги рибавирина, содержащие различные заместители в карбоксамидной группе. Разработан биотехнологический способ получения 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбонитрила – интермедиата в синтезе вирамидина – современного лекарственного аналога рибавирина.

Ключевые слова: 1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, рибавирин, вирамидин, реакция трансгликозилирования, нуклеозидфосфорилазы *E. coli*.

DOI: 10.7868/S0132342313010053

ВВЕДЕНИЕ

Постоянно растущий интерес к лекарственным препаратам, созданным на основе модифицированных нуклеозидов, обусловлен качественно новыми возможностями терапии ряда трудноизлечимых вирусных, аутоиммунных заболеваний и опухолевых поражений кроветворной системы человека с их помощью. Введенные в последнее десятилетие в медицинскую практику препараты (Азидотимидин, Неларабин, Кладрибин, Флударабин, Видарабин и др.) официально определены в мировой практике как средства первого выбора при лечении ряда трудноизлечимых заболеваний человека.

Рибавирин (I, 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, Виразол) – модифицированный нуклеозид, действующий в отношении широкого спектра РНК- и ДНК-вирусов. Обладает выраженным лечебным действием при гепатите С, лихорадке Ласса, а также при гриппе А- и В-типов [1–4].

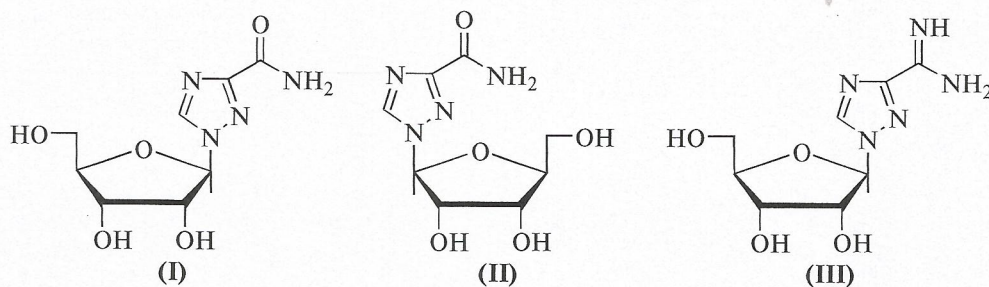
Интерес к Виразолу значительно возрос после установления его лечебной эффективности при респираторно-синтициальной вирусной инфекции, бронхолитах и пневмонии у детей первого года жизни, а также при лечении геморрагических лихорадок с почечным синдромом [5].

Наибольшую популярность в мировой практике для лечения хронического вирусного гепатита С получили комбинированные препараты рекомбинантного интерферона альфа-2b и рибавирина [6, 7]. Этот стандарт терапии предназначен для лечения пациентов, у которых после использования интерферона наблюдался рецидив.

В 2011 г. интерес к рибавирину вновь возрос после одобрения FDA (Food and Drug Administration, США) нового комплексного лекарственного препарата в терапии вирусного гепатита С, состоящего из ингибитора протеиназы телпревира (международное непатентованное название – telaprevir, Vertex Pharmaceuticals) в сочетании с интерфероном и рибавирином. Использование тройной комбинации препаратов оказалось чрезвычайно перспективным при лечении как новых пациентов, так и тех, у кого была выявлена резистентность к двойной системе терапии гепатита [8, 9].

Сокращения: ГЦО – гетероциклическое основание; РСА – рентгеноструктурный анализ; ТКА – 1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид; ТКК – 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновая кислота; СДИ – карбонилдидимидазол; НР – нуклеозидфосфорилаза; РНР – пуридиннуклеозидфосфорилаза.

Автор для связи (+7(495)330-72-47; факс: +7(495)330-73-29; эл. почта: kid1968@yandex.ru).



Формулы 1. Рибавирин и его новые терапевтические аналоги.

Однако рибавирин обладает серьезным побочным действием в отношении кроветворной системы пациентов: вызывает гемолитическую анемию, что вынуждает исследователей осуществлять поиск более безопасных терапевтических средств, обладающих меньшей системной токсичностью. В этом смысле перспективными представляются аналоги рибавирина – левовирин (II) и вирамидин (III) [10, 11]. Левовирин – *L*-энантиомер рибавирина, который обладает подобной рибавирину иммуномодулирующей активностью, но не подвергается фосфорилированию киназами и поэтому не вызывает гемолиза. Вирамидин – пролекарство рибавирина, трансформирующееся в активную форму в печени и не накапливающееся в эритроцитах.

В клинических исследованиях у пациентов с вирусным гепатитом С сравнивалась эффективность и безопасность двух схем противовирусной терапии: пегинтрон + вирамидин и пегинтрон + рибавирин. В первой группе была достигнута меньшая частота вирусологического ответа, чем при традиционном лечении (38% против 52), однако гемолитическая анемия развивалась у пациентов, получавших вирамидин, значительно реже, чем в группе рибавирина – 5% против 24 [12, 13].

Значительный прогресс в получении биологически важных аналогов природных нуклеозидов достигнут благодаря рациональной комбинации химических методов и биохимических превращений. Использование рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз (NP) в качестве биокатализаторов синтеза природных нуклеозидов и их модифици-

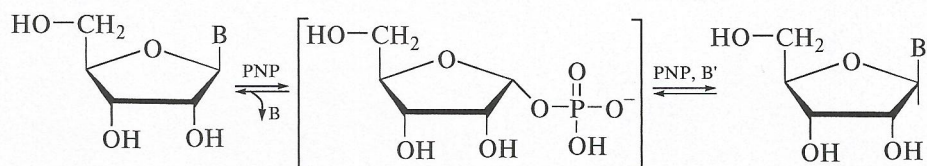
рованных аналогов представляет значительный интерес для создания современных технологических процессов [14–16].

Химико-ферментативный (биотехнологический) подход к синтезу рибавирина и его аналогов вытесняет в настоящее время многостадийные химические процессы, позволяет осуществлять ключевые превращения с высокой эффективностью, регио- и стереоселективностью [14, 15].

Более того, тестирование новых производных 1,2,4-триазола в качестве субстратов пуриноклеозидфосфорилазы (PNP) может выявить структурные особенности гетероциклических оснований, определяющие перспективы осуществления реакции синтеза модифицированных нуклеозидов на их основе в активном центре фермента, что, в свою очередь, расширит представления о механизме функционирования и синтетических возможностях фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основу биотехнологического подхода к синтезу рибавирина составляет реакция *трансгликозилирования* – ферментативная реакция переноса рибозы с природного азотистого основания (гуанина, гипоксантина и т.п.) на 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (ТКА). В отличие от PNP человека, бактериальный фермент способен воспринимать ТКА и его структурные аналоги в качестве субстрата. Механизм реакции трансгликозилирования представлен на схеме 1 [17, 18].



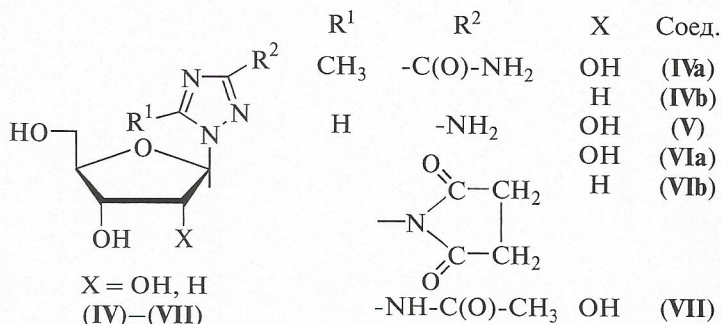
B = природное гетероциклическое основание;
B' = модифицированное гетероциклическое основание.

Схема 1. Механизм реакции трансгликозилирования.

Ферментативный синтез рибавирина осуществляется под действием бактериальных нуклеозидфосфорилаз, содержащихся в целых клетках ряда культур: с использованием клеточных суспензий, лизатов штаммов или генно-инженерных ферментов из *Escherichia coli* (*E. coli*), *Erwinia carotovora*, *Bacillus brevis*, *Brevibacterium fuscum*,

Sarcina lutea, *Arthrobacter oxydans*, *Achromobacter dendriticum* и др. [17–19].

Ранее мы сообщали о возможности синтеза шести аналогов рибавирина (IV)–(VII) [20–22] с помощью генно-инженерной пурипнуклеозидфосфорилазы из штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPH01 (КФ 2.4.2.1) [23, 24].



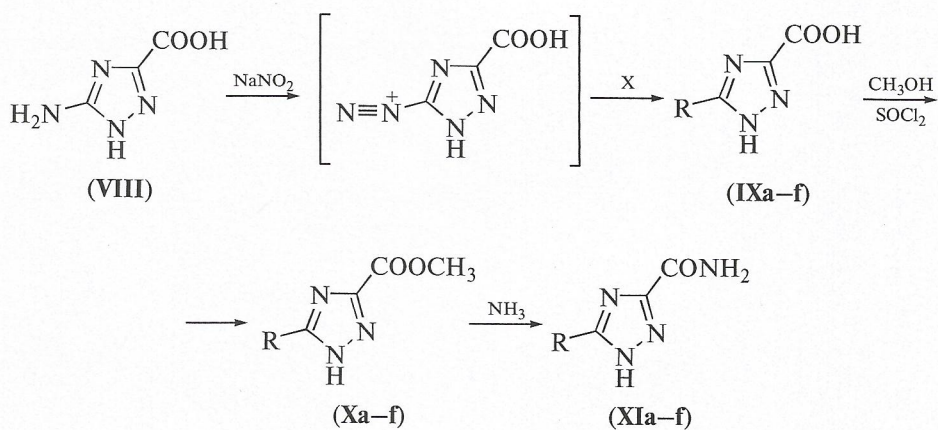
Формулы 2. Аналоги рибавирина.

К сожалению, из этих аналогов только 5-метилрибавирин (IV) обладает сравнимым с рибавирином уровнем противовирусной активности при сопоставимой клеточной токсичности в экспериментах *in vitro* [21].

Нам было интересно изучить возможности и ограничения ферментативного способа синтеза новых аналогов рибавирина, определить требования к структуре гетероциклических оснований – производных 1,2,4-триазола – обеспечивающие нормальное их связывание с активным центром PNP *E. coli* и протекание реакции трансгликозилирования.

Для определения субстратной специфичности PNP существенным было получить большой набор различным образом замещенных производных 1,2,4-триазола, поэтому первой задачей исследования стала разработка способов серийного синтеза соединений двух типов: C5-производных 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамидов и производных, замещенных по его амидной группе.

1*H*-1,2,4-Триазол-3-карбоновая кислота (ТКК) (IXa) и ряд ее замещенных аналогов (IXb)–(IXe) были синтезированы по реакции Зандмейера из 3-амино-1*H*-1,2,4-триазол-5-карбоновой кислоты (VIII) способами, описанными ранее (схема 2) [25–28] см. табл. 1.



a: X = CH₃OH, R = H; b: X = HCl, R = Cl; c: X = HBr, R = Br; d: X = H₂SO₄, R = OH;
e: X = HNO₃, R = NO₂; f: X = CuCN, R = CN.

Схема 2. Синтез ТКА (XIa) и его 5-замещенных аналогов.

Таблица 1. Получение ТКК и 5-замещенных аналогов

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Физико-химические характеристики	Методика синтеза
(IXa)	65	137 (разл.), (137–138 лит. [25])	ИК (суспензия в вазелиновом масле), cm^{-1} : 520, 644, 724, 768, 968, 1112, 1204, 1380, 1656, 1740 (COOH); m/z , 114.0470 [$M + H$] ⁺ (расч. 114.0298); λ_{max} : <200 нм; Чистота 98.8%, $R_t = 2.1$ мин (вариант 2). Найдено, %: С 31.24; Н 2.84; N 36.94. Вычислено, %: С 31.87; Н 2.67; N 37.16.	[25]
(IXb)	42	70 (разл.), (70 лит. [25])	¹³ С-ЯМР (D ₂ O, δ , м.д.): 168.8; 162.0; 148.4. Найдено, %: С 24.06; Н 1.51; N 28.06. Вычислено, %: С 24.43; Н 1.37; N 28.48.	[25]
(IXc)	37	136 (разл.)	¹³ С-ЯМР (D ₂ O, δ , м.д.): 169.1; 162.7; 154.7. Найдено, %: С 18.55; Н 1.17; N 21.64. Вычислено, %: С 18.77; Н 1.05; N 21.89.	[25]*
(IXd)	56	201–203 (разл.), (205 лит. [27])	¹³ С-ЯМР (D ₂ O, δ , м.д.): 159.5; 153.7; 143.8. Найдено, %: С 27.94; Н 2.30; N 32.71. Вычислено, %: С 27.92; Н 2.34; N 32.56. m/z , 128.0080 [$M - H$] ⁻ (расч. 128.0102), 257.0247 [$2M - H$] ⁻ (расч. 257.0270). λ_{max} : 234.4 нм. Чистота 96.2 %, $R_t = 1.92$ мин (вариант 5).	[27]
(IXe)	46	100 (разл.), (100–102 лит. [25])	¹³ С-ЯМР (D ₂ O, δ , м.д.): 167.2; 161.4; 147.2. Найдено, %: С 18.55; Н 3.05; N 29.01. Вычислено, %: С 18.56; Н 3.12; N 28.86 (дигидрат).	[25]
(IXf)	68	98–99 (разл.), (98–100 лит. [28])	¹³ С-ЯМР (D ₂ O, δ , м.д.): 162.3; 137.5; 132.4; 112.2. Найдено, %: С 34.35; Н 1.49; N 40.37. Вычислено, %: С 34.79; Н 1.46; N 40.57.	[28]

* аналогично (IXb), из 3-амино-ТКК и 48%-ой НВг в присутствии CuBr.

Метилловые эфиры (IXa)–(IXe) получали обычным способом (в абсолютном метаноле в присутствии хлористого тионила), далее аммонолизом метиловых эфиров были синтезированы амиды (XIa)–(XIe) (табл. 2 и 3). Этим же способом были синтезированы 5-йод-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновая кислота и ее производные, оказавшиеся неустойчивыми при хранении в течение нескольких дней.

Получить подобным образом метиловый эфир 5-циано-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (Xf) и амид (XI f) в препаративных количествах не удалось (см. схему 2), вероятно, ввиду протекания побочных реакций по нитрильной группе в данных условиях.

Этиловые эфиры 5-алкилзамещенных аналогов ТКК (Xg), (Xh) и соответствующие амиды (XIg), (XIh) были получены с использованием синтетического подхода, предложенного нами ранее для синтеза 5-метил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксиамида [20, 29] (схема 3).

Синтез замещенных амидов ТКК является не вполне тривиальной задачей из-за некоторых свойств исходного соединения. Кислота (IXa) склонна к декарбоксилированию даже при незначительном нагревании и практически не растворима в большинстве органических растворителей. Ввиду этого использовать стандартные протоколы получения амидной связи оказалось невозможным. Большая часть ранее описанных амидных производных была синтезирована аммонолизом метилового или этилового эфира ТКК. Однако этот подход оправдан только в случае некоторых высокоактивных первичных аминов, в частности, метиламина и аммиака. Для получения вторичных аминов и, тем более, ароматических аминов, скорость реакции очень низка. Традиционные подходы к активации карбоксильной группы (хлорангидридный метод, метод активированных эфиров и т.д.) ранее не применялись к ТКК.

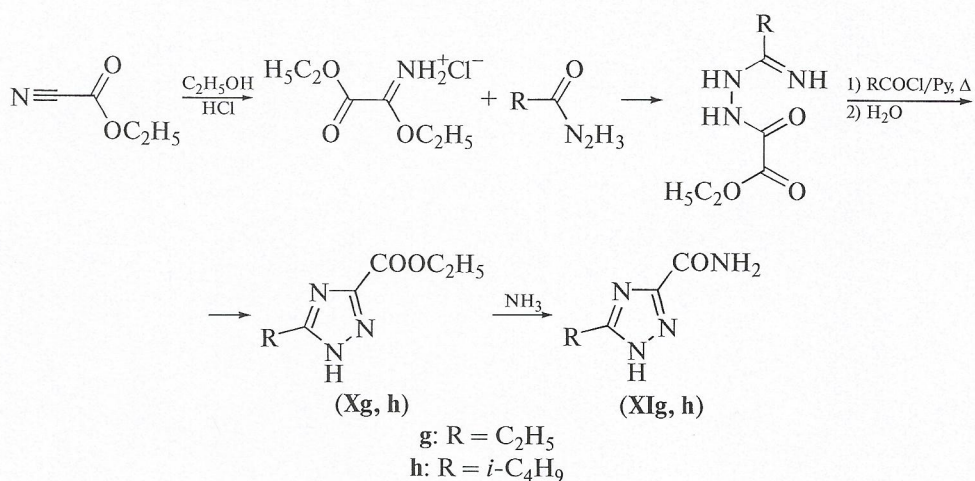


Схема 3. Синтез 5-этил (XIg) и 5-изобутил (XIh) замещенных аналогов ТКА.

Хлорангидрид 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XII) был получен в виде моногидрохлорида при нагревании кислоты в хлористом тиониле с выходом 68%. Эффективно использовать его для получения амидов не удалось из-за побочных реакций: N-ацилирования по положению N1 три-

азольного кольца и сопутствующей полимеризации (выход целевого продукта в реакции с пирролидином составил 14%). Из хлорангидрида реакцией с *n*-нитрофенолятом калия с выходом 96% был получен *n*-нитрофениловый эфир 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIII) (схема 4).

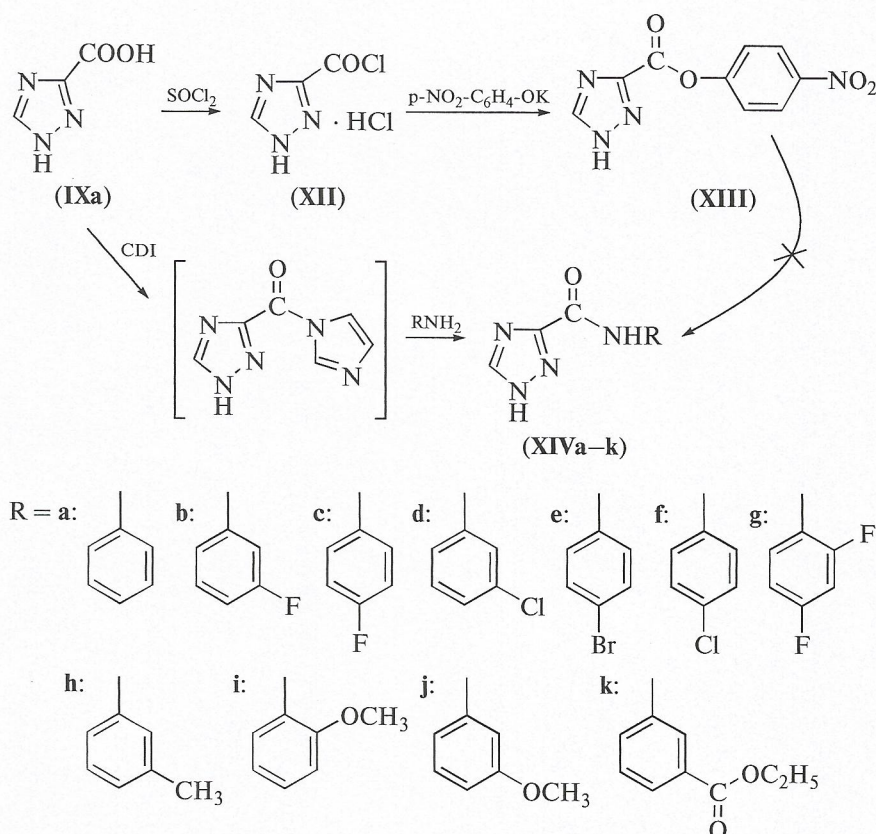


Схема 4. Синтез амидных производных ТКА.

Таблица 2. Получение метиловых эфиров ТКК и ее 5-замещенных аналогов

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Физико-химические характеристики
(Xa)	80	184 (разл.), (184–185 лит. [25])	^1H -ЯМР (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 8.51 (с, 1 H, ArH, 4.33 (с, 3 H, Me) Найдено, %: C 37.71; H 4.06; N 33.10. Вычислено, %: C 37.80; H 3.97; N 33.06.
(Xb)	83	121–122 (разл.), 121 (лит. [25])	^1H -ЯМР (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 4.12 (с, 3 H, Me) Найдено, %: C 30.01; H 2.51; N 25.73. Вычислено, %: C 29.74; H 2.50; N 26.01. λ_{max} : 232.2 нм. Чистота 92.93%, $R_t = 10.61$ мин (вариант б).
(Xc)	77	более 340	^1H -ЯМР (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 4.14 (с, 3 H, Me) Найдено, %: C 23.35; H 1.87; N 20.64. Вычислено, %: C 23.32; H 1.96; N 20.40. λ_{max} : 233.2 нм. Чистота 91.6%, $R_t = 10.7$ мин (вариант б).
(Xd)	73	более 340	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 3.82 (с, 3 H, Me) ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 157.0; 155.3; 137.9; 52.6. Найдено, %: C 33.44; H 3.60; N 29.13. Вычислено, %: C 33.57; H 3.52; N 29.36. m/z , 144.0416 [$M + \text{H}$] $^+$, (расч. 144.0404), 166.0228 [$M + \text{Na}$] $^+$, (расч. 166.0223); λ_{max} 245.0 нм Чистота 98.5%, $R_t = 5.31$ мин (вариант 5).
(Xe)	90	133–134 (разл.), (134 лит. [25])	^1H -ЯМР (ацетон- d_6 , δ , м.д.): 4.04 (с, 3 H, Me) Найдено, %: C 27.81; H 2.46; N 32.73. Вычислено, %: C 27.92; H 2.34; N 32.55.

Взаимодействие его с различными аминами в абсолютном этилацетате давало желаемые амиды с приемлемыми выходами (40–70%), однако довольно сложное хроматографическое выделение не позволило распространить метод на значительное количество различных субстратов. Сходные проблемы возникли при использовании дициклогексилкарбодиимида в качестве конденсирующего агента. Активированное производное 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты оказалось неожиданно устойчивым и, соответственно, малоактивным.

Наиболее эффективным методом получения анилидов оказался имидазолидный. Кислота (IXa) в достаточной степени растворима в абсолютном этилацетате, чтобы образовывать при взаимодействии с CDI *in situ* имидазолид (схема 4). При реакции имидазолида с различными анилинами при 40–50°C с выходами 58–92% получались целевые амиды (XIVa)–(XIVk), которые мы смогли выделить с высокой чистотой (не менее 90% по данным ^1H -ЯМР и ВЭЖХ, см. табл. 4) осаждением из реакционной массы водой.

Данный способ, к сожалению, не удалось распространить на алифатические амиды по двум причинам: хорошая растворимость в воде целевых продуктов и близкая хроматографическая подвижность таких амидов и имидазола – основного побочного продукта реакции. Выделение каждого алифатического амида, полученного имидазолидным методом, требовало индивидуального подхода.

Для серийного получения алифатических амидов ТКК (XVIa)–(XVIi) мы использовали метод смешанных ангидридов (схема 5). Прибавлением к суспензии ТКК в абсолютном пиридине 2 экв. пивалоилхлорида получали *in situ* смешанный ангидрид 1-пивалоил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты с 2-триметилуксусной кислотой (XV), который обрабатывали 1 экв. соответствующего амина. После завершения реакции пивалоильную группу в триазольном кольце отщепляли прибавлением небольшого количества воды, растворители удаляли в вакууме и флеш-хроматографией на силикагеле выделяли целевые амиды (XVI). Выходы составляли от 69 до 88% (см. табл. 5).

Таблица 3. Получение амидов 5-замещенных аналогов ТКК

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Физико-химические характеристики
(XIb)	96	более 340	λ_{max} : 233.4 нм; m/z , 147.0081/149.0050 $[M + H]^+$ (Cl^{35}/Cl^{37} , 3/1), (расч. 147.0068). Найдено, %: C 24.61; H 2.00; N 38.47. Вычислено, %: C 24.59; H 2.06; N 38.23. Чистота 93.7% по данным ВЭЖХ, $R_t = 5.9$ мин (вариант 1).
(XIc)	колич.	более 340	λ_{max} : 233.2 нм; m/z , 190.9558/192.9561 $[M + H]^+$ (Br^{79}/Br^{81} , 1/1), (расч. 190.9563); 212.9401/214.9380 $[M + Na]^+$; (расч. 212.9382). Найдено, %: C 19.05; H 1.67; N 29.28. Вычислено, %: C 18.87; H 1.58; N 29.34. Чистота 97.6% по данным ВЭЖХ, $R_t = 6.11$ мин (вариант 1).
(XIId)	колич.	более 340	1H -ЯМР спектр (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 11.21 (2 H, уш. с., NH триазола); 7.62 (1 H, с, CONH); 7.40 (1 H, с, CONH). ^{15}N -ЯМР спектр (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 100.7 (CONH $_2$). λ_{max} : 204.4, 245.8 нм. m/z , 129.0423 $[M + H]^+$, (расч. 129.0407), 151.0240 $[M + Na]^+$, (расч. 151.0226). Найдено, %: C 28.01; H 3.16; N 44.10. Вычислено, %: C 28.13; H 3.15; N 43.74. Чистота 71.5% по данным ВЭЖХ, $R_t = 2.1$ мин (вариант 5).
(XIe)	84*	более 340	λ_{max} : 218.2, 282.4 нм. m/z , 156.0124 $[M - H]^-$ (расч. 156.0163); 113.0069 $[M - CONH - H]^-$ (расч. 113.0105) Найдено, %: C 22.81; H 2.00; N 44.16. Вычислено, %: C 22.94; H 1.92; N 44.58. Чистота 93.36% по данным ВЭЖХ, $R_t = 4.4$ мин (вариант 1).

* После кристаллизации из этанола.

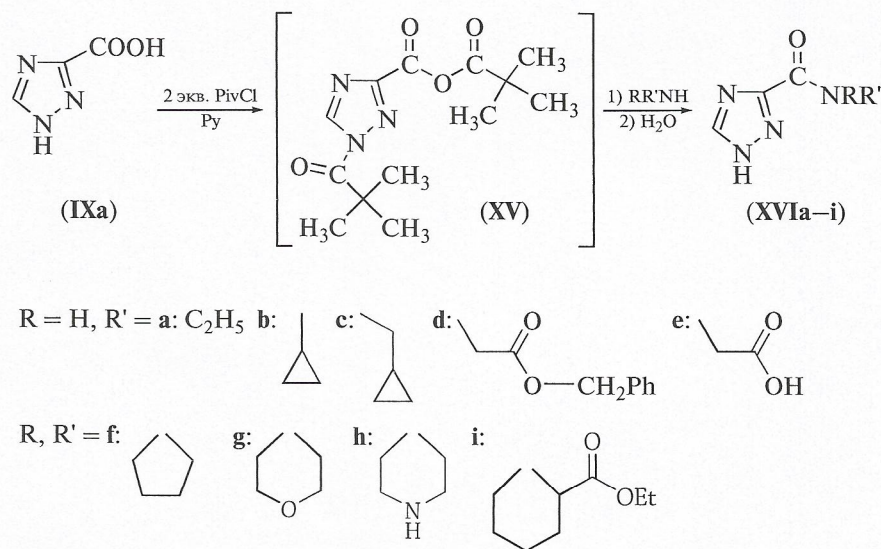


Схема 5. Синтез алифатических амидов ТКК.

Амидное производное ТКА с глицином (XVIe) было получено из соединения (XVIId) отщеплением бензильной группы водородом на палладиевом катализаторе.

N-Метиламид 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XVII) был синтезирован реакцией мети-

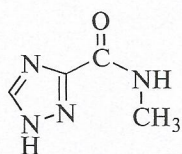
лового эфира ТКК (Xa) с избытком метиламина в метаноле.

Соединение (XVIII) получали по ранее описанной методике [30] дегидратацией ТКА трифторуксусным ангидридом в системе диоксапиридин с выходом 60%. 1*H*-1,2,4-Триазол-3-карбонитрил (XVIII), синтезированный из ТКА

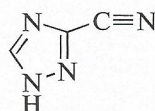
Таблица 4. Получение анилидов 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Физико-химические характеристики
(XIVa)	92	250	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 6.94 (1 H, м, PhH); 7.26 (2 H, м, PhH); 7.48 (2 H, м, PhH); 7.62 (1 H, с, NH); 9.13 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 205, 255 нм. Чистота 88.7%, $R_t = 13.5$ мин (вариант 4).
(XIVb)	58	185	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 6.79 (1 H, м, PhH); 7.12 (1 H, м, PhH); 7.30 (1 H, м, PhH); 7.47 (1 H, м, PhH); 7.86 (1 H, с, NH); 8.99 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 255.0 нм. Чистота 90.3% по данным ВЭЖХ, $R_t = 16.58$ мин (вариант 4).
(XIVc)	81	234	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 7.10 (2 H, м, PhH); 7.44 (2 H, м, PhH); 8.67 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 262.2 нм. Чистота 98.91% по данным ВЭЖХ, $R_t = 14.87$ мин (вариант 4).
(XIVd)	80	240	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 7.02 (1 H, м, PhH); 7.27 (2 H, м, PhH); 7.67 (1 H, м, PhH); 8.95 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 259.1 нм. Чистота 94.8% по данным ВЭЖХ, $R_t = 18.90$ мин (вариант 4).
(XIVe)	75	более 250	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 7.45 (4 H, м, PhH); 8.26 (1 H, с, NH); 9.72 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 249.0 нм. Чистота 99.7% по данным ВЭЖХ, $R_t = 19.42$ мин (вариант 4).
(XIVf)	86	более 250	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 7.32 (2 H, м, PhH); 7.46 (2 H, м, PhH); 8.83 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 243.2 нм. Чистота 98.07% по данным ВЭЖХ, $R_t = 18.54$ мин (вариант 4).
(XIVg)	67	215	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 6.98 (1 H, м, PhH); 7.24 (1 H, м, PhH); 8.03 (1 H, м, PhH); 8.85 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 261, 278 нм. Чистота 95.9% по данным ВЭЖХ, $R_t = 16.37$ мин (вариант 4).
(XIVh)	68	218	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 2.26 (3 H, с, CH ₃); 6.77 (1 H, м, PhH); 7.13 (1 H, м, PhH); 7.19 (1 H, м, PhH); 7.29 (1 H, м, PhH); 8.53 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 264.3 нм. Чистота 98.4% по данным ВЭЖХ, $R_t = 16.15$ мин (вариант 3).
(XIVi)	70	184	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 3.85 (3 H, с, OCH ₃); 6.93 (3 H, м, PhH); 8.07 (1 H, м, PhH); 8.86 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 262.0, 292.0 нм. Чистота 93.4% по данным ВЭЖХ, $R_t = 15.8$ мин (вариант 4).
(XIVj)	83	179	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 3.72 (3 H, с, OCH ₃); 6.54 (1 H, м, PhH); 7.91 (1 H, м, PhH); 7.16 (2 H, м, PhH); 8.63 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 262.0, 283.1 нм. Чистота 91.5% по данным ВЭЖХ, $R_t = 14.46$ мин (вариант 4).
(XIVk)	81	175	^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 1.32 (3 H, т, J7, OCH ₂ CH ₃); 4.31 (2 H, кв, J7, OCH ₂ CH ₃); 7.42 (1 H, м, PhH); 7.57 (1 H, м, PhH); 7.66 (1 H, м, PhH); 8.15 (1 H, с, PhH); 8.96 (1 H, с, ArH). λ_{max} : 248.0 нм. Чистота 98.17% по данным ВЭЖХ, $R_t = 17.91$ мин (вариант 4).

(XIa), может быть легко превращен в другие производные 1,2,4-триазола или непосредственно использован в химическом синтезе рибавирина и вирамидина.



(XVII)



(XVIII)

Формулы 3. Гетероциклические основания.

На втором этапе экспериментальных работ изучались субстратно-специфические свойства синтезированных соединений по отношению к PNP *E. coli*.

При изучении реакции трансгликозилирования с участием новых оснований обычно ожидают три возможных результата: тестируемое соединение окажется ингибитором PNP, субстратом PNP или ни ингибитором, ни субстратом фермента.

Стандартные реакционные смеси содержали: контрольная – природный нуклеозид инозин, те-

Таблица 5. Полученные алифатические амиды 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты

Соединение	Выход, %	$T_{пл}$, °C	Физико-химические характеристики
(XVIa)	71	181–185	^1H -ЯМР*: 8.65 (1 H, уш. с, ArH); 3.25 (2 H, к, J7, NCH ₂ CH ₃); 1.08 (3 H, т, J7, NCH ₂ CH ₃); m/z , 141.0774 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 141.0771); 163.0594 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 163.0590); λ_{max} : 226.2 нм; чистота 95.26% по данным ВЭЖХ, $R_t = 4.8$ мин (вариант 2).
(XVIb)	82	200–206	^1H -ЯМР: 8.28 (1 H, уш. с, ArH); 2.82 (1 H, м, цикло-Pr); 0.63 (4 H, м, цикло-Pr); m/z , 153.0780 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 153.0771); 175.0590 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 175.0590); λ_{max} : 226.6 нм; чистота 94.9% по данным ВЭЖХ, $R_t = 5.2$ мин (вариант 2).
(XVIc)	88	200–204	^1H -ЯМР: 8.66 (1 H, уш. с, ArH); 3.09 (2 H, м, NCH ₂); 1.03 (1 H, м, цикло-Pr); 0.38 и 0.22 (4 H, 2 м, цикло-Pr); m/z , 167.0932 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 167.0927); 189.0750 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 189.0747); λ_{max} (нм): 230.2; чистота 98.2% по данным ВЭЖХ, $R_t = 8.51$ мин (вариант 2).
(XVI d)	52	204–206	^1H -ЯМР: 8.40 (1 H, уш.с, ArH); 7.37 (5 H, м, Ph); 5.20 (2 H, с, PhCH ₂); 4.25 (2 H, д, J 6.1, N-CH ₂); m/z , 261.0998 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 261.0982); λ_{max} (нм): 232.2; чистота 90.6% по данным ВЭЖХ, $R_t = 10.18$ мин (вариант 4).
(XVIe)	84	214–216 с разл.	^1H -ЯМР: 8.51 (1 H, с, ArH); 4.15 (2 H, д, J 6.1, N-CH ₂); m/z : 171.0528 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 171.0518); λ_{max} : 235.4 нм; чистота 99.47% по данным ВЭЖХ, $R_t = 3.98$ мин (вариант 2).
(XVI f)	80	170–174	^1H -ЯМР (D ₂ O): 8.44 (1 H, с, ArH); 3.70 и 3.53 (4 H, 2 м, β-CH ₂ пирролидин); 1.88 (4 H, м, α-CH ₂ пирролидин); m/z , 167.0929 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 167.0927); 189.0748 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 189.0747); λ_{max} : 235.6 нм; чистота 97.2% по данным ВЭЖХ, $R_t = 7.9$ мин (вариант 2).
(XVI g)	74	189–193	^1H -ЯМР (D ₂ O): 8.53 (1 H, с, ArH); 3.85–3.68 (8 H, м, морфолин); m/z , 183.0873 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 183.0877); 205.0692 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 205.0696); λ_{max} : 231.2 нм; чистота 94.2% по данным ВЭЖХ, $R_t = 4.96$ мин (вариант 2).
(XVI h)	43	255 (возг.)	^1H -ЯМР: 14.66 (1 H, уш. с, NHCH ₂); 8.52 (1 H, с, C5-H); 3.87, 3.19 (8 H, 2 м, NCH ₂ CH ₂ NH); m/z , 182.1031 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 182.1036); λ_{max} : 235.2 нм; чистота 97.75% по данным ВЭЖХ, $R_t = 2.0$ мин (вариант 1).
(XVI i)	69	132–136	** ^1H -ЯМР (D ₂ O): 8.56 и 8.51 (1 H, 2 с, ArH); 5.32 и 5.16 (1 H, м, α-CHCOOEt); 4.44; 3.98; 3.25; 2.95; 2.36–2.23; 1.80–1.35 (8 H, 6 м, CH ₂); 4.27 и 4.22 (2 H, 2 к, J 7 Гц, OCH ₂ CH ₃); 1.28 и 1.23 (3 H, 2 т, J 7, OCH ₂ CH ₃); m/z , 253.1297 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 253.1295); 275.1109 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 275.1115); λ_{max} : 229.4 нм; чистота 93.9% по данным ВЭЖХ, $R_t = 13.02$ мин (вариант 3).
(XVII)	73	238–240	^1H -ЯМР: 8.50 (1 H, с, ArH); 4.24 (3 H, д, J 6, N-Me); m/z : 127.0625 [$M + \text{H}$] ⁺ (расч. 127.0620), 149.0442 [$M + \text{Na}$] ⁺ (расч. 149.0434); λ_{max} : 233.6 нм; чистота 100% по данным ВЭЖХ, $R_t = 4.2$ мин (вариант 2).

* ЯМР регистрировали в DMSO-*d*₆, если не указано особо.

** В спектре соединения (XVII) наблюдается удвоение всех сигналов, ввиду затрудненного вращения относительно связи C(O)-N<.

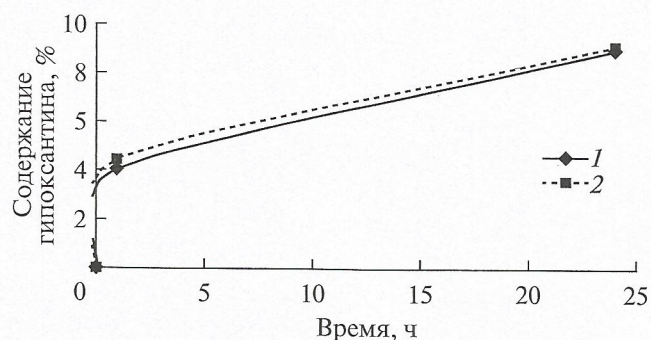


Рис. 1. Фосфорилиз инозина в отсутствие (1, контроль) и в присутствии амида 5-этил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIg) (2).

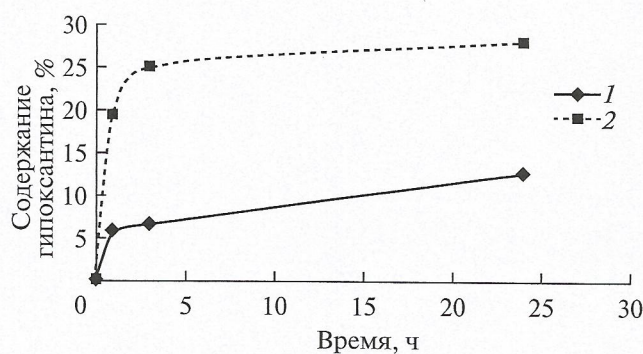


Рис. 2. Фосфорилиз инозина в отсутствие (1, контроль) и в присутствии бензинового эфира *N*-(1*H*-1,2,4-триазол-3-ил-карбонил)глицина (XVIId) (2).

совая — модифицированное гетероциклическое основание и инозин в мольном соотношении 1 : 2. В каждую реакционную смесь добавляли по 2 ед. акт. PNP на ммоль субстрата (основания). Ферментативные реакции проводили в 2 мМ KH_2PO_4 -буфере, pH 7.0 при 55°C. Время проведения процесса — до 5 сут. Пробы отбирали через 1 ч и далее 1 раз в сутки. Степень конверсии исходных соединений контролировали с помощью ВЭЖХ.

Заключение о субстратной специфичности аналогов 1,2,4-триазола делали на основе сравнения количества гипоксантина (продукта фосфорилиза инозина) в контрольной и тестовой смесях, а также по появлению в тестовой реакционной смеси новых нуклеозидов (по данным ВЭЖХ и масс-спектрометрии).

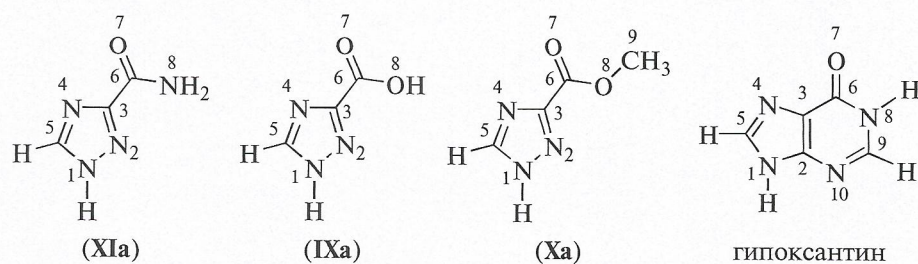
Одинаковое количество гипоксантина в контрольной и тестовой (содержащей модифицированное основание) смесях свидетельствует о том,

что тестируемое основание не является ни субстратом, ни ингибитором нуклеозидфосфорилаз. Графически этот процесс представлен на рис. 1. В качестве примера приведены данные реакции, содержащей амид 5-этил-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIg).

Если в тестовой реакции скорость фосфорилиза природного нуклеозида ниже, чем в контрольной, или фосфорилиз в присутствии модифицированного основания вообще не проходит, значит тестируемое основание — ингибитор PNP. К сожалению, среди всех синтезированных нами гетероциклических оснований (ГЦО) не было обнаружено ни одного ингибитора PNP.

В случае, когда модифицированное основание является субстратом PNP, в смеси появляются новые соединения, кроме того, скорость образования гипоксантина в тестовой реакции выше, чем в контрольной, что говорит о реализации сопря-

Таблица 6. Данные расчетов электронных структур исследуемых гетероциклов и гипоксантина (*ab initio*, 6-31G**, *Hyper Chem v.8.0.6*)*



Соединение	Заряды			
	N1	N4	H-N1	O7
ТКА (XIa)	-0.422	-0.538	0.342	-0.579
ТКК (IXa)	-0.421	-0.537	0.344	-0.535
(Xa)	-0.422	-0.538	0.343	-0.550
Гипоксантин	-0.724	-0.520	0.334	-0.586

* Полные данные расчетов могут быть предоставлены авторами по запросу.

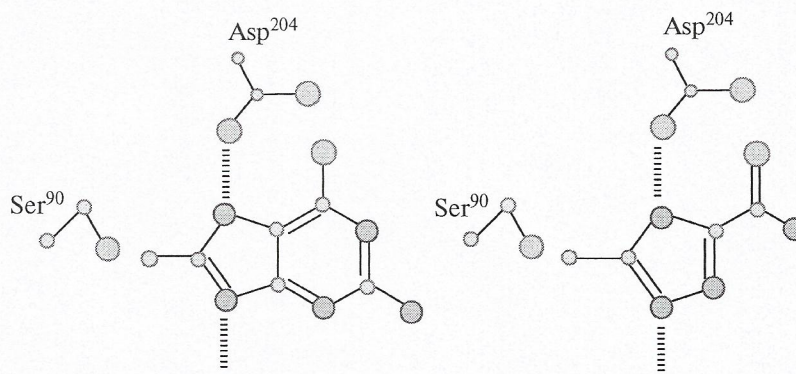


Рис. 3. Модель связывания 8-метилгуанина (слева) и 5-метил-ТКА (справа) в активном центре PNP *E. coli*.

женного процесса — переноса получившегося α -*D*-рибозилфосфата на модифицированное основание-акцептор. Графически этот процесс представлен на рис. 2. В качестве примера использовали реакцию, содержащую гетероциклическое основание (XVIId).

Результаты серии проведенных экспериментов показали, что для взаимодействия 1,2,4-триазольных оснований с активным центром фермента необходимо присутствие в заместителе в С3-положении гетероциклического основания атома азота (амидной или нитрильной группы): ТКК (IXa) и ее метиловый эфир (Xa) не являются субстратами PNP.

Мы провели серию расчетов электронных структур (*ab initio*; *6-31G***, *Hyper Chem v.8.0.6*) исследуемых гетероциклов и гипоксантина (как стандарта сравнения). Анализ приведенных в табл. 6 данных позволяет предположить, что субстратные свойства гипоксантина определяются комбинацией электронных свойств N1- и O7-атомов. Этот фактор присутствует в молекуле ТКА, но не у ТКК и ее метилового эфира, что и может объяснить отсутствие у последних субстратных свойств.

Ни одно из синтезированных 5-замещенных производных триазола (IXb–h)–(XIb–h) не являются субстратами для PNP. Введение объемных заместителей в 5-положение ТКА (больших по объему, чем метил) приводит к возникновению стерических затруднений при связывании основания с активным центром фермента (соединения XIg–h). Тот факт, что 5-хлор- (XIb) и 5-бром-производное (XIc) ТКА не являются субстратами для PNP, хотя 5-метил-ТКА таковым является, согласуется с литературными данными, приведенными для модифицированных пуриновых оснований. Данные рентгеноструктурных анализов (РСА) дают основание предполагать, что в активном сайте фермента 1- β -*D*-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид может позиционироват-

ся так, что пятое положение триазольного кольца находится там же, где обычно находится восьмое положение пурина (рис. 3) [31].

Исследования субстратной специфичности С8-замещенных гуанозинов [32] показали, что наличие в 8-положении пурина метильной или аминогруппы хоть в целом и снижает их эффективность взаимодействия с ферментом по сравнению с самим гуанозином, но они все равно остаются достаточно хорошими субстратами. Наличие же по восьмому положению атомов хлора или брома делает практически невозможным взаимодействие основания с активным центром фермента.

Для оценки наиболее энергетически выгодных таутомеров 1,2,4-триазола мы использовали *ab initio*-метод оптимизации геометрии соединенной серии (XI). Расчеты показали, что для 5-гидрокситриазолкарбоксамид (XIId) термодинамически стабильным является таутомер N^1, N^4 -дигидро-5-кето-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рис. 4), что может объяснить отсутствие субстратных свойств этого соединения в силу невозможности образования водородной связи между N^4 -атомом основания и Asp²⁰⁴ PNP *E. coli*, т.к. связывающееся с активным центром гетероциклическое основание должно иметь непротонированный атом N4 (или N7 в случае пуринового основания).

Аналогичная ситуация складывается с анилидными производными (XIVa–k). Введение ароматических заместителей в карбоксамидную группу ТКА препятствует взаимодействию ГЦО с активным центром PNP *E. coli*. По-видимому, ароматическое фенильное кольцо “мешает” гидрофобному неспецифическому π - π -взаимодействию Phe¹⁵⁹ и Tyr¹⁶⁰ с ГЦО. Однако, если объемный ароматический заместитель “отодвинуть” от триазола введением глицинового спейсера (см. соед. XVIId), то такое гетерооснование становится отличным субстратом PNP.

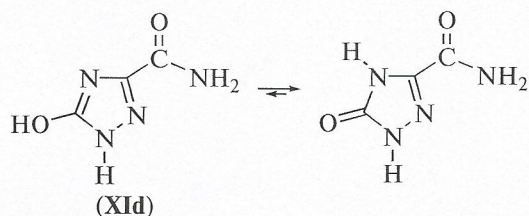


Рис. 4. Таутомерные формы 5-гидрокси-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамиды (XId).

К сожалению, литературных данных по РСА комплекса PNP *E. coli* с каким-либо аналогом триазола пока нет. На сегодняшний день получены данные РСА для активного центра PNP *E. coli* с ингибитором формицином [17]. Так ориентацию гетероциклического основания на активном центре фермента обеспечивают водородные связи между его N^7 -атомом, C6-амино- или гидроксигруппами и остатком Asp²⁰⁴. По нашим данным, должны еще существовать и другие водородные связи между атомом азота заместителя при C3-атоме 1,2,4-триазола и аминокислотами активного центра фермента: если бы взаимодей-

ствие ограничивалось только Asp²⁰⁴, то тогда ТКК (IXa) была бы хорошим субстратом (рис. 5), что не наблюдается в наших экспериментах. Также маловероятно, что одна аминокислота Asp²⁰⁴ “дотягивается” как до N^4 -атома триазола, так и до атома азота карбонитрильной группы гетероцикла (XVIII) или пиперидинильного заместителя (XVIIh).

Среди замещенных амидных производных ТКА хорошими субстратами оказались алифатические и циклические *N*-алкилтриазолкарбоксамиды (XVIa)–(XVIIi) со степенью конверсии в соответствующие нуклеозиды до 99% (табл. 6). Сродство субстрата с активным центром фермента (скорость синтеза новых нуклеозидов) напрямую коррелирует со скоростью образования гипоксантина в тестовой реакционной смеси: графически экспериментальные данные для некоторых производных приведены на рис. 6. Из амидов (XVIa–i) самым хорошим субстратом оказалось пирролидиновое производное ТКА (XVIif).

Удивительным также оказался тот факт, что глицинсодержащее основание (XVIe) стало акцептором рибозы на активном центре фермента, пусть даже с невысоким процентом конверсии в нуклеозид – 17% (схема 6, табл. 7).

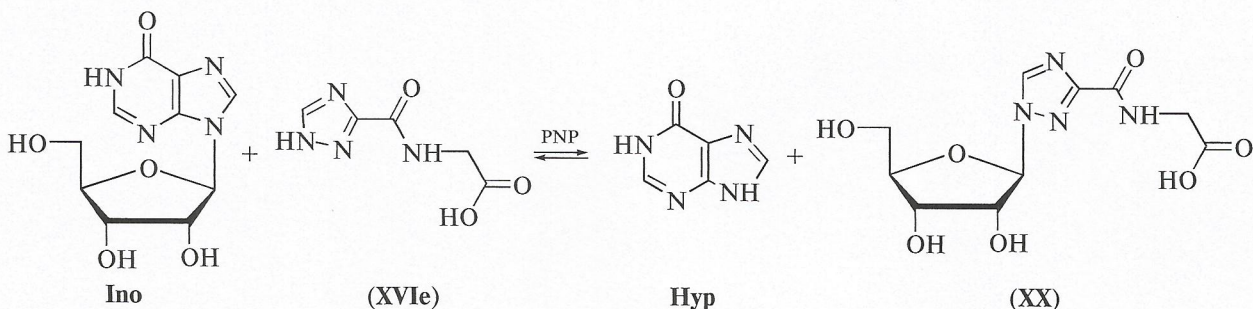


Схема 6. Синтез рибозида (XX).

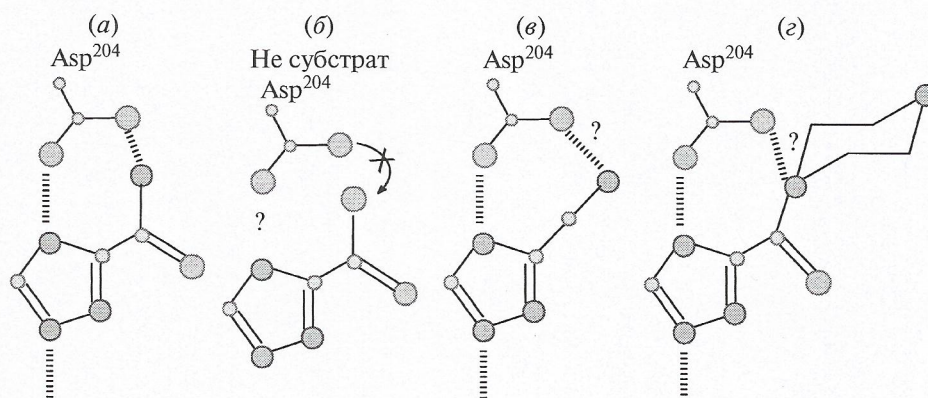
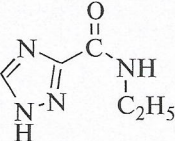
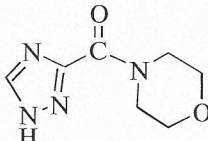
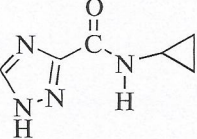
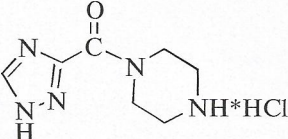
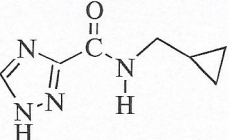
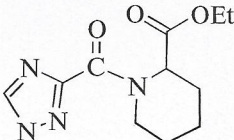
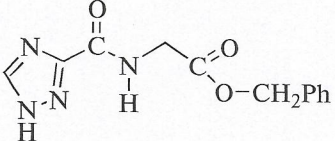
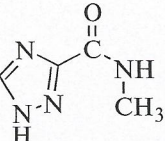
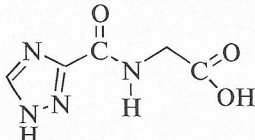
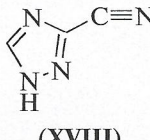
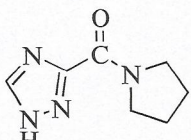


Рис. 5. Предполагаемая модель связывания ТКА (а), ТКК (IXa) (b) 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбонитрила (XVIII) (c) и 3-карбокспиперазинил-1*H*-1,2,4-триазола (XVIIh) (d) на активном центре PNP *E. coli*.

Таблица 7. Субстраты PNP*

Гетероциклическое основание	Отношение нуклеозид/основание	Гетероциклическое основание	Отношение нуклеозид/основание
 (XVIa)	95 : 5	 (XVIg)	99 : 1
 (XVIb)	97 : 3	 (XVIh)	70 : 30
 (XVIc)	86 : 14	 (XVIi)	91 : 9
 (XVI d)	91 : 9	 (XVII)	86 : 14
 (XVI e)	17 : 83	 (XVIII)	45 : 55
 (XVI f)	99 : 1		

* Приведено отношение: целевой нуклеозид/ГЦО по данным ВЭЖХ-анализа конечной смеси ферментативной реакции.

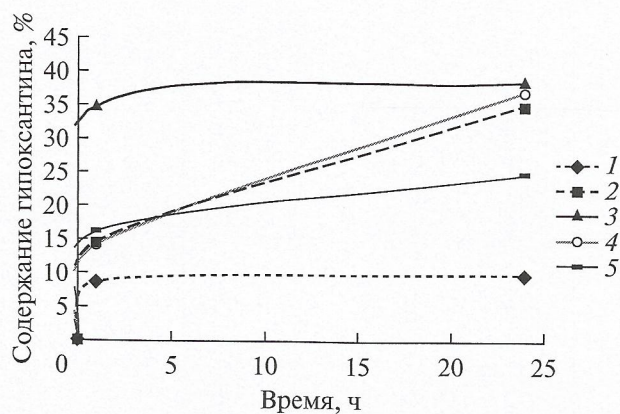


Рис. 6. Фосфорилиз инозина в отсутствие (1, контроль) и в присутствии N-замещенных оснований 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XVIa) (2), (XVIb) (3), (XVIc) (4) и (XVIe) (5).

Скорее всего, объемная, отрицательно заряженная карбоксильная группа, расположенная в С3-положении триазольного кольца ТКК (IXa) препятствует ее связыванию с активным центром

фермента. В случае основания (XVIe) карбоксильная группа "удалена" от триазольного кольца посредством "спейсерной" группы, что приводит к появлению у ГЦО субстратных свойств.

Превращение карбоксильной группы основания (XVIe) в бензилоксикарбонильную в ГЦО (XVIId) еще в большей степени улучшило ситуацию: конверсия основания (XVIId) в рибозид (XXI) за сутки составила 91%. Однако, в реакционной смеси были обнаружены еще 2 соединения, которые в дальнейшем по величине времени удерживания на ВЭЖХ (рис. 7) и результатам масс-спектрометрического анализа смеси (табл. 8) были идентифицированы как соединения (XVIe) и (XX) (схема 7). Оказалось, что в выбранных условиях (pH 7.0 и температура 50°C) происходит гидролиз бензильной защиты с карбоксильного остатка (XVIId). Причем содержание рибозида (XX) в реакционной смеси составило 24% (рис. 7), т.е. эффективность ферментативного процесса синтеза (XX) была в 2 раза выше, нежели по схеме 6. Таким образом, варьируя pH реакционной смеси, можно синтезировать нуклеозид (XX) по "альтернативному" пути с количественным выходом.

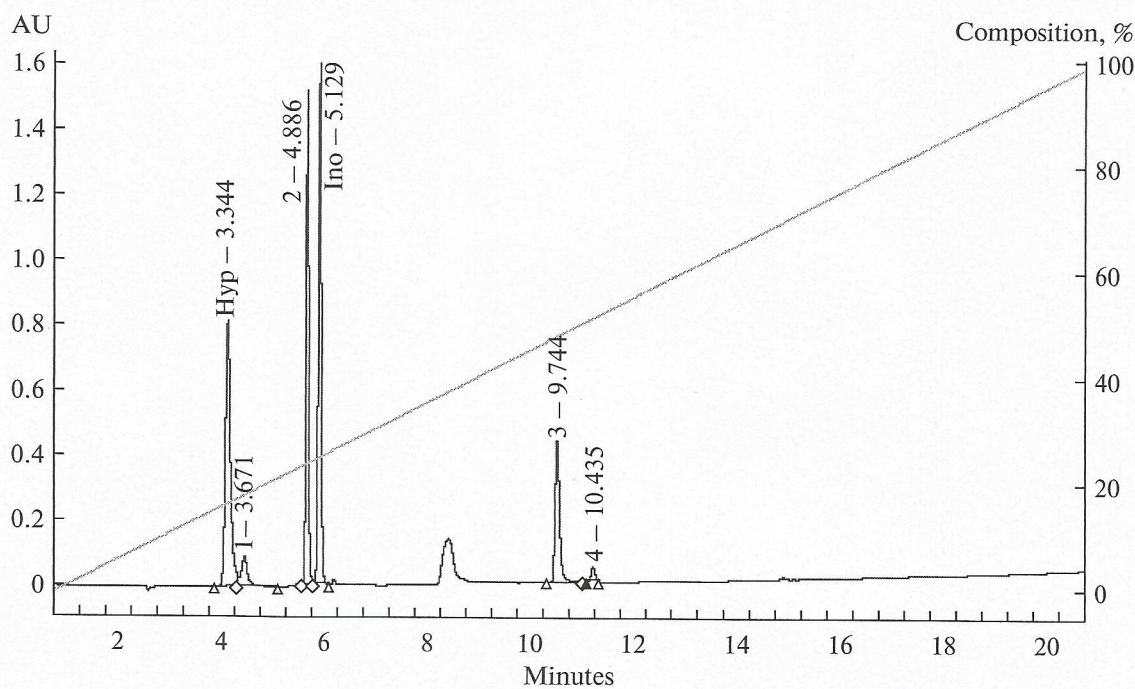


Рис. 7. Данные ВЭЖХ реакционной смеси синтеза нуклеозида (XXI). Компоненты реакционной смеси (на 10-й день) были идентифицированы по данным масс-спектрометрии: 1 – (XVIe), 2 – (XX), 3 – (XXI), 4 – (XVIId).

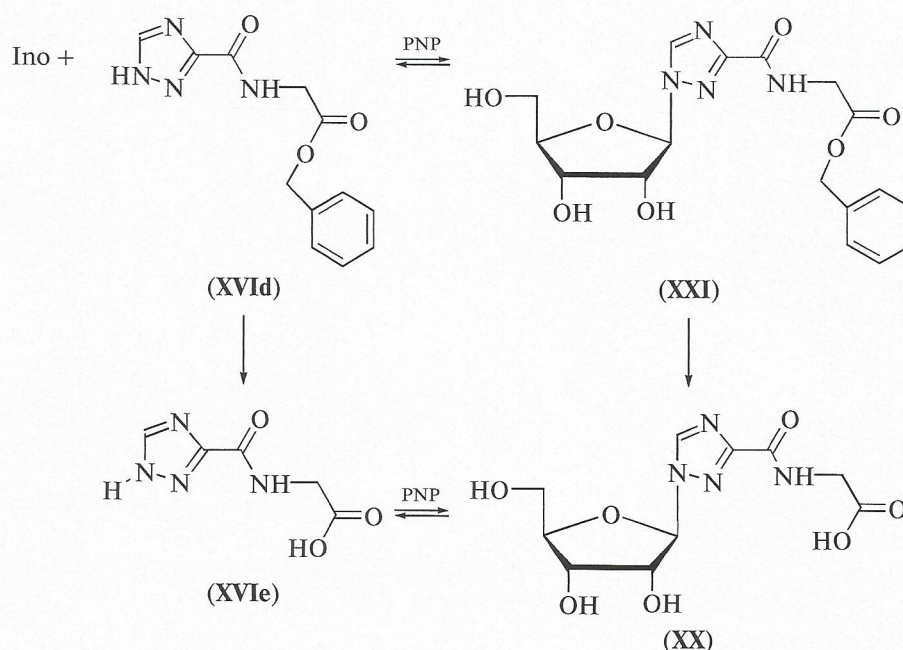
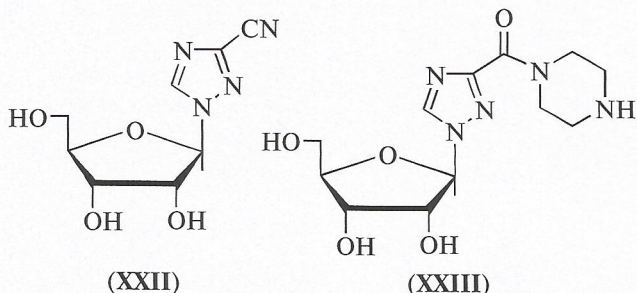


Схема 7. Синтез рибозида (XXI).

После оптимизации условий ферментативных реакций (были определены наиболее эффективный донор рибозы, соотношение нуклеозид – основание, оптимальное количество ферментов) были наработаны два аналога рибавирина (XXII) и (XXIII):



Формулы 4. Полученные в препаративном количестве аналоги рибавирина.

Очень перспективным нам кажется тот факт, что 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбонитрил (XVIII) оказался субстратом PNP: становится возможным создание биотехнологического способа получения нового аналога рибавирина вирамидина (III). Рибозное производное 1,2,4-триазол-3-карбонитрила (XXII) было получено по реакции трансгликозилирования с выходом 60%. В качестве донора рибозы был выбран гуанозин.

Аналогичным способом с выходом 65% был синтезирован рибонуклеозид 3-карбокспиперазинил-1,2,4-триазола (XXIII).

Таким образом, в результате проведенной серии экспериментов нами были определены основные требования к структуре производных 1*H*-1,2,4-три-

азол-3-карбоксамид, позволяющие осуществлять ферментативный синтез новых рибозных и дезоксирибозных аналогов рибавирина: не должно быть объемных (больше метила) заместителей в С5-положении ГЦО, необходимо наличие амидной или нитрильной группы в С3-положении 1,2,4-триазола, причем, в амидной группе могут быть алифатические, *N*-циклические или карбоксил-содержащие заместители (например, аминокислоты), но не ароматические. Допускается введение ароматических заместителей в амидную группу через спейсерную.

В настоящее время в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского проводится изучение противовирусной активности двух синтезированных соединений на моделях гепатита С, вируса герпеса простого 2-типа, вирусов гриппа типов А и В, а также вируса иммунодефицита человека. Результаты испытаний противовирусной активности синтезированных соединений будут опубликованы позднее.

Таблица 8. Данные масс-спектров реакционной смеси синтеза нуклеозида (XXI)

Соединение	<i>R_f</i> , мин	<i>m/z</i> , [M + H] ⁺	Другие
(XVIe)	3.67	171.0526	193.0333 [M + Na] ⁺
(XX)	4.89	303.0957	605.1803 [2M – H] ⁺ ; 171.0526 [base] ⁺
(XXI)	9.74	393.1412	785.2767 [2M – H] ⁺ ; 261.1009 [base] ⁺
(XVIId)	10.43	261.1009	–

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хлористый ацетил, гидразингидрат (100%), этиловые эфиры и хлорангидриды пропионовой, масляной, изомасляной, изовалериановой и циклопропанкарбоновой, триметилуксусной кислот (Sigma-Aldrich), растворители отечественного производства, очищенные по стандартным методикам.

Пуриннуклеозидфосфоорилаза (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд – 15 мг/мл, активность 52 ед. акт./мг белка) была получена в группе рекомбинантных белков ИБХ РАН под руководством к.х.н. Р.С. Есипова [23, 24].

^1H -ЯМР-спектры (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали в DMSO (где не указано особо) на приборах Bruker DPX-300 с рабочей частотой 300 МГц и Bruker DRX-700 (ФРГ) с рабочей частотой 700 МГц (ИБХ РАН). Обозначения в ^1H -ЯМР-спектрах: с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, м – мультиплет, уш. – уширенный.

Масс-спектры регистрировали на приборе API 150EX (Perkin-Elmer Instruments) (ионизация – электроспрей) и Agilent 6224, ESI-TOF, LC/MS. ИК-спектры записывали на приборе Specord 3000 (Германия). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония).

Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel F₂₅₄ (Merck, Германия), для тонкослойной хроматографии – пластинки Сорбфил (отечественного производства) и Merck F₂₅₄ (Германия).

За ходом ферментативных реакций следили с помощью ВЭЖХ (хроматограф Waters 2487, Breeze, США), колонка: Nova-Pak C18, 4 мкм, 4,6 × 150 мм. Элюент А: 0.1% ТФА/вода, элюент В: 70% ацетонитрила в А. Скорость потока – 1 мл/мин, детектирование осуществляли при 215, 225, 230 и 254 нм.

Варианты градиентного элюирования В в А:

- 1) градиент 0% В – 5 мин, 0–15% В – 10 мин, 215 и 254 нм;
- 2) градиент 0–30% В за 20 мин, 225 и 254 нм;
- 3) градиент 0–50% В за 20 мин, 230 и 254 нм;
- 4) градиент 0–100% В за 20 мин, 230 и 254 нм;
- 5) 100% А, 215 и 254 нм;
- 6) градиент 0% В – 5 мин, 0–50% В – 15 мин, 230 и 254 нм.

Гидразиды карбоновых кислот получали из соответствующих этиловых эфиров и гидразингидрата по стандартной методике, гидроксид диэтилового эфира карбонилформимидной кислоты получен по методике [28], триазолкарбоксамид – по методике [27].

1H-1,2,4-Триазол-3-карбоновая кислота и ее 5-замещенные аналоги (IXa)–(IXf) синтезировали из 3-амино-1,2,4-триазол-5-карбоновой кислоты в соответствии с методиками, описанными в литера-

туре [25, 27, 28]. Физико-химические характеристики полученных соединений соответствовали структуре и литературным данным (табл. 1).

Метилловые эфиры 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот (Xa)–(Xe). К охлажденному до 10°C раствору 10 ммоль соединения (IXa)–(IXe) в 20 мл абсолютного метанола по каплям при перемешивании прибавляли 1.8 г (15 ммоль) хлористого тионила таким образом, чтобы температура не поднималась выше 15°C. Температуру поднимали до комнатной, перемешивали 2 ч, затем растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе и фильтровали через слой силикагеля. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили при 1 мм. рт. ст. в течение 48 ч. Физико-химические характеристики и выхода соединений (Xa)–(Xe) приведены в табл. 2.

Амиды 1H-1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот (XIa)–(XIe). Раствор 1 ммоль метилового эфира (Xa)–(Xe) в 5 мл насыщенного раствора аммиака в абсолютном метаноле перемешивали 48 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили при 1 мм. рт. ст. в течение 48 ч. Физико-химические характеристики и выхода соединений (XIb)–(XIe) приведены в табл. 2.

Этиловый эфир 5-этил-1H-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (Xg). К раствору 0.97 г (11 ммоль) гидразида пропионовой кислоты в 5 мл безводного метанола добавляли 2 г (11 ммоль) гидрохлорида диэтилового эфира карбонилформимидной кислоты при перемешивании и охлаждении льдом. По прохождении реакции (контроль ТСХ, система хлороформ–метанол, 9 : 1), к реакционной массе прибавляли 1 г (12 ммоль) гидрокарбоната натрия, растворенного в 10 мл воды. Метанол из реакционной массы удаляли на роторном испарителе. Выпавшие белые кристаллы отфильтровывали, осторожно промывали водой и диэтиловым эфиром и сушили на воздухе. Выход этил β-пропионилоксаламидраза 0.43 г (21%). ^1H -ЯМР: 1.24 (3 H, м, OCH_2CH_3); 1.89 и 2.07 (1.3 H и 1.6 H, 2 с, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$); 4.20 (2 H, м, OCH_2CH_3); 6.39 (2 H, уш.д, J 15.2, NHNH); 9.76 (1 H, уш.д, J 9.4, =NH). Масс-спектр, m/z : 188.1197 [$M + \text{H}$]⁺; 210.0849 [$M + \text{Na}$]⁺.

К перемешиваемой суспензии 430 мг (2.3 ммоль) этил-β-пропионилоксаламидраза в 5 мл абсолютного пиридина прибавляли 220 мг (2.4 ммоль) хлорангидрида пропионовой кислоты и нагревали до кипения. Кипятили 24 ч, затем растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на открытой колонке с силикагелем (элюент хлороформ). Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали в вакууме 10 мм рт. ст. 4 ч. Выход 331 мг (85%). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.33 (3 H, т, J 7.64, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.35 (3 H, т, J 7.14, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$);

2.92 (2 Н, к, J 7.64, $\text{СН}_2\text{СН}_3$); 4.42 (2 Н, к, J 7.14, $-\text{ОСН}_2\text{СН}_3$); m/z : 170.0934 [$M + \text{H}$]⁺ (расч. 170.0930).

Амид 5-этил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIg). К раствору 300 мг (1.77 ммоль) соединения (Xg) в 5 мл метанола прибавляли 3 мл насыщенного водного раствора аммиака и кипятили с обратным холодильником 72 ч, добавляя равные порции насыщенного водного раствора аммиака (0.25 мл) через каждые 12 ч. По завершении реакции смесь охлаждали, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой и диэтиловым эфиром, сушили на воздухе. Выход 226 мг (91%). ¹Н-ЯМР: 1.33 (3 Н, т, J 7.64, $-\text{СН}_2\text{СН}_3$); 2.92 (2 Н, к, J 7.64, $\text{СН}_2\text{СН}_3$); 7.52–7.83 (0.5 Н, уш. м, CONH_2); 9.7 (0.6 Н, с, 1-НН); m/z : 142.0642 [$M + \text{H}$]⁺ (расч. 142.0617).

Амид 5-изобутил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIe). Соединение (XIh) получали по методикам, аналогичным соединению (XIg), при этом промежуточный эфир (Xh) не очищали и не охарактеризовывали. После удаления растворителей реакцию массу, содержащую эфир (Xh), разбавляли этанолом, добавляли насыщенный водный раствор аммиака и далее проводили реакцию, как описано выше. Выход этил-β-изовалерилоксаламидразона 51% (из гидразида изовалериановой кислоты), ¹Н-ЯМР: 0.88 (6 Н, дд, J_1 6.63; J_2 3.47, $-\text{СН}(\text{СН}_3)_2$); 1.23 и 1.24 (3 Н, 2 т, J_1 7.06; J_2 7.10, $\text{ОСН}_2\text{СН}_3$); 1.96–2.10 (2 Н, м, $-\text{СН}_2\text{СН}(\text{СН}_3)_2$); 2.39 (1 Н, д, J 7.03 $-\text{СН}_2\text{СН}(\text{СН}_3)_2$); 4.15–4.25 (2 Н, м, $\text{ОСН}_2\text{СН}_3$); 6.35–6.42 (2 Н, уш. м, $-\text{NH}-\text{NH}-$); 9.62–9.81 (1 Н, уш. м, $=\text{NH}$). Выход амида (XIh) 90% (на хлорангидрид изовалериановой кислоты). ¹Н-ЯМР: 0.88 (6 Н, уш. д, J 6.88, $\text{СН}(\text{СН}_3)_2$), 1.88–2.07 (3 Н, м, $\text{СН}_2\text{СН}(\text{СН}_3)_2$); 2.56 (2 Н, уш. д, J 6.88, $\text{СН}_2\text{СН}(\text{СН}_3)_2$); 7.38–7.77 (2 Н, уш. м, CONH_2); 9.61 (1 Н, с, 1-НН); m/z : 169.1092 [$M + \text{H}$]⁺ (расч. 169.1089); λ_{max} : 224.2 нм.

Гидрохлорид хлорангидрида 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XII). Кипятили 22.4 г (0.2 моль) 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (IXa) в 40 мл (0.55 моль) тионилхлорида. Через 4 ч осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром (3 × 50 мл). Сушили в вакууме 10 мм рт. ст. в течение 4 ч. Выход 17.66 г (68%). ИК (суспензия в вазелиновом масле), см^{-1} : 1012 (ср., $-\text{СОСл}$); 1136 (ср., $-\text{СОСл}$); 1152 (сл., $-\text{СОСл}$). Найдено, %: С 21.69; Н 1.88; N 25.29. Вычислено, %: С 21.45; Н 1.80; N 25.01.

n-Нитрофениловый эфир 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XIII). К раствору 97 мг (0.7 ммоль) n-нитрофенола в 5 мл абсолютного метанола добавляли 78 мг (1.44 ммоль) гидроксида калия. Через 20 мин растворитель упаривали досуха, остаток сушили в вакууме 10 мм рт. ст. при 70°C в течение 4 ч. Добавляли 15 мл абсолютного

ацетона и 118 мг (0.7 ммоль) гидрохлорида хлорангидрида 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XII). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток сушили в вакууме 10 мм рт. ст. в течение 4 ч. Выход 157 мг (96%). ¹Н-ЯМР-спектр: 7.62 (2 Н, д, J 9.57, 2 и 6 PhНН); 7.62 (2 Н, д, J 9.57, 3 и 5 PhНН); 8.81 (1 Н, с, ArН).

Анилиды 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот (XIVa)–(XIVk). К дисперсии 113 мг (1 ммоль) 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (IXa) в 4 мл абсолютного этилацетата добавляли 194 мг (1.20 ммоль) карбонилдимидазола при интенсивном перемешивании. Через 1 ч к реакционной смеси добавляли 0.8 ммоль соответствующего анилина. Реакционную массу перемешивали в течение 3 ч, упаривали до объема 0.5 мл, осадок отфильтровывали, высушивали на фильтре и промывали дистиллированной водой (3 × 5 мл). Продукт сушили в вакууме 10 мм рт. ст. в течение 24 ч. Физико-химические характеристики и выхода соединений (XIVa)–(XIVk) приведены в табл. 4.

Замещенные амиды 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XVIa)–(XVId) и (XVIe)–(XVII). К дисперсии 200 мг (1.77 ммоль) 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (IXa) в абсолютном пиридине (5 мл) при 0–5°C добавляли 0.42 мл (3.54 ммоль) пивалоилхлорида. Через 1.5 ч к реакционной массе добавляли 1.77 ммоль соответствующего амина. Перемешивали 15 мин, затем добавляли несколько капель дистиллированной воды. Реакционную массу упаривали в вакууме, остаток переупаривали с толуолом (5 мл). Продукт очищали колоночной флеш-хроматографией на силикагеле (элюент: этилацетат). Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали при 1 мм рт. ст. в течение 4 ч. Физико-химические характеристики и выход соединений (XVIa)–(XVIe), (XVIe)–(XVII) приведены в табл. 5.

N-(1Н-1,2,4-Триазол-3-карбонил)глицин (XVIe). К раствору 100 мг (0.38 ммоль) соединения (XVIe) в 3 мл метанола добавляли 30 мг 10% Pd/C и насыщали смесь водородом при перемешивании. Через 1 ч, когда расчетное количество водорода поглотилось, раствор отфильтровывали через слой целита и растворитель удаляли в вакууме. Выход 55 мг (84%). ¹Н-ЯМР-спектр: 8.51 (1 Н, с, ArН); 4.15 (2 Н, д, J 6.1, N- СН_2); m/z : 171.0528 [$M + \text{H}$]⁺ (расч. 171.0518), 193.0333 [$M + \text{Na}$]⁺.

N-Метиламид 1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (XVII). К раствору 1.27 г (10 ммоль) соединения (IXa) в 20 мл абс. метанола при перемешивании добавляли 3 мл 4 M раствора метиламина в метаноле, нагревали до кипения и кипятили 1 ч. Реакционную массу охлаждали, растворитель удаляли в вакууме, остаток кристаллизовали из

этилового спирта. Выход 0.92 г (73%). $T_{пл} = 238-240^{\circ}\text{C}$. ^1H -ЯМР-спектр: 8.50 (1 H, с, ArH); 4.24 (3 H, д, J 6, N-Me); m/z : 127.0625 [$M + \text{H}$] $^+$ (расч. 127.0620), 149.0442 [$M + \text{Na}$] $^+$ (расч. 149.0434). Чистота 100 % по данным ВЭЖХ, $R_t = 4.2$ мин (вариант 2); УФ, λ_{max} : 233.6, нм.

1H-1,2,4-Триазол-3-карбонитрил (XVIII). В двухгорлую колбу в атмосфере азота загружали 2.5 г (22 моль) 1,2,4-триазол-3-карбоксамиды (XIa), 22 мл абс. 1,4-диоксана и 8 мл (0.1 моль) абс. пиридина. Реакционную смесь охлаждали до 0°C , после чего по каплям добавляли 7.1 мл (51 ммоль) трифторуксусного ангидрида в течение 10 мин. Охлаждение прекращали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще 30 мин. По прохождении реакции, целевой продукт очищали флеш-хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента этилацетат. Выход 1.25 г (60%). $T_{пл} = 185-187^{\circ}\text{C}$ (лит. 187°C [30]); m/z : 117.0363 [$M + \text{Na}$] $^+$ (расч. 117.0358), λ_{max} 218.2 нм, чистота 100%, $R_t = 3.92$ мин (ВЭЖХ, вариант 1). ^1H -ЯМР-спектр: 8.87 (1 H, с, H5). ^{13}C -ЯМР-спектр: 113.05; 137.97; 146.15.

Субстратно-специфические свойства нуклеозид-фосфоорилаз. Навеску модифицированного основания (2 ммоль) растворяли в 1 мл 2 мМ буферного раствора KH_2PO_4 , pH 7.0 (при необходимости, нагревали до полного растворения или добавляли DMSO не более 20% по объему). Аналогично готовили 4 мМ раствор инозина в 2 мМ буферного раствора KH_2PO_4 , pH 7.0. Смешивали: 1) 0.3 мл 4 мМ раствора инозина и 0.3 мл 2 мМ буферного раствора KH_2PO_4 (контрольная реакция), 2) 0.3 мл 4 мМ раствора инозина и 0.3 мл 2 мМ раствора модифицированного основания (тестовая реакция). В реакционные смеси добавляли по 5 мкл PNP, термостатировали при температуре 55°C . Отбор проб производили через 1 ч и через каждые 24 ч после начала реакции.

За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ: длина волны детектирования для контрольной реакции – 254 нм, для тестовой – определялась отдельно для каждого модифицированного основания с помощью УФ-спектрофотометра (т.е. детекцию осуществляли при двух длинах волн). Проводили сравнение количества гипоксантина (% по данным ВЭЖХ при 254 нм) в тестовой и контрольной смесях.

1-β-D-Рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбонитрил (XXII). Основание (XVIII) 20 мг (2 ммоль), гуанозин 451.97 мг (15 ммоль) и KH_2PO_4 28.93 мг (2 ммоль) растворяли в 106.3 мл дистиллированной воды. Доводили pH раствора 2 мМ КОН до 7.0. В реакционную смесь добавляли 1.1 мл PNP. Раствор термостатировали при 55°C в течение 4 сут. Реакционную смесь на 2 ч убирала в холодильник для осаждения гуанина. Осадок удаляли центри-

фугированием (2 мин при 12000 об/мин), супернатант отбирали, осадок диспергировали в минимальном количестве воды, опять отцентрифугировали. Супернатанты объединяли, концентрировали в вакууме (5 мм рт. ст.). Продукт выделяли с помощью препаративной хроматографии на колонке Luna C18 (Phenomenex) 100 мкм, 250×21.20 мм. Фракции, содержащие продукт, объединяли, элюент удаляли в вакууме (5 мм рт. ст.). Остаток сушили в вакуумном эксикаторе. Выход 27 мг (60%), содержание основного вещества 98.35%, $R_t = 5.4$ мин (ВЭЖХ, вариант 5); m/z : 227.0763 [$M + \text{H}$] $^+$ (расч. 227.0775). ^1H -ЯМР-спектр: 9.15 (1 H, с, H5), 5.89 (1 H, д, $J_{1,2}$ 3.7, H1'), 5.66 (1 H, уш. с, OH₂'), 5.24 (1 H, уш. с, OH₃'), 4.93 (1 H, уш. т, J 4.5, OH₅'), 4.34 (1 H, дд, J 3.9, H2'), 4.13 (1 H, дд, $J_{3,2}$ и $J_{3,4}$ 4.4, H3'), 3.98 (1 H, дд, $J_{4,3}$ 4.4, $J_{4,5}$ 9.1, H4'), 3.62 (1 H, м, H5a'), 3.51 (1 H, м, H5b'). ^{15}N -ЯМР: 307.7 (N2 триазол), 260.4 (N4 триазол), 237.2 (N1 триазол).

1-β-D-Рибофуранозил-3-карбокспиперазинил-1,2,4-триазол (XXIII). Растворяли 0.034 г KH_2PO_4 в 61.54 мл дистиллированной воды. Доводили pH буферного раствора 2 М КОН до 7.0. В буфере растворяли 0.262 г (15 мМ) гуанозина и 0.050 г (3.75 мМ) основания (XVIIh). Реакционную смесь нагревали до 60°C до растворения гуанозина. Далее в реакционную смесь добавляли 0.06 мл PNP. Раствор термостатировали в течение 7 сут. Гуанин (по данным ВЭЖХ) отфильтровали, фильтрат упаривали до минимального объема. Остаток наносили на колонку с обращено-фазовым сорбентом Silica gel 100 C₁₈-reversed phase (Fluka) (размер колонки 25×170 мм), элюировали водой. Фракции, содержащие более 95% целевого рибозиды объединяли, растворитель удаляли в вакууме (5 мм рт. ст.). Продукт сушили в эксикаторе 24 ч над P_2O_5 . Выход: 47 мг (65%). Содержание основного вещества 98.28%, $R_t = 2.22$ мин (ВЭЖХ, вариант 1); m/z : 314.1452 [$M + \text{H}$] $^+$ (расч. 314.1459), 336.1269 [$M + \text{Na}$] $^+$. ^1H -ЯМР: 8.86 (1 H, с, H5), 5.81 (1 H, д, $J_{1,2}$ 3.7, H1'), 5.74 и 5.38 (2 H, м, OH₃' и OH₂'), 4.89 (1 H, м, OH₅'), 4.32 (1 H, м, H2'), 4.13 (1 H, м, H3'), 3.94 (1 H, м, H4'), 3.61 (1 H, дд, $J_{4,5}$ 3.8, H5a'), 3.54 (2 H, м, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.48 (1 H, м, $J_{4,5}$ 4.89, H5b'), 3.43 (2 H, м, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.72 (2 H, м, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.65 (2 H, м, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). ^{13}C -ЯМР: 160.55 (C(O)), 157.69 (C3), 144.83 (C5), 92.07 (C1'), 85.84 (C4'), 74.98 (C2'), 70.39 (C3'), 61.71 (C5'), 48.34 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 46.60 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 45.85 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 43.35 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). ^{15}N -ЯМР: 282.33 (N пиперазинила), 254.38 (N4), 229.4 (N1), 122.44 (NH пиперазинила).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Р.С. Есипову и Т.И. Муравьевой за любезно предоставленные препараты пуриноклеозидфосфорилазы.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проекты 07-04-13573-офи_ц и 10-04-01020-а), ФЦП "Национальная технологическая база" на 2007–2012 гг. (госконтракт № ГП/07/439/НТБ/К от 23 июля 2007 г.) и ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 гг. (проект П1085 от 31.05.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayden F. G. // *Antiviral Research*. 1996. № 29. P. 45–48.
2. Галегов Г.А., Львов Н.Д., Петрова И.Г., Флорентьев В.Л. // *Вопросы медицинской химии*. 1986. Т. XXXII, № 1. С. 10–19.
3. Crotty S., Maag D., Arnold J.J., Zhong W., Lau J.Y., Hong Z., Andino R., Cameron C.E. // *Nature Medicine*. 2000. V. 6. P. 1375–1379.
4. Tam R.C., Lau J.Y., Hong Z. // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 2001. V. 12. P. 261–272.
5. Чешик С.Г., Вартамян Р.В., Иванова Л.А., Кистенева Л.Б., Галегов Г.А. // *Вопросы вирусологии*. 1992. Т. 37. № 2. С. 97–99.
6. Bellobuono A., Monadazzi L., Tempini S., Chiodo F., Magliano E., Furione L., Ideo G. // *J. Hepatol*. 2000. V. 33. P. 463–468.
7. Lackner H., Moser A., Deutsch J., Kessler H.H., Benesch M., Kerbl R., Schwinger W., Dornbusch H.-J., Preissger K.-H., Urban Ch. // *Pediatrics*. 2000. V. 4. P. 106.
8. Hézode C., Forestier N., Dusheiko G., Ferenci P., Pol S., Goeser T., Bronowicki J.-P., Bourlière M., Gharakhanian S., Bengtsson L., McNair L., Kieffer Sh., Kwong A., Kauffman R. S., Alam J., Pawlotsky J.-M., Zeuzem S. // *New Engl. J. Med*. 2009. V. 360. P. 1839–1850.
9. Kwong A.D., Kauffman R.S., Hurter P., Mueller P. // *Nature Biotechnology*. 2011. V. 29. P. 993–1003.
10. Fang C., Srivastava P., Lin C.-C. // *J. Appl. Toxicol*. 2003. V.23 (6). P. 453–9.
11. Lin C.-C., Liu T., Lourenco D., Yeh L.-T., Lau J.Y.N. // *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. V. 51. P. 93–99.
12. Benhamou Y., Afdhal N.H., Nelson D.R., Shiffman M.L., Halliman D.G., Heise J., Chun E., Pockros P.J. // *J. Hepatology*. 2009. V. 50. P. 717–26.
13. Marcellin P., Gish R.G., Gitlin N., Heise J., Halliman D.G., Chun E., Rodriguez-Torres M. // *J. Hepatology*. 2010. V. 52. P. 32–38.
14. Константинова И.Д., Есипов Р.С., Муравьева Т.И., Таран С.А., Вережкина К.Н., Гуревич А.И., Феофанов С.А., Мирошников А.И. Способ получения 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамида (рибавирина). Патент РФ № 2230118 от 10.07.2004 г.
15. Hennen W.J. and Wong C.-H. // *J. Org. Chem*. 1989. V. 54. P. 4692–4695.
16. Михайлопуло И.А., Мирошников А.И. // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. P. 38–61.
17. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Pharmacology & Therapeutics*. 2000. V. 88. P. 349–425.
18. Mikhailopulo I.A. // *Current Org. Chem*. 2007. V. 11. P. 317–335.
19. Shirae H., Yokozeki K. // *Agric. Biol. Chem*. 1991. V. 55. № 7. P. 1849–1857.
20. Чудинов М.В., Константинова И.Д., Рыжова О.И., Есипов Р.С., Юркевич А.М., Швеиц В.И., Мирошников А.И. // *Химико-фармацевтический журнал*. 2005. № 4. С. 43–46.
21. Константинова И.Д., Фатеев И.В., Музыка И.С., Галкина И.В., Бутенко А.М., Галегов Г.А., Белов А.В., Ларичев В.Ф., Дерябин П.Г., Швеиц В.И., Львов Д.К., Мирошников А.И. // *Биотехнология*. 2008. № 4. С. 69–79.
22. Фатеев И.В., Константинова И.Д., Швеиц В.И. // *Вестник МИТХТ*. 2008. Т. 3. С. 58–62.
23. Есипов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чувиковский Д.В. Способ получения рекомбинантной пуриноклеозид-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERPUPHNOI и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERPUPHNOI для его осуществления. Пат. 2179188 РФ, МПК C12 P17/16. № 2000105214; заявлено 03.03.2000; опубл. 10.02.2002, Бюл. № 4. 12 с.
24. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., Chupova L.A., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I. // *Protein Expts. Purif*. 2002. V. 24. P. 56–60.
25. Багал Л.И., Певзнер М.С., Лопырев В.А. // *Химия гетероциклических соединений*, 1967. Сб. 1, С. 180–183.
26. Чипен Г.И., Гринштейн В.Я. // *Химия гетероциклических соединений*. 1965. Т. 1. С. 624–626.
27. Чипен Г.И. // *Методы получения химических реактивов и препаратов*, сб. 14, с. 119–120, ИРЕА, Москва, 1964.
28. Верещагина Т.Н., Лопырев В.А., Певзнер М.С., Коган Л.М. // *Химия гетероциклических соединений*. 1969. Т. 5. № 5. С. 913–915.
29. Чудинов М.В., Матвеев А.В., Журило Н.И., Простакова В.В., Швеиц В.И. // *Вестник МИТХТ*. 2011. Т. 6. № 2. С. 66–70.
30. Huang D.-S., Mendoza B., Malik A.A. Process for the preparation of cyano-substituted-nitrogen-containing heteroaryl compounds // *Patent Application US2009/292122 A1*, МПК C07D 241/24. №12/437,711. Заявлено 08.05.2009, опубликовано 26.11.2009.
31. Walter R.L., Symersky J., Poirot A.F., Stoeckler J.D., Erionf M.D., Ealick S.E. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1994. V. 13. P. 689–706.
32. Bzowska A., Kulikowska E., Darzynkiewicz E., Shugar D. // *J. Biol. Chem*. 1988. V. 263. P. 9212–9217.

Nucleosides of 1,2,4-Triazole: Potentialities and Restrictions of Chemo-Enzymatic Method for Synthesis

I. D. Konstantinova^{*, #}, M. V. Chudinov^{**}, I. V. Fateev^{*}, A. V. Matveev^{**},
N. I. Zhurilo^{**}, V. I. Shvets^{**}, and A. I. Miroshnikov^{*}

[#]Phone: 7(495) 330-72-47; fax: 7(495) 330-73-79; e-mail: kid1968@yandex.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

The potentialities and restrictions of chemoenzymatic approach to the synthesis of new structural analogues of antiviral drug Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) have been determined. Syntheses of various amides of 1H-1,2,4-triazole-3-carboxylic acid and its 5-substituted analogues, prospective substrates of purine nucleoside phosphorylase (PNP), have been reported. The comparative effectiveness of the methods for obtaining amides aforementioned and also the methods for introducing functional groups to the C5 position of the heterocyclic system has been studied. New Ribavirin analogues bearing various substituents in the carboxamide group have been synthesized. The biotechnological method for the preparation of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carbonitrile used as the intermediate in the synthesis of Viramidine, a contemporary Ribavirin analogue, has been developed.

Keywords: nucleoside phosphorylases from *E. coli*, Ribavirin, transglycosylation, 1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide, Viramidine