

© Коллектив авторов, 2005

М. В. Чудинов¹, И. Д. Константинова², О. И. Рыжова², Р. С. Есипов²,
А. М. Юркевич¹, В. И. Швеи¹, А. И. Мирошников²

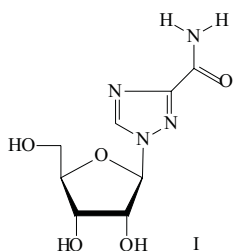
НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ СИНТЕЗА ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДА И РИБАВИРИНА

¹ Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;

² Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва.

Разработан новый способ получения 1,2,4-триазол-3-карбоксамида и его 5-замещенных аналогов. Изучена субстратная специфичность пуриинуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к синтезированным основаниям.

Рибавирин или Виразол — 1-β-D-рибофуранозил-[1H]-1,2,4-триазол-3-карбоксамида (I) — хорошо известный противовирусный препарат с широким спектром действия. Синтезированный в 70-х годах прошлого века I был рекомендован как эффективное средство против ряда инфекций (герпеса [1, 2], респираторно-синтициальной вирусной инфекции [3], острых респираторных инфекций, вызванных аденовирусом [4]). В настоящее время рибавирин широко применяют вместе с интерфероном в комплексной терапии вирусного гепатита С [5–7]. Широкий спектр антивирусной активности I связан с его способностью ингибировать активность ДНК- и РНК-полимераз, что приводит к прекращению роста цепи вирусной нуклеиновой кислоты и потере, как следствие, ее вирулентности [8, 9].



Высокий интерес к созданию новых современных противовирусных препаратов обеспечивает постоянное внимание к синтезу и изучению биологической активности новых аналогов рибавирина, основанных на модифицированных производных 1,2,4-триазол-3-карбоксамида (II).

В последнее время для синтеза рибавирина и некоторых его аналогов применяется современный высокоэффективный способ, основанный на реакции микробиологического трансгликозилирования, осуществляемой ферментом пуриинуклеозидфосфорилазой (ПНФ) [10–12]. С целью изучения субстратной специфичности генно-инженерного фермента пуриинуклеозидфосфорилазы и возможности синтеза данным

способом аналогов рибавирина мы исследовали поведение этих соединений в реакции микробиологического трансгликозилирования.

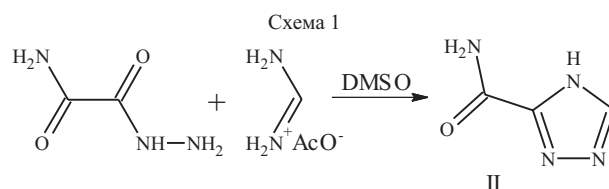
I. Синтез 1,2,4-триазол-3-карбоксамида (II) и его 5-замещенных аналогов.

Описанный ранее способ синтеза гетероциклического основания (II) [13] проходит через стадию дезаминирования 3-амино-(1,2,4-триазол)-5-карбоновой кислоты. Технологически эта стадия является весьма неудобной из-за взрывоопасности промежуточной диазониевой соли, а получающаяся триазолкарбоновая кислота сама по себе весьма неустойчива и декарбоксилируется в чрезвычайно мягких условиях.

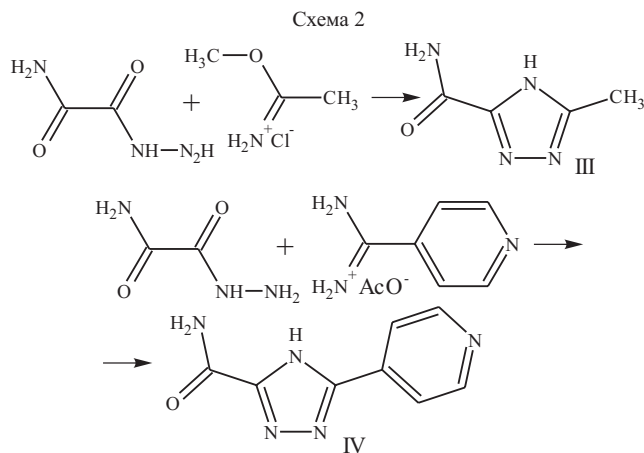
II не может использоваться в химическом синтезе рибавирина из-за высокой вероятности протекания побочных реакций по амидной группе. Поэтому используют метиловый или этиловый эфиры соответствующей кислоты, которые затем, после проведения реакции гликозилирования, переводят в амид [14].

Однако в реакции микробиологического трансгликозилирования с целью получения рибавирина используют именно II [10–12], так как метиловый и этиловый эфиры триазолкарбоновой кислоты не являются субстратом для нуклеозидфосфорилазы.

Предлагаемый нами способ синтеза (II) более технологичен, чем описанные ранее, так как не включает взрывоопасные стадии и короче (схема 1).



Аналогичный подход, основанный на реакции иминоэфиров и амидинов с гидразидом оксамовой кислоты, пригоден и для синтеза 5-замещенных аналогов III (III, IV) (схема 2).



II. Биотехнологический способ получения модифицированных нуклеозидов.

Полученные основания (II – IV) были введены в реакцию микробиологического трансгликозилирования с целью изучения субстратной специфичности генно-инженерного фермента пурипнуклеозидфосфорилазы и возможности синтеза данным способом модифицированных нуклеозидов — аналогов рибавирина.

Способ основан на использовании генно-инженерного фермента — пурипнуклеозидфосфорилазы из штамма суперпродукента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUP-NO1 [15, 16], нашедшего ранее применение для препаративного синтеза рибавирина [17].

Химический синтез модифицированных нуклеозидов — сложный и многостадийный процесс [14, 18, 19]. Ключевой стадией синтеза является реакция гликозилирования модифицированного основания защищенным производным рибозы (дезоксирибозы, арабинозы). Проведение этой реакции селективными химическими методами часто приводит к образованию рацемической смеси α - и β -аномеров с 90 – 95 % преобладанием природного β -аномера. Отделение минор-

ных примесей неприродного α -аномера — довольно трудоемкий процесс, кроме того, по окончании реакции гликозилирования необходимо удалять защитные группы. Таким образом, количество стадий оптимального химического метода синтеза модифицированных нуклеозидов в среднем колеблется от 5 до 9 и, соответственно, уменьшается выход продуктов в пересчете на исходные соединения.

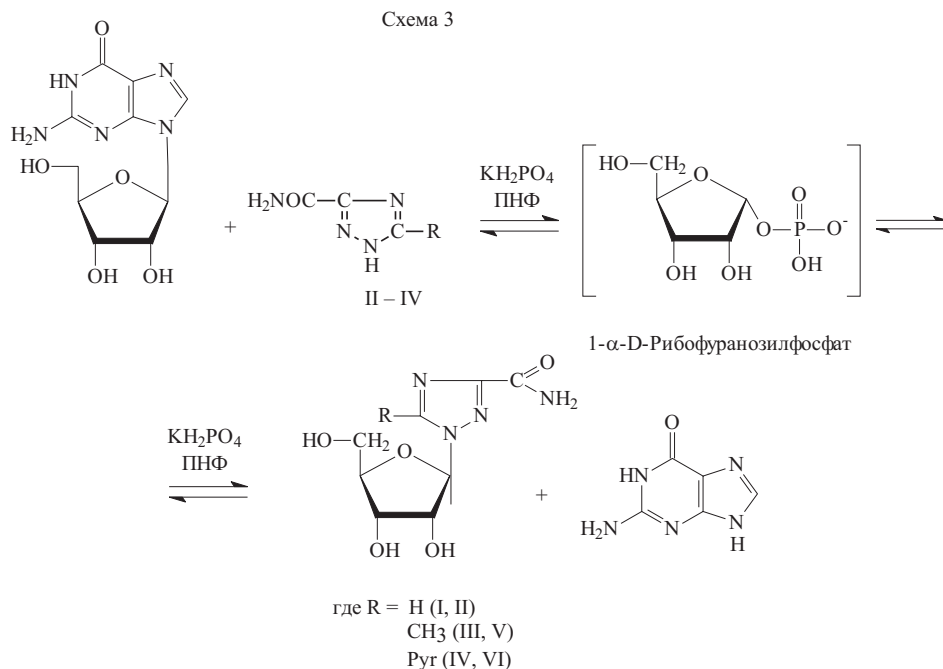
Микробиологический способ получения модифицированных нуклеозидов, напротив, осуществляется в одну стадию и не требует применения защитных групп.

Полученные основания II и его аналоги (III – IV) были введены в реакцию микробиологического трансгликозилирования (схема 3).

Нами была показана возможность получения 1- β -D-рибофуранозил-5-метил-[1H]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (V) по вышеприведенной схеме. В качестве донора рибозы был выбран гуанозин, процесс проходил в 10 мМ калий-фосфатном буферном растворе при 60° С, pH 7,0. Контроль процесса осуществляли с помощью ВЭЖХ. На рисунке приведены данные по содержанию I и его аналога (V) в реакционной смеси.

Приведенные экспериментальные данные показывают, что 5-метил-[1H]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (V) является субстратом для пурипнуклеозидфосфорилазы, однако скорость ферментативной реакции в несколько раз меньше скорости фосфорилиза II.

По всей вероятности, 5-(4-пиридил)-[1H]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (IV) в силу стерических затруднений не является субстратом для пурипнуклеозидфосфорилазы, но и не проявляет свойств ингибитора в отношении фермента, о чем свидетельствует фосфорилиз второго компонента реакционной смеси гуанозина до гуанина. Таким образом, аналог VI с остатком пи-



ридина в положении 5 пиразольного кольца в ферментативной реакции не образуется.

Приведенные экспериментальные данные позволяют судить о принципиальной возможности использования генно-инженерного фермента пуриноклеозидфосфорилазы в синтезе модифицированных аналогов рибавирина, что позволит разработать эффективные биотехнологические способы получения ряда перспективных противовирусных препаратов нового поколения для широкого применения в практической медицине.

Материалы и методы

В работе использовали отечественные растворители и реактивы, очищенные по стандартным методикам, а также реактивы фирмы Sigma и Lancaster (USA), Chemapol (Чехия), гуанозин (Новополоцкого завода БВК, Беларусь) без дополнительной очистки.

Протекание реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Kieselgel F₂₅₄ (Merck, Германия), использовали следующие системы растворителей: метанол – хлороформ в соотношениях 30:70 (А), 60:40 (Б), 5:95 (В). Обнаружение пятен проводили по поглощению в УФ при 254 нм; для обнаружения веществ на хроматограммах применяли раствор нингидрина и фосфорно-молибденовой кислоты.

Индивидуальность соединений, ход реакций ферментативного синтеза и выходы продуктов контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на хроматографе Waters 740 с использованием колонки Symmetry C₁₈ (4.6 × 25 см), 5 мкм, при элюировании со скоростью 1 мл/мин. Детекция при 214 нм. Раствор А: H₂O, раствор В: H₂O–CH₃CN, 3:7. Градиент В: 0 %, 4 мин, 0 – 15 % 12 мин.

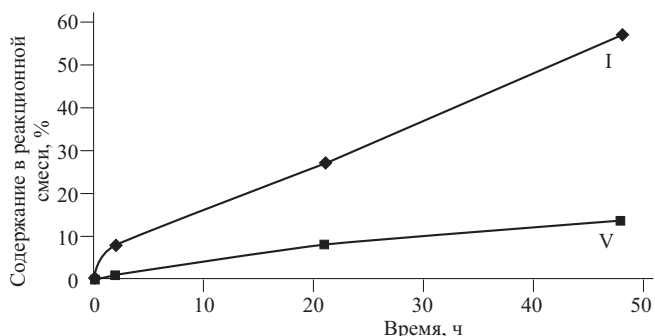
Семиоксамазид был синтезирован из диэтилоксалата по методике [20], а гидрохлорид метилового эфира иминоксусной кислоты — из ацетонитрила, реакцией с хлороводородом в абсолютном метаноле по стандартной методике.

В ходе синтезов использовали очищенные безводные растворители.

¹H ЯМР-спектры полученных соединений записывали при 25° С на импульсном Фурье-спектрометре “Bruker MSL-200” (Германия) с рабочей частотой 200 МГц. Химические сдвиги протонов приведены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (0.0 м.д.). При описании ЯМР-спектров приняты следующие сокращения: s — синглет; d — дублет; t — триплет; m — мультиплет. ЯМР-спектры регистрировали в дейтерированных растворителях.

1,2,4-Триазол-3-карбоксамид (II).

К раствору 13,5 г (0,13 моль) ацетата формамидина в 25 мл абсолютного диметилсульфоксида прибавляют 10,3 г (0,10 моль) семиоксамазида (гидразида оксамовой кислоты) и при перемешивании в атмосфере азота нагревают до 120° С. Прозрачный раствор пере-



Содержание рибавирина (I) и его аналога (V) в реакционной смеси

мешивают при этой температуре 4 ч, затем медленно охлаждают до комнатной температуры и оставляют на 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре этанолом (1 × 50 мл) и диэтиловым эфиром (2 × 50 мл), сушат в вакууме. Выход сырого продукта 64 % (7,2 г). По аналитическим данным, продукт, полученный этим способом, содержит 10 – 15 % соответствующей триазолкарбоновой кислоты. Аналитически чистое вещество может быть получено колоночной хроматографией на ионообменной смоле Dowex 50 [H⁺] в системе метанол – вода. R_f (Б) 0,5.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): 7,68 и 7,92 (уширенные синглеты, 1H и 1H, NH); 8,39 (s, 1H, CH). MS: 112 (M⁺), 103, 69, 58, 45.

Ацетат 4-пиридинкарбоксимидамида.

К раствору 2,62 г (25 ммоль) 4-цианпиридина в 20 мл метилового спирта прибавляют 0,14 г (2,5 ммоль) метилата натрия при перемешивании и нагревании до 40° С. Ход реакции контролируют с помощью ТСХ (В). Спустя 3 ч к реакционной массе прибавляют 10 % мольный избыток ацетата аммония (2,13 г), и перемешивают еще 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают диэтиловым эфиром, сушат в вакууме. Выход 72 % (4,55 г). R_f(В) 0,84. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 1,75 (s, 3H, ацетил); 7,73 и 8,78 (2m, 2H и 2H, Py).

5-(4-Пиридил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (IV).

1 г (10 ммоль) семиоксамазида растворяют в 10 мл диметилформамида при перемешивании и нагревании до 115° С. Добавляют 1,76 г (10 ммоль) ацетата 4-пиридинкарбоксимидамида. Через 2 ч реакционную смесь охлаждают, отфильтровывают, осадок промывают диэтиловым эфиром, сушат в вакууме. Выход 56 % (1,72 г). R_f(Б) 0,8. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 7,62 и 7,90 (уширенные синглеты, 1H и 1H, NH); 7,75 и 8,74 (2m, 2H и 2H, Py). MS: 189 (M⁺).

5-Метил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (III).

2 г (16 ммоль) гидрохлорида этилового эфира иминоксусной кислоты растворяют в 15 мл насыщенного метанольного раствора аммиака, полученного при пропускании через метиловый спирт газообразного аммиака при комнатной температуре. Добавляют 1,68 г (16 ммоль) гидразида оксамовой кислоты. Через 4 ч реакционную массу постепенно нагревают до температуры 160° С, затем медленно охлаждают до ком-

натной температуры. Сухой остаток растворяют в 5 мл кипящей воды, раствор оставляют при 5° С на 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают сначала холодной дистиллированной водой (1 × 5 мл), потом абсолютным метанолом (1 × 5 мл) и диэтиловым эфиром (2 × 10 мл), высушивают в эксикаторе над СаСl₂ при 10 мм.рт.ст. Выход 28 % (0,58 г). R_f (А) 0,67. ¹Н ЯМР (DMSO-d₆): 2,38 и 2,37 (2s, 3Н, СН₃); 7,65 и 7,93 (уширенные синглеты, 1Н и 1Н, NH). MS: 126 (M⁺).

Получение рибавирина (I) и его аналогов (V, VI) с помощью ПНФ.

1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (I) получают по реакции трансгликозилирования при взаимодействии 2,83 мг (10 ммоль) гуанозина с 0,56 мг (5 ммоль) II в присутствии 5 мкл раствора ПНФ (содержание белка 10 мг/мл) в 1 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера при pH 7,0. Реакция протекает при термостатировании в течение 48 ч при 62 °С. Контроль полноты процесса осуществляется с помощью ВЭЖХ.

1-β-D-рибофуранозил-5-метил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (V) получают по реакции трансгликозилирования при взаимодействии 2,83 мг (10 ммоль) гуанозина с 0,63 мг (5 ммоль) 5-метил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид в присутствии 5 мкл раствора ПНФ (содержание белка 10 мг/мл) в 1 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера при pH 7,0. Реакция протекает при термостатировании в течение 48 ч при 62 °С. Контроль полноты процесса осуществляется с помощью ВЭЖХ.

1-β-D-рибофуранозил-5-(4-пиридил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (VI). Модельную реакцию проводят при взаимодействии 2,83 мг (10 ммоль) гуанозина с 0,087 мг (0,5 ммоль) 5-метил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид при интенсивном перемешивании в присутствии 5 мкл раствора ПНФ (содержание белка 10 мг/мл) в 1 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера при pH 7,0. Реакционная смесь содержала 10 % ДМСО (v/v) для улучшения растворимости 5-(4-пиридил)-1,2,4-триа-

зол-3-карбоксамид. Реакцию термостатировали 48 ч при 62 °С. Контроль полноты процесса осуществляется с помощью ВЭЖХ. В реакционной смеси по данным ВЭЖХ не было зафиксировано получения целевого соединения (VI).

ЛИТЕРАТУРА

1. J. D. Gangemi, M. Nachtigal, D. Barnhart, et al., *J. Infect. Dis.*, **155**(3), 510 – 517 (1987).
2. В. Л. Андропова, Г. А. Галегов, *Антибиот. и химиотер.*, **1**, 22 (2000).
3. С. Г. Чешик, Р. В. Варганян, Л. А. Иванова, и др., *Вопросы вирусологии*, **37**(2), 97 – 99 (1992).
4. F. G. Hayden, *Antiviral Res.*, No. 29, 45 – 48 (1996).
5. A. Bellobuono, L. Monadazzi, S. Tempini et. al., *J. Hepatol.*, **33**(3), 463 – 468 (2000).
6. G. Dusheiko, J. Main, H. Thomas, et. al., *J. Hepatol.*, **25**(5), 591 – 598 (1996).
7. V. D. Marco, P. Almasio, A. Vaccaro, et. al., *J. Hepatol.*, **33**(3), 456 – 462 (2000).
8. I. A. Korbuk, M. N. Preobrazhenskaya, O. N. Yudina, *J. Carbohydrates, nucleosides, nucleotides*, **1**, 363 – 371 (1974).
9. A. K. Drabikowska, L. Dudycz, and D. Shugar, *J. Med. Chem.*, **22**(6), 653 – 657 (1979).
10. H. Shirae, K. Yokozeki, K. Kubota, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(1), 295 – 296 (1988).
11. Г. А. Яскович, Е. П. Яковлева, *Приклад. биохимия и микробиол.*, **35**(27), 146 – 149 (1999).
12. T. Utagawa, *J. Molec. Catal. B, Enzymatic*, **6**, 215 – 222, (1999).
13. G. I. Chipen, V. Ya. Grinshtein, *Chem. Heterocycl. Comp.*, **1**, 420 (1965).
14. J. T. Witkowski, R. K. Robins, R. W. Sidwell, and L. N. Simon, *J. Med. Chem.*, **15**(11), 1150 – 1154 (1972).
15. R. S. Esipov, A. I. Gurevich, D. V. Chuvikovskiy, et al., *Protein Express. Purif.*, **24**, 56 – 60 (2002).
16. Р. С. Есипов, А. И. Гуревич, А. И. Мирошников, Д. В. Чувиковский, Патент РФ № 2179188, от 10.02.2002.
17. И. Д. Константинова, Р. С. Есипов, Т. И. Муравьева, Заявка на патент РФ № 2002122429 / 13(023925), от 21.08.2002.
18. Э. Я. Лукевиц, А. Е. Заболоцкая, *Силлильный метод синтеза нуклеозидов*, Зинатне, Рига (1985).
19. L. Dudycz, D. Shugar, E. De Clercq, and J. Descamps, *J. Med. Chem.*, **20**(10), 1354 – 1356 (1977).
20. И. Губен, *Методы органической химии*, том IV, выпуск 1, книга 1, Госхимиздат, Москва (1949), с. 454.

Поступила 19.02.04

A NEW EFFICIENT METHOD OF 1,2,4-TRIAZOLE-3-CARBOXAMIDE AND RIBAVIRINE SYNTHESIS

M. V. Chudinov¹, I. D. Konstantinova², O. I. Ryzhova², R. S. Esipov², A. M. Yurkevich¹, V. I. Shvets¹, A. I. Miroshnikov²

¹ Moscow Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Vernadskogo pr., 86, Moscow, 11571 Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A new method of synthesis of 1,2,4-triazole-3-carboxamide and its 5-substituted analogues has been developed. The substrate specificity of purine nucleoside phosphorylase from *E. coli* against synthesized bases has been studied.