



УДК 577.113.3

# ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА ДЕЗОКСИРИБОЗИДОВ ЗАМЕЩЕННЫХ 5-ФЕНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ

© 2025 г. И. В. Фатеев\*, #, С. А. Сасмаков\*\*, #, А. А. Зияев\*\*, Ж. М. Абдурахманов\*\*, Т. Т. Тошмуродов\*\*, С. А. Икрамов\*\*, Н. А. Тошева\*\*, В. Д. Фролова\*, Е. А. Зорина\*, Е. А. Заяц\*, Б. З. Елецкая\*, О. С. Смирнова\*, М. Я. Берзина\*, А. О. Арнаутова\*, Ю. А. Абрамчик\*, М. А. Костромина\*, А. Л. Каюшин\*, К. В. Антонов\*, И. А. Прохоренко\*, А. С. Парамонов\*, В. Л. Андронова\*\*\*, Р. С. Есипов\*, Ш. С. Азимова\*\*, А. И. Мирошников\*, И. Д. Константинова\*

\* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Институт химии растительных веществ им. академика С.Ю. Юнусова АН РУз, Узбекистан, 100170 Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 77

\*\*\* Подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России, Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

Поступила в редакцию 19.05.2025 г.

После доработки 28.05.2025 г.

Принята к публикации 29.05.2025 г.

Триазолы, содержащие пятичленное гетероциклическое основание с тремя атомами азота в положениях 1, 2 и 4 обладают электронодефицитной ароматической системой, что позволяет проводить в процессе синтеза различные модификации. Одни из самых важных производных – модифицированные нуклеозиды – структурные аналоги природных нуклеозидов, действующие как составляющие нуклеиновой кислоты и участвующие в ряде клеточных процессов, включая синтез ДНК и РНК, ферментативную регуляцию, передачу сигналов клетками, и т.д. В последние годы был синтезирован ряд аналогов нуклеозидов, содержащих 1,2,4-триазол, проявляющих различную биологическую активность. Целью данной работы был синтез дезоксирибозидов 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тионов и проверка их активности против вируса простого герпеса. Для определения возможных вариантов связывания исследуемых гетероциклов с активным центром пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*, был проведен молекулярный докинг. Были синтезированы три новых 2-дезоксирибозида алкилзамещенного 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона. Результаты исследования цитотоксичности и противовирусной активности на штамме дикого типа HSV-1/L2(TK+) в культуре клеток *Vero E6* показали, что удлинение цепи алкильного заместителя в положении C5 5-фенил-1,2,4-триазола приводит к значительному повышению цитотоксичности и противовирусной активности, как гетероциклического основания, так и дезоксирибозида. Наибольшая противовирусная активность наблюдалась для 1-(2'-дезокси-β-D-рибофуранозил)-5-пропилтио-3-фенил-1,2,4-триазола ( $IC_{50} = 189.13$  мкМ,  $SI = 6$ ) со значительно более высоким индексом селективности, чем у противовирусного препарата рибавирина.

**Ключевые слова:** 1,2,4-триазолы; аналоги нуклеозидов; нуклеозидфосфорилазы; противовирусная активность

**DOI:** 10.31857/S0132342325040149, **EDN:** LOEDUZ

Сокращения: ПНФ – пуриннуклеозидфосфорилаза; УФ – уридинфосфорилаза.

# Автор для связи: (эл. почта: ifateev@gmail.com, sasmakov@web.de).

## ВВЕДЕНИЕ

Производные 1,2,4-триазола – очень важные в фармацевтической промышленности [1]. Некоторые лекарственные препараты доступны для клинического применения, включая нуклеозидный аналог рибавирина [2, 3]. Однако рибавирин имеет ряд существенных недостатков, что побуждает к поиску соединений с более подходящим терапевтическим индексом среди их структурных аналогов.

5-Арил-1,2,4-триазол-3-тионы и их производные проявляют разные типы биологической активности, такие как противоопухолевая, противотуберкулезная и другие [4–9]. Ранее полученные 1,2,4-триазол-3-тионы с объемными заместителями проявляли активность вируса простого герпеса [10].

В данной работе мы синтезировали несколько производных 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона и ферментативно гликозилировали их до 2-дезоксирибозидов. Для исследования того, как триазол с двумя гидрофобными заместителями может связываться с активным центром пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*, использовался молекулярный докинг. Кроме того, мы сравнили активность

этих триазольных оснований и соответствующих нуклеозидов на модели вируса простого герпеса. Было определено, как удлинение цепи алкильного заместителя при тионовой (–SR) группе влияет на противовирусную активность.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы синтезировали серию 1,2,4-триазол-3-тионовых гетероциклических оснований и их рибозидов и дезоксирибозидов [11]. Исследование противовирусной активности на модели вируса простого герпеса показало, что 5-бутилтио-1-(2-дезокси- $\beta$ -D-рибофуранозил)-3-фенил-1,2,4-триазол (IX) имеет наибольшую активность. Мы решили синтезировать гомологи данного соединения (рис. 1).

Ранее синтезированный 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тион (I) реагировал с алкилиодидом или алкилбромидом в присутствии карбоната калия в сухом ацетоне. Таким образом были синтезированы метил-, этил- и пропилпроизводные. Все соединения оказались субстратами для пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* (ПНФ, КФ 2.4.2.1), поэтому был проведен ферментативный синтез их дезоксирибозидов (рис. 2).

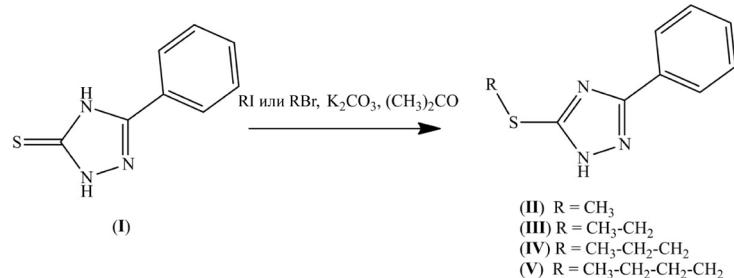


Рис. 1. Синтез замещенных 5-фенил-1,2,4-триазолов.

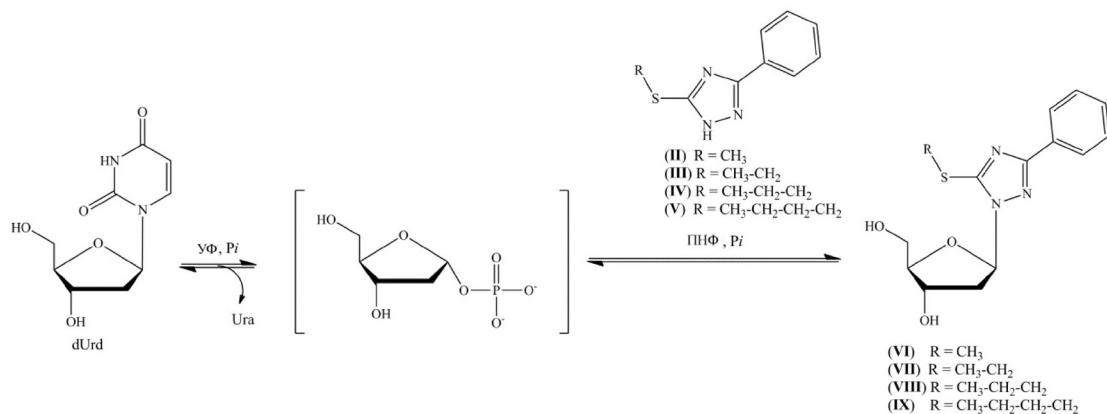


Рис. 2. Синтез нуклеозидов (VI)–(IX) с использованием нуклеозидфосфорилаз. ПНФ – пуриннуклеозидфосфорилаза *E. coli*; УФ – уридинфосфорилаза *E. coli*; dUrd – 2'-дезоксиуридин; Ura – урацил; Ри – неорганический фосфат.

Как и ранее [11], использовалась двухстадийная схема синтеза. Процесс включает в себя синтез  $\alpha$ -D-рибозо-1-фосфата из уридуна под действием уридинфосфорилазы *E. coli* (УФ, КФ 2.4.2.3). Образующийся  $\alpha$ -D-рибозо-1-фосфат и гетероциклическое основание подвергаются ферментативному гликозилированию под действием пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*, превращаясь в целевой продукт. Объем реакционных смесей зависел от растворимости исходных веществ.

Синтез дезоксирибозидов (VI), (VII) и (VIII) длился 15.5, 13 и 8 ч соответственно (табл. 1). Концентрация ПНФ в реакционной смеси составляла 0.94, 1.26 и 1.15 ед/мл, а концентрация исходных гетероциклических оснований – 2.6, 3.2 и 2.7 ммоль/л. Таким образом, синтез продукта (VII) занимал на 20% меньше времени, чем синтез продукта (VI), при более высокой (на 34%) концентрации фермента и более высокой (на 23%) концентрации субстрата. В то же время, синтез соединения (VIII) проходил намного быстрее. Ранее полученный продукт (IX) был синтезирован за 7.5 ч при концентрации ПНФ 0.62 ед/мл

и концентрации гетероциклического основания 1.8 ммоль/л. То есть в ряду метил – этил скорость образования продукта примерно одинакова. Однако в ряду этил – пропил – бутил наблюдается значительный рост скорости образования продукта.

Далее проводили докинг соединений (I)–(IV) с помощью веб-сервиса SwissDock. Использовались алгоритм докинга “Attracting Cavities” и модель белка ПНФ *E. coli* с 7-дезазагипоксантином и сульфатом в качестве лигандов (PDB ID: 5IU6). Изначально проводили докинг инозина и выбирали вариант его связывания (рис. 3), при котором ориентация нуклеозида была наиболее близкой к его ориентации в природе [12, 13]. Принималась во внимание близость аминокислотных остатков Asp204, Phe159 и Ser90 и положение N9 атома инозина, а так же близость C1 атома рибозы к сульфату.

При докинге гетероциклических оснований выбирали результаты, где атом азота, к которому происходит присоединение дезоксирибозы, наиболее близок к месту, где в соответствии с резуль-

Таблица 1. Условия синтеза и выход продуктов

Соединение	Масса основания, мг	ПНФ/УФ, ед.	Мольное соотношение основания и dUrd	Объем, мл	Время реакции, ч	Конверсия основания в нуклеозид, %	Выход, мг	Выход, %
(VI)	60	115 / 68	1 : 6	122	15.5	79.7	65.6	68
(VII)	65	126 / 70	1 : 6	100	13	78.0	26.9	26
(VIII)	65	126 / 70	1 : 6	110	8	90.3	40.9	41

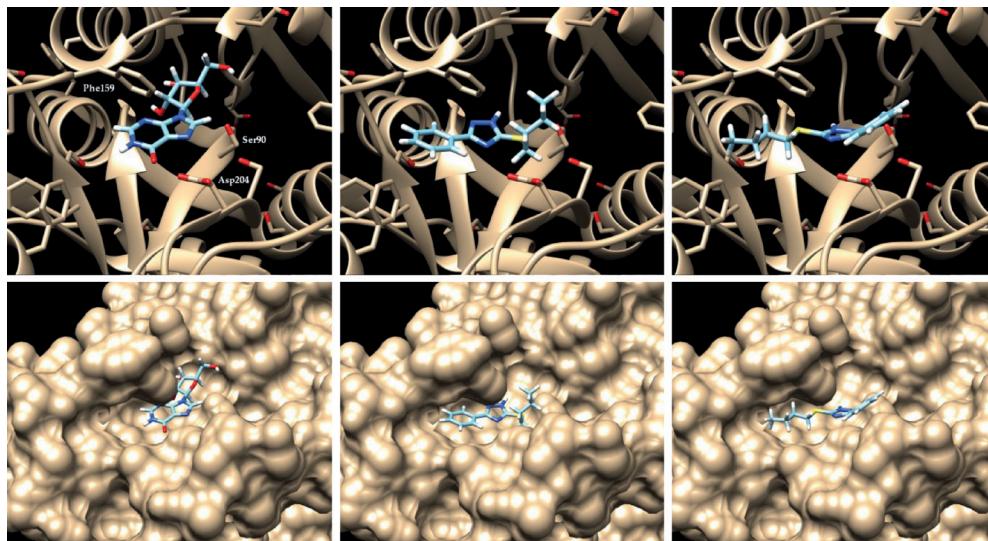


Рис. 3. Результаты молекулярного докинга инозина (слева) и 3-бутилтио-5-фенил-1,2,4-триазола ((V), два варианта).

татами молекулярного докинга находится N9 атом инозина. Выбирались только такие варианты связывания, при которых заместители триазола не находятся в сайте связывания рибозы. На рис. 3 показаны два выбранных варианта связывания 3-бутилтио-5-фенил-1,2,4-триазола (**V**). Один из гидрофобных заместителей расположен в сайте связывания пурина и в свободном пространстве около C6 и N1 атомов пурина, а другой гидрофобный заместитель расположен в свободном пространстве около C8 и N7 атомов пурина в стороне от плоскости пуринового кольца и в стороне от

Asp204 и Ser90. Два этих свободных пространства разделены Phe159.

Далее исследовали антигерпетическую активность синтезированных оснований и нуклеозидов (табл. 2).

За исключением 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона (**I**), который имел низкую токсичность и низкую противовирусную активность, исследованные гетероциклические основания имели более высокую токсичность в сравнении с дезоксирибозидами (рис. 4). Токсичность гетероциклических оснований и нуклеозидов увеличивалась с уве-

**Таблица 2.** Цитотоксичность и противовирусная активность оснований и нуклеозидов против штамма дикого типа HSV-1/L2(TK+) в клеточной культуре *Vero E6*

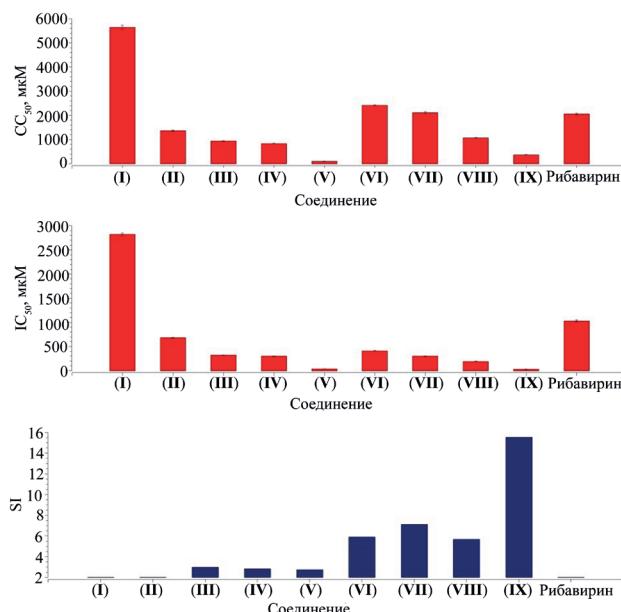
Соединение	CC <sub>50</sub> , мкМ <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> , мкМ <sup>2</sup>	IC <sub>95</sub> , мкМ <sup>2</sup>	SI <sup>3</sup>
(I)	1365.49 ± 26.51	681.04 ± 8.76	>1362.08	2
(III)	935.65 ± 11.74	317.25 ± 5.52	≥634.50	3
(IV)	830.97 ± 5.52	296.95 ± 2.98	≥593.91	3
(VI)	2408.01 ± 12.33	409.12 ± 5.24	≥1636.47	6
(VII)	2110.70 ± 33.63	297.82 ± 3.56	1588.36	7
(VIII)	1071.67 ± 8.05	189.13 ± 1.98	756.52	6
Рибавирин	>2047.50	1023.75 ± 20.0	2047.50	>2

<sup>1</sup> CC<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая концентрация соединения, требуемая для снижения жизнеспособности клеток на 50%.

<sup>2</sup> IC<sub>50</sub> и IC<sub>95</sub> – 50% или 95% ингибирующая концентрация соединения, приводящая к 50% или 95–100% ингибированию развития вирус-индуцированного цитопатического эффекта соответственно, относительно полного цитопатического эффекта в инфицированном, но нелеченом контроле. Значения представляют результат не менее двух независимых экспериментов.

<sup>3</sup> Индекс селективности (SI) каждого соединения определялся как отношение CC<sub>50</sub> к IC<sub>50</sub>.

“>” – количество погибших клеток не достигает 50 или 95% даже при использовании соединения в максимальной исследованной концентрации.



**Рис. 4.** Цитотоксичность CC<sub>50</sub> (A), противовирусная активность IC<sub>50</sub> (B) и индекс селективности SI (C) соединений (I–IX) и рибавирина.

личением длины гидрофобного заместителя тиогруппы.

Значения  $IC_{50}$  оказались близки для гетероциклического основания и его дезоксирибозида (за исключением метилпроизводного). Противовирусная активность, как и токсичность, увеличивалась с увеличением длины гидрофобного заместителя тиогруппы. Индекс селективности во всех случаях выше для нуклеозидов, чем для гетероциклических оснований.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы были получены от коммерческих поставщиков и использованы без какой-либо очистки, если не указано иное.

Методы, использовавшиеся для экспрессии и очистки рекомбинантных пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* (ПНФ) и уридинфосфорилазы *E. coli* (УФ) были описаны ранее [11, 14].

Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 100 C<sub>18</sub>-Reversed phase (Fluka, Букс, Швейцария). Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили в системе Waters (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс, США). Waters 1525, Waters 2489, Breeze 2, колонка Nova Pak C18, 4.6 × 150 мм, элюент А—0.1% ТФУ/H<sub>2</sub>O, элюент В—70% MeCN/0.1% ТФУ/H<sub>2</sub>O, скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 230 и 254 нм. Градиент от 0 до 100% элюента В за 20 мин.

Масс-спектры регистрировали на приборе LCQ FLEET (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), ESI - Ion trap, LC/MS/MS в режиме положительных и отрицательных ионов.

ЯМР спектры регистрировали на приборе Bruker Avance II 700 (Bruker BioSpin, Райнштеттен, Германия) в ДМСО-d<sub>6</sub> при 303 К, Unity 400 Plus (Varian, Пало-Алто, Калифорния, США) в ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub> при 293–298 К, JNM-ECZ600R (JEOL, Акисима, Япония) в CDCl<sub>3</sub> при 293–298 К. Химические сдвиги в ppm ( $\delta$ ) измеряли относительно остаточных сигналов растворителя (2.50 для ДМСО-d<sub>6</sub>). Константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ ) выражены в Гц.

Вирус простого герпеса первого типа (HSV-1) штамм L2 был получен из Государственной коллекции вирусов в Подразделении Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

**Синтез 3-метилтио-5-фенил-1,2,4-триазола (II).** Смесь 0.23 г (1.25 ммоль) 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона (I), 0.18 г (1.25 ммоль) метилйодида и 0.17 г (1.25 ммоль) карбоната калия нагревали в сухом ацетоне при 40–42°C. За ходом реакции наблюдали по ТСХ. После упаривания растворителя остаток промывали водой, продукт в виде порошка сушили на воздухе. Выход 82%, температура плавления 162–163°C (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH–H<sub>2</sub>O). ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>): 14.07 (уш.с., 1H, NH триазол), 7.93–7.95 (м, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> фенил), 7.37–7.40 (м, 3H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>4</sub> фенил), 2.06 (с, 3H, S-CH<sub>3</sub>). ЯМР <sup>13</sup>C (100 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>): 157.46 (C-3 триазол), 153.31 (C-5 триазол), 128.79 (C-3, C-5, C-4 фенил), 128.46 (C-1 фенил), 126.43 (C-2, C-6 фенил), 14.60 (S-CH<sub>3</sub>).

**Синтез 5-фенил-3-этилтио-1,2,4-триазола (III).** Смесь 0.25 г (1.25 ммоль) 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона (I), 0.13 г (1.25 ммоль) этилйодида и 0.17 г (1.25 ммоль) карбоната калия нагревали в сухом ацетоне при 40–42°C. За ходом реакции наблюдали по ТСХ. После упаривания растворителя остаток промывали водой, продукт в виде порошка сушили на воздухе. Выход 87%, температура плавления 95–96°C (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH–H<sub>2</sub>O). ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>): 7.93–7.96 (м, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> фенил), 7.34–7.41 (м, 3H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>4</sub> фенил), 3.12 (квартет, 2H,  $J$  = 7.3, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 (т, 3H,  $J$  = 7.3, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ЯМР <sup>13</sup>C (100 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>): 158.08 (C-3 триазол), 156.79 (C-5 триазол), 129.60 (C-4 фенил), 129.41 (C-1 фенил), 128.86 (C-3, C-5 фенил), 126.40 (C-2, C-6 фенил), 26.39 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 15.61 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**Синтез 3-пропилтио-5-фенил-1,2,4-триазола (IV).** Смесь 0.44 г (2.5 ммоль) 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона (I), 0.31 г (2.5 ммоль) пропилбромида и 0.34 г (2.5 ммоль) карбоната калия нагревали в сухом ацетоне при 40–42°C. За ходом реакции наблюдали по ТСХ. После упаривания растворителя остаток промывали водой, продукт в виде порошка сушили на воздухе. Выход 91%, температура плавления 98–99°C (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH–H<sub>2</sub>O). ЯМР <sup>1</sup>H (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 7.98–7.99 (м, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> фенил), 7.41–7.43 (м, 3H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>4</sub> фенил), 3.18 (т, 2H,  $J$  = 7.4, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.77 (м, 2H, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.03 (т, 3H,  $J$  = 7.3, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ЯМР <sup>13</sup>C (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 161.36 (C-3 триазол), 160.32 (C-5 триазол), 130.12 (C-4 фенил), 128.92 (C-3, C-5 и C-1 фенил), 126.52 (C-2, C-6 фенил), 35.06 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.20 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.34 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**Синтез 1-(2-дезокси- $\beta$ -D-рибофuranозил)-5-метилтио-3-фенил-1,2,4-триазола (VI).**

3-Метилтио-5-фенил-1,2,4-триазол (II) (0.060 г, 0.314 ммоль), 2'-дезоксиуридин (0.430 г, 1.884 ммоль) и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.157 г, 1.154 ммоль) растворяли в 122 мл воды и доводили рН до 7.0 добавлением 5N гидроксида калия. В реакционную смесь добавляли 0.065 мл УФ *E. coli* (68 ед) и 0.082 мл ПНФ *E. coli* (115 ед). Реакционную смесь термостатировали при 50°C в течение 15.5 ч. За ходом реакции наблюдали по ВЭЖХ. Смесь концентрировали в вакууме, продукт очищали колоночной хроматографией [octadecyl-Si 100 polyol (0.03 мм); 20 × 150 мм], элюирование этанолом (25%) в воде. Продукт лиофилизировали. Выход 65.6 мг (68%); чистота 97% (ВЭЖХ). ЯМР  $^1\text{H}$  (700 МГц): 7.98 (д,  $J = 7.8$ , 2H, H2, H6 фенил), 7.49 (м, 2H, H3, H5 фенил), 7.45 (м, 1H, H4 фенил), 6.10 (м, 1H, H-1'), 5.32 (уш. с, 1H, OH-3'), 4.75 (уш. с, 1H, OH-5'), 4.46 (м, 1H, H-3'), 3.85 (м, 1H, H-4'), 3.53 (м, 1H, H-5'a), 3.40 (м, 1H, H-5'b), 2.78 (м, 1H, H-2'a), 2.73 (с, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 2.32 (м, 1H, H-2'b). ЯМР  $^{13}\text{C}$  (176 МГц): 161.20 (C-1 фенил), 153.96 (C-5 триазол), 130.88 (C-3 триазол), 129.96 (C-4 фенил), 129.24 (C-3 и C-5 фенил), 126.27 (C-2 и C-6 фенил), 88.68 (C-4'), 85.86 (C-1'), 71.31 (C-3'), 62.72 (C-5'), 39.02 (C-2'), 27.83 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 15.43 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ЯМР  $^{15}\text{N}$  (71 МГц): 284.4 (N-2), 225.2 (N-1). MS (ESI+):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> вычисл. для  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{SNa}$ : 344.10; найдено, 344.23; [M + K]<sup>+</sup>, найдено, 360.01, [Base + H]<sup>+</sup>, найдено, 206.14. MS (ESI-):  $m/z$  [M - H]<sup>-</sup> вычисл. для  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ : 320.11; найдено, 320.21; [2M - H]<sup>-</sup>, найдено, 641.00, [Base - H]<sup>-</sup>, найдено, 204.23.

**Синтез 1-(2-дезокси- $\beta$ -D-рибофuranозил)-5-пропилтио-3-фенил-1,2,4-триазола (VIII).** 3-Пропилтио-5-фенил-1,2,4-триазол (IV) (0.065 г, 0.296 ммоль), 2'-дезоксиуридин (0.405 г, 1.775 ммоль) и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.122 г, 0.896 ммоль) растворяли в 110 мл воды и доводили рН до 7.0 добавлением 5N гидроксида калия. В реакционную смесь добавляли 0.114 мл УФ *E. coli* (70 ед) и 0.09 мл ПНФ *E. coli* (126 ед). Реакционную смесь термостатировали при 50°C в течение 8 ч. За ходом реакции наблюдали по ВЭЖХ. Смесь концентрировали в вакууме, продукт очищали колоночной хроматографией [octadecyl-Si 100 polyol (0.03 мм); 20 × 150 мм], элюирование этанолом (50%) в воде. Продукт лиофилизировали. Выход 40.9 мг (41%); чистота 97% (ВЭЖХ). ЯМР  $^1\text{H}$  (700 МГц): 7.97 (д,  $J = 7.7$ , 2H, H2, H6 фенил), 7.49 (м, 2H, H3, H5 фенил), 7.45 (м, 1H, H4 фенил), 6.14 (м, 1H, H-1'), 5.32 (уш. с, 1H, OH-3'), 4.75 (уш. с, 1H, OH-5'), 4.46 (м, 1H, H-3'), 3.85 (м, 1H, H-4'), 3.53 (м, 1H, H-5'a), 3.41 (м, 1H, H-5'b), 3.27 (м, 2H, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.77 (м, 1H, H-2'a), 2.31 (м, 1H, H-2'b), 1.75 (м, 2H, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.00 (т,  $J = 7.3$ , 3H, S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ЯМР  $^{13}\text{C}$  (176 МГц): 161.14 (C-1 фенил), 154.12 (C-5 триазол), 130.88 (C-3 триазол), 129.97 (C-4 фенил), 129.25 (C-3 и C-5 фенил), 126.25 (C-2 и C-6 фенил), 88.68 (C-4'), 85.86 (C-1'), 71.31 (C-3'), 62.71 (C-5'), 39.01 (C-2'), 35.27 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.98 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.39 (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). ЯМР  $^{15}\text{N}$  (71 МГц): 284.4 (N-2), 224.9 (N-1). MS (ESI+):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> вычисл. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{SNa}$ : 358.12; найдено, 358.31; [M + K]<sup>+</sup>, найдено, 374.06, [Base + H]<sup>+</sup>, найдено, 220.21. MS (ESI-):  $m/z$  [M - H]<sup>-</sup> вычисл. для  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ : 334.12; найдено, 334.32; [2M - H]<sup>-</sup>, найдено, 669.04, [Base - H]<sup>-</sup>, найдено, 218.39.

**Синтез 1-(2-дезокси- $\beta$ -D-рибофuranозил)-3-фенил-5-этилтио-1,2,4-триазола (VII).** 5-Фенил-3-этилтио-1,2,4-триазол (III) (0.065 г, 0.317 ммоль), 2'-дезоксиуридин (0.434 г, 1.902 ммоль) и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.136 г, 1.0 ммоль) растворяли в 100 мл воды и доводили рН до 7.0 добавлением 5N гидроксида калия. В реакционную смесь добавляли 0.067 мл УФ *E. coli* (70 ед) и 0.09 мл ПНФ *E. coli* (126 ед). Реакционную смесь термостатировали при 50°C в течение 13 ч. За ходом реакции наблюдали по ВЭЖХ. Смесь концентрировали в вакууме, продукт очищали колоночной хроматографией [octadecyl-Si 100 polyol (0.03 мм); 20 × 150 мм], элюирование этанолом (50%) в воде. Продукт лиофилизировали. Выход 26.9 мг (26%); чистота 98% (ВЭЖХ). ЯМР  $^1\text{H}$  (700 МГц): 7.98 (д,  $J = 7.9$ , 2H, H2, H6 фенил), 7.49 (м, 2H, H3, H5 фенил), 7.45 (м, 1H, H4 фенил), 6.12 (м, 1H, H-1'), 5.30 (д,  $J = 4.7$ ,

**Молекулярный докинг.** Расчет взаимодействия белка с лигандами были выполнены на сервере SwissDock с использованием алгоритма “Attracting Cavities” [14, 16]. Анализ молекулярных структур и конформационный поиск на основе данных докинга выполнялись с использованием программы UCSF Chimera v1.19 [17]. Использовалась кристаллографическая модель ПНФ *E. coli* [12], ранее опубликованная Тимофеевым и соавторами и депонированная в Protein Data Bank. Полная структура белка – PDB ID 5IU6.

**Цитотоксичность.** Цитотоксичность определялась количественно методом исключения трипанового синего [18–20]. Клетки инкубировали с 2-кратными последовательными разведениями тестируемых соединений с питательной средой (среда Игла и среда 199, смешанные в пропорции 1 : 1). Лунки отрицательного контроля содержали клетки с питательной средой. Через 72 ч инкубации культуры клеток в присутствии соединения в известной концентрации культуральную среду собирали, клетки обрабатывали раствором Версена и супензировали в ранее удаленной питательной среде. Полученную супензию клеток смешивали с 1% раствором трипанового синего в соотношении 1 : 1. Количество живых и окрашенных клеток определяли с помощью камеры Горяева (Минимед, Брянск, Россия). СС<sub>50</sub> определялась как концентрация препарата, при которой 50% клеток погибают через 72 ч.

**Противовирусная активность.** Противовирусная активность *in vitro* измеряли методом анализа ингибирования цитопатического эффекта (ЦПЭ). В 96-луночных пластиковых планшетах с монослоем клеток, сформированным в течение 24 ч, готовили 2-кратные последовательные разведения соединений. Клетки, инфицированные с множественностью заражения 0.1 БОЕ/клетка, инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> [18–20]. Через 48 ч ЦПЭ в контрольных клетках достигал 95–100%. Противовирусную активность оценивали путем определения IC<sub>50</sub> и IC<sub>95</sub>. Использовались три контроля. 1. Контроль токсичности. Неинфицированные клетки инкубировали в присутствии препарата в том же диапазоне концентраций, что и в эксперименте. 2. Контроль вирусов. Клетки были инфицированы в условиях, описанных выше, но питательная среда не содержала препарата. 3. Контроль клеток. Неинфицированные клеточные культуры инкубировали в питательной среде, не содержащей препарата. Количество

мертвых клеток, инкубированных в питательной среде (контроль клеток), составило 4.74 ± 0.12%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новые 2-дезоксирибозиды 5-фенил-1,2,4-триазол-3-тиона с объемными заместителями в положении 3 синтезированы с использованием реакции ферментативного трансгликозилирования. С увеличением длины заместителя возрастала и скорость синтеза 2-дезоксирибозида.

По результатам молекулярного докинга производных 1,2,4-триазола с двумя гидрофобными заместителями предложены два варианта их возможного связывания с активным центром пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*.

Исследована активность против вируса простого герпеса первого типа для производных триазола и их нуклеозидов и определена ее зависимость от длины заместителя. Как цитотоксичность для клеток *Vero E6*, так и противовирусная активность возрастают при увеличении длины заместителя в положении 3 1,2,4-триазола. Индекс селективности для трех синтезированных соединений выше, чем у рибавирина, но ниже, чем у ранее синтезированного 5-бутилтио-1-(2-дезокси- $\beta$ -D-рибофуранозил)-3-фенил-1,2,4-триазола (IX).

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование финансировалось Агентством инновационного развития Республики Узбекистан, проект F-FA-2021-360 (дизайн и химический синтез) и Российским научным фондом, проект 24-14-00458 (дизайн и ферментативный синтез).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи и дали одобрение на окончательный вариант текста.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Couto Rodrigues S., Silva Moratório de Moraes R., Tavares de Almeida Pinto G., Miranda Martins M.T., Antunes do Nascimento P., Alves Soares D.L., Mestre Botelho A.B., Cardoso Cruz C., Cunha A.C. // Chem. Rec. 2025. V. 25. P. e202400190. <https://doi.org/10.1002/tcr.202400190>
2. Ghous F., Shukla S., Parveen S., Kumar S., Banerjee M., Bishnoi A. // J. Mol. Struct. 2024. V. 1304. P. 137578. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.137578>
3. Zhou C.H., Wang Y. // Curr. Med. Chem. 2012. V. 19. P. 239–280. <https://doi.org/10.2174/092986712803414213>
4. Siddiqui S.Z., Arfan M., Abbasi M.A., Shah S.A.A., Ashraf M., Hussain S., Saleem R.Sh.Z., Rafique R., Khan Kh.M. // ChemistrySelect. 2020. V. 5. P. 6430–6439. <https://doi.org/10.1002/slct.201904905>
5. Khan I., Khan A., Halim S.A., Saeed A., Mehsud S., Csuk R., Ibrar A. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 142. P. 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.105>
6. Roman G., Bostanaru A.C., Nastasa V., Mares M // Turk. J. Chem. 2019. V. 43. P. 531–546. <https://doi.org/10.3906/kim-1811-4>
7. Kumar S., Khokra S.L., Yadav A. // Future J. Pharm. Sci. 2021. V. 7. P. 106. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00241-3>
8. Zahoor A.F., Saeed S., Rasul A., Noreen R., Irfan A., Ahmad S., Zaki M.E. // Biomedicines. 2023. V. 11. P. 3078. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113078>
9. Ziyaev A., Sasmakov S., Okmanov R., Makhmudov U., Toshmurodov T., Ziyeva M., Tosheva N., Azimova Sh. // Chem. Data Collections. 2025. V. 56. P. 101182. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2025.101182>
10. Küçükgüzel S.G., Çatkla-Süzgün P. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 97. P. 830–870. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.033>
11. Fateev I.V., Sasmakov S.A., Abdurakhmanov J.M., Ziyaev A.A., Khasanov S.S., Eshboev F.B., Ashirov O.N., Frolova V.D., Eletskaya B.Z., Smirnova O.S., Berzina M.Y., Arnautova A.O., Abramchik Y.A., Kostromina M.A., Kayushin A.L., Antonov K.V., Paramonov A.S., Andronova V.L., Galegov G.A., Esipov R.S., Azimova S.S., Miroshnikov A.I., Konstantinova I.D. // Biomolecules. 2024. V. 14. P. 745. <https://doi.org/10.3390/biom14070745>
12. Timofeev V.I., Zhukhlistova N.E., Abramchik Y.A., Fateev I.V., Kostromina M.A., Muravieva T.I., Esipov R.S., Kuranova I.P. // J. Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun. 2018. V. 74. P. 355–362. <https://doi.org/10.1107/S2053230X18006337>
13. Koellner G., Luić M., Shugar D., Saenger W., Bzowska A. // J. Mol. Biol. 1998. V. 280. P. 153–166. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1799>
14. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovsky D.V., Chupova L.A., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I. // Protein Expr Purif. 2002. V. 24. P. 56–60. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1524>
15. Bugnon M., Röhrig U.F., Goullieux M., Perez M.A.S., Daina A., Michielin O., Zoete V. // Nucleic Acids Res. 2024. V. 52. P. W324–W332. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae300>
16. Röhrig U.F., Goullieux M., Bugnon M., Zoete V. // J. Chem. Inf. Model. 2023. V. 63. P. 3925–3940. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00054>
17. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
18. Andronova V.L., Galegov G.A., Ias'ko M.V., Kukhanova M.K., Ius S. // Vopr. Virusol. 2010. V. 55. P. 31–34.
19. Gus'kova A.A., Skoblov M.Y., Korovina A.N., Yasko M.V., Karpenko I.L., Kukhanova M.K., Andronova V.L., Galegov G.A., Skoblov Y.S. // Chem. Biol. Drug Des. 2009. V. 74. P. 382–389. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00874.x>
20. Holý A., De Clercq E., Votruba I. // Nucl. Analogs as Antiviral Agents. 1989. V 401. P. 51–71. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0401>

# Enzymatic Synthesis and Molecular Docking Studies of Substituted 5-Phenyl-1,2,4-triazole-3-thione Deoxyribosides

I. V. Fateev\*, #, S. A. Sasmakov\*\*, #, A. A. Ziyaev\*\*, J. M. Abdurakhmanov\*\*, T. T. Toshmurodov\*\*, S. A. Ikramov\*\*, N. A. Tosheva\*\*, V. D. Frolova\*, E. A. Zorina\*, E. A. Zayats\*, B. Z. Eletskaya\*, O. S. Smirnova\*, M. Ya. Berzina\*, A. O. Arnautova\*, Yu. A. Abramchik\*, M. A. Kostromina\*, A. L. Kayushin\*, K. V. Antonov\*, I. A. Prokhorenko\*, A. S. Paramonov\*, V. L. Andronova\*\*\*, R. S. Esipov\*, Sh. S. Azimova\*\*, A. I. Miroshnikov\*, and I. D. Konstantinova\*

\* E-mail: e-mail: ifateev@gmail.com, sasmakov@web.de

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

\*\* Acad. S. Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences  
of the Republic of Uzbekistan,  
ul. Mirzo Ulugbek, 77, Tashkent, 100170 Uzbekistan

\*\*\* D. I. Ivanovsky Institute of Virology (N. F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology,  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation),  
ul. Gamaleya, 18, Moscow, 123098 Russia

Derivatives of 1,2,4-triazole are very important in the pharmaceutical industry. Some drugs are available in clinical therapy, including nucleoside analogue ribavirin. However, ribavirin has some significant drawbacks, prompting the search for compounds with a more favorable therapeutic index among its structural counterparts. In this work, we synthesized some derivatives of 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione and enzymatically glycosylated them into 2-deoxyribosides. Molecular docking was used to investigate how a triazole with two hydrophobic substituents could bind to the active site of an *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. The process involves the synthesis of  $\alpha$ -D-ribose-1-phosphate from uridine by *E. coli* uridine phosphorylase (UP). The resulting  $\alpha$ -D-ribose-1-phosphate and heterocyclic compound underwent enzymatic glycosylation by *E. coli* purine nucleoside phosphorylase and resulted in the desired product. Previously synthesized 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione (**I**) was reacted with alkyl iodide or alkyl bromide in the presence of potassium carbonate in dry acetone. Thus, methyl, ethyl, and propyl derivatives were synthesized. All compounds were substrates for *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP), so enzymatic synthesis of their deoxyribosides was performed. Subsequently, compounds (**I**)-(IV) were docked using the SwissDock web service. The Attracting Cavities docking algorithm and the *E. coli* PNP protein model with 7-deazahypoxanthine and sulfate as ligands (PDB 5IU6) were used. The antiherpetic activity of the synthesized bases and nucleosides has been investigated. New 5-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione 2-deoxyribosides with bulky substituents at the position 3 were synthesized using an enzymatic transglycosylation reaction. A molecular docking study of 1,2,4-triazole derivatives with two hydrophobic substituents has suggested possible variants of their binding to the active site of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. Both cytotoxicity towards *Vero E6* cells and antiviral activity increase with increasing length of the substituent at position 3 in 1,2,4-triazole.

*Keywords:* 1,2,4-triazoles; nucleoside analogues; nucleoside phosphorylases; antiviral activity